

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C07K 14/435

C07K 16/18 G01N 33/579



# [12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 95194888.1

[45] 授权公告日 2003 年 9 月 10 日

[11] 授权公告号 CN 1120847C

[22] 申请日 1995.8.31 [21] 申请号 95194888.1

[30] 优先权

[32] 1994.9.1 [33] JP [31] 232024/1994

[86] 国际申请 PCT/JP95/01735 1995.8.31

[87] 国际公布 WO96/06858 日 1996.3.7

[85] 进入国家阶段日期 1997.3.3

[71] 专利权人 生化学工业株式会社

地址 日本东京都

[72] 发明人 田村弘志 田中重则

[56] 参考文献

US5266461A 1993.11.30 G01N33/579

审查员 沈志红

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所

代理人 章鸣玉

权利要求书 2 页 说明书 19 页 附图 9 页

[54] 发明名称 (1→3) - β - D - 葡聚糖结合性蛋白质、识别该蛋白质的抗体及其利用

[57] 摘要

通过将鲨鱼血球提取液进行亲和层析处理和凝胶过滤可得到的、分子量约为 580kDa(非还原条件下的凝胶过滤)和约为 170kDa(还原条件下的 SDS - PAGE)的(1→3) - β - D - 葡聚糖结合性蛋白质或其变体,选择性识别它们的抗体,用这些蛋白质和抗体检出试样中的(1→3) - β - D - 葡聚糖的方法,用结合了这些蛋白质的载体从样品中除去(1→3) - β - D - 葡聚糖的方法,可用于试样或样品中所含的内毒素、(1→3) - β - D - 葡聚糖的检出或(1→3) - β - D - 葡聚糖的除去。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 在聚丙烯酰胺凝胶电泳中显示单一区带的、具有如下理化性质的与(1→3)- $\beta$ -D-葡聚糖特异性结合的得自蜚血球的蛋白质
- 5 (1)分子量: 非还原条件下的凝胶过滤 测得约为 580kD  
还原条件下的 SDS-PAGE 测得约为 170kD
- (2)等电点: 约 9.2
- (3)紫外吸收光谱: 280nm 处具有最大吸收
- (4)溶解性: 易溶于水
- 10 (5)物质的颜色: 白色。
2. 按权利要求 1 所述的蛋白质, 其 N 末端氨基酸序列如下所示:  
Lys-Ser-Gly-Phe-Ile-Leu-Thr-Ala-Pro-Lys-Ser-Leu-Thr-Leu-Gly-Arg-Asn-Asn-Arg-Leu-Asn-Leu-His-Leu-Phe-Asp-Ile-Asn-Thr-Asn-Gly-Phe-Xaa-Arg-Ile-Gly-Val-Lys-Asp-Gln-Asn-Asp-Phe-Asn-
- 15 式中, Xaa 表示存在于自然界的任何氨基酸。
3. 选择性识别权利要求 1 所述的蛋白质的抗体。
4. 由权利要求 1 所述的蛋白质组成的(1→3)- $\beta$ -D-葡聚糖的测定剂。
5. 按权利要求 4 所述的测定剂, 它是用标记物质标记蛋白质的。
6. 由权利要求 1 所述的蛋白质和 选择性识别权利要求 1 所述的蛋白质的抗
- 20 体组成的(1→3)- $\beta$ -D-葡聚糖的测定盒。
7. 按权利要求 6 所述的测定盒, 它是用标记物质标记抗体的。
8. 由权利要求 1 所述的蛋白质和 测定剂组成的(1→3)- $\beta$ -D-葡聚糖的测定盒, 其中测定剂是由权利要求 1 所述的蛋白质组成的(1→3)- $\beta$ -D-葡聚糖的测定剂, 该测定剂是用标记物质标记蛋白质的。
- 25 9. (1→3)- $\beta$ -D-葡聚糖的测定方法, 其特征在于: 使权利要求 1 所述的蛋白质与试样中的(1→3)- $\beta$ -D-葡聚糖反应形成复合物, 然后检出该复合物。
10. 按权利要求 9 所述的测定方法, 其中检出复合物是采用选择性识别权利要求 1 所述的蛋白质的抗体。
11. 按权利要求 10 所述的测定方法, 其中抗体为标记的或可标记的。
- 30 12.(1→3)- $\beta$ -D-葡聚糖的测定方法, 其特征在于: 将试样中的(1→3)- $\beta$ -D-葡聚糖固定在固相上, 或者以可被固定的权利要求 1 所述的蛋白质与以标记物标记的权利要求 1 所述的蛋白质挟持, 形成三明治状复合物, 蛋白质为可固定于固相的物质时, 将该复合物固定于固相上, 将固相与液相分离后, 测定任一相的标记物质。
- 35 13. 权利要求 1 所述的蛋白质组成的(1→3)- $\beta$ -D-葡聚糖除去剂。

14. 按权利要求 13 所述的除去剂,它是蛋白质固定在载体上的物质。

15.(1→3)-β-D-葡聚糖的除去方法,其特征在于:将权利要求 1 所述的蛋白质与样品中的(1→3)-β-D-葡聚糖反应,形成复合物,从试样中分离除去该复合物。

16. 按权利要求 15 所述的除去方法,它是将蛋白质固定在载体上的方法。

5 17. 鲎变形细胞溶胞产物中存在的 G 因子的活化的抑制方法,其特征在于:将权利要求 1 所述的蛋白质与含(1→3)-β-D-葡聚糖的样品混合,然后将该样品与该鲎变形细胞溶胞产物混合。

18. 内毒素的测定方法,其特征在于:用采用鲎变形细胞溶胞产物的鲎反应测定含(1→3)-β-D-葡聚糖的样品中所含的内毒素时,在鲎反应之前,将样品与  
10 权利要求 1 所述的蛋白质混合,或将该溶胞产物与该蛋白质混合。

## (1 → 3)-β-D-葡聚糖结合性蛋白质、识别该蛋白质的抗体及其利用

## 5 技术领域

本发明涉及从鲎的血球得到的(1 → 3)-β-D-葡聚糖结合性蛋白质或其变体及其抗体。

本发明还涉及由这些蛋白质组成的(1 → 3)-β-D-葡聚糖的测定剂、由这些蛋白质和该测定剂组成的药盒、由这些蛋白质和该抗体组成的药盒, 以及使用这些蛋白质的(1 → 3)-β-D-葡聚糖的测定方法。

本发明还涉及这些蛋白质或结合这些蛋白质的载体组成的(1 → 3)-β-D-葡聚糖的除去剂及使用该除去剂的(1 → 3)-β-D-葡聚糖的除去方法。

本发明还进一步涉及使用这些蛋白质的鲎变形细胞溶胞产物中存在的G因子活化的抑制方法。

15 本发明还更进一步涉及使用这些蛋白质的内毒素测定方法。

## 背景技术

1964年, 有人发现鲎血球提取液(变形细胞溶胞产物, 以下称作LAL)可被极微量的革兰氏阴性(G<sup>-</sup>)菌内毒素(以下称作内毒素(Et)或脂多糖(LPS))凝固(凝胶化), 迄今已阐明与Et(LPS)敏感因子(C因子)起始的凝胶化有关的多个因子(丝氨酸蛋白酶前体)。据报告, 该反应由类似于哺乳动物凝血系统的连锁反应机制组成, 在其它无脊椎动物也存在同样的机制。

另一方面, 已知LAL除了Et外也与极微量的(1 → 3)-β-D-葡聚糖(以下也称作β-葡聚糖)反应引起凝胶化, 也发现识别β-葡聚糖的敏感因子(G因子), 而且, 也阐明了通过和C因子介导的途径(C因子系统)完全不同的途径(G因子系统)的凝固机制, 可诱导Et同样的凝胶化, 因为β-葡聚糖也是真菌细胞壁的结构多糖, 所以也可进一步推测此途径具有与C因子系统同样的对机体防御的密切关系。

作为β-葡聚糖结合性蛋白质, 迄今报告了鲎的血液凝固G因子〔FEBS Lett., 129, 318-321(1981)〕、蚕的β-葡聚糖识别蛋白质(プロフェノール氧化酶)〔J. Biol. Chem., 263, 12056-12062(1988)〕、人单核细胞的β-葡聚糖受体〔J. Exp. Med., 173, 1511-1520(1991)〕、局部调理素化时的补体受体〔J. Immunol., 124, 3307-3315(1985)〕、对植物细胞的β-葡聚糖エリシタ-〔J. Cell Biol., 78, 627(1978)〕、来自 *Streptococcus sobrinus* 的葡聚糖结合性蛋白质〔Infect. Immun., 60(12): 5291-5293(1992)〕、来自ツヅリガ的β-葡聚糖特异性植物凝集素〔Matha V., 64, 35-42(1990)〕等。

### 发明的揭示

本发明者对 LAL 中凝固化因子进行研究的结果,发现 LAL 中存在与  $\beta$ -葡聚糖特异性结合、抑制  $\beta$ -葡聚糖激活 G 因子的蛋白质,并分离了这种蛋白质。本发明者还发现了选择性识别这种蛋白质的抗体。

而且,研究了这些蛋白质或抗体的性质,发现了其用途。

即、本发明的课题是提供这样的特异性结合于  $\beta$ -葡聚糖的新型蛋白质及其抗体,将其应用于  $\beta$ -葡聚糖和内毒素的检出、 $\beta$ -葡聚糖的去除或用作真菌感染治疗药。

即、本发明为得自鲎血球、精制成在十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 中显示单一区带的、具有如下理化性质的  $\beta$ -葡聚糖结合性蛋白质。

(1)分子量: 约 580kDa (非还原条件下的凝胶过滤)

约 170kDa (还原条件下的 SDS-PAGE)

(2)等电点: 约 9.2

(3)紫外吸收光谱: 280nm 处具有最大吸收

(4)溶解性: 易溶于水

(5)物质的颜色: 白色

且 N 末端氨基酸序列如下所示。

Lys-Ser-Gly-Phe-Ile-Leu-Thr-Ala-Pro-Lys-Ser-Leu-Thr-Leu-Gly-Arg-Asn-Asn-Arg-Leu-Asn-Leu-His-Leu-Phe-Asp-Ile-Asn-Thr-Asn-Gly-Phe-Xaa-Arg-Ile-Gly-Val-Lys-Asp-Gln-Asn-Asp-Phe-Asn-

(式中, Xaa 表示存在于自然界的任何氨基酸)。

而且,本发明中也包含上述蛋白质的变体。

本发明中的变体为与上述蛋白质功能相同的物质,通过取代、缺失或追加该蛋白质的氨基酸而对其功能无实质性影响的物质。

更进一步,较好的是,本发明中的变体其氨基酸序列具有高度相同性,意味着所要求的效果与该蛋白质实质上相同的蛋白质(以下称包括这些变体的蛋白质)。

本发明还进一步涉及如下所述的抗体、使用这些抗体的葡聚糖测定剂、测定盒及葡聚糖测定方法。

(1)选择识别上述蛋白质的抗体。

(2)由上述蛋白质或标记的上述蛋白质组成的(1 → 3)- $\beta$ -D-葡聚糖测定剂。

(3)由上述蛋白质和上述抗体或标记的上述抗体组成的(1 → 3)- $\beta$ -D-葡聚糖测定盒。

(4)由上述蛋白质和上述测定剂组成的(1 → 3)- $\beta$ -D-葡聚糖测定盒。

(5)以上述蛋白质和试样中的(1 → 3)- $\beta$ -D-葡聚糖反应形成复合物、检出该复

合物为特征的(1→3)-β-D-葡聚糖的测定方法。

(6)上述(5)中所述的测定方法,即采用所述抗体或标记的或可标记的抗体进行上述复合物的检出。

(7)(1→3)-β-D-葡聚糖的测定方法,其特征在于:将试样中的(1→3)-β-D-葡聚糖固定在固相上,或以可形成固相的上述蛋白质和该标记蛋白质挟持,形成三明治状复合物,上述蛋白质为可固定于固相的物质时,将该复合物固定于固相上,将固相与液相分离后,测定任一相的标记物质。

本发明进一步还涉及从含有这样的葡聚糖的样品中除去葡聚糖的葡聚糖除去剂及除去方法。

(8)上述蛋白质或固定蛋白质的载体组成的(1→3)-β-D-葡聚糖除去剂。

(9)(1→3)-β-D-葡聚糖的除去方法,其特征在于:将上述蛋白质或固定于上述载体上的上述蛋白质与样品中的(1→3)-β-D-葡聚糖反应,形成复合物,从样品中分离除去该复合物。

本发明还进一步涉及G因子活化的抑制方法。

(10) 鲎变形细胞溶胞产物中存在的G因子的活化的抑制方法,其特征在于,将上述蛋白质与含(1→3)-β-D-葡聚糖的样品混合,然后将该样品与该鲎变形细胞溶胞产物混合。

本发明还进一步涉及内毒素的测定方法。

(11)内毒素的测定方法,其特征在于:用采用鲎变形细胞溶胞产物的鲎反应测定含(1→3)-β-D-葡聚糖的样品中所含的内毒素时,在鲎反应之前,将样品与上述蛋白质混合,或将该溶胞产物与上述蛋白质混合。

本发明的β-葡聚糖结合性蛋白质(以下也称GBP)可应用通常用于鲎变形细胞溶胞产物配制的低渗液提取法,从鲎 *Tachyples tridentatus*、*Tachyples gigas*、*Limulus polyphemus*、*Carcinoscorpius rotundicauda* 等的血球(变形细胞)中提取(例如,参照 *J. Biochem.*, 80, 1101-1021(1976))。

具体地为在鲎的血球中,加入冷却至0-4℃的0.02M Tris-盐酸缓冲液(pH8.0),于0-4℃搅拌,提取。将提取液冷却、离心,得到上清液(溶胞产物)。在此溶胞产物中含有プロクロテイン酶(Pro CE)、凝固蛋白原(coagulogen)、G因子、B因子、C因子、GBP、抗LPS因子等各种凝血系统因子。溶胞产物上以0.02-0.05M Tris-盐酸缓冲液(pH7.0-8.5)(含有0-0.2M NaCl)平衡过的CL-6B亲和柱(以硫酸右旋糖酐、琼脂糖CL-6B(Pharmacia制),用已知的方法(*Anal. Biochem.* 60, 149-152(1974)制备),用含有0.2-0.5M NaCl的上述缓冲液洗脱。在洗脱部分中取显示GBP活性的流份。这样便得到混有B因子、C因子和GBP的流份。将此流份冷冻干燥,冷冻干燥物用凝胶过滤色谱法精制。

凝胶过滤色谱法是用以0.02-0.08M Tris-盐酸缓冲液(pH6.5-8.5)(含有0.4-1M NaCl)平衡过的Sephacryl S-300HR(高分辨)柱(Pharmacia制)或セルロフ、イン

GCL-2000m 柱(生化学工业(株)出售)等进行的. 用用于平衡的缓冲液进行洗脱, 较好的是, 同样的色谱法至少重复进行 2 次.

将凝胶过滤色谱法的洗脱部分分别收集, 对各流份测定 GBP 活性, 取显示此活性的流份. 在第一次色谱分离中, B 因子、C 因子和 GBP 几乎完全分离, 再通过用同样柱的色谱法, 得到精制的 GBP. 收集此流份, 冷冻干燥, 得到本发明的 GBP. 它是白色粉末, 易溶于水. 此 GBP 在聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)中显示单一区带, 显示上述理化性质.

本发明的 GBP 因 N 末端氨基酸序列已确定, 可用公知的遗传工程方法(例如从该序列制成 DNA 引物, 用此引物从鲨血球得到的 cDNA 文库得到编码 GBP 的 DNA, 将此 DNA 整合入载体, 得到重组体, 使其按常规方法表达等方法)得到.

本发明中的 GBP 的活性按如下方法进行测定: 在  $\beta$ -葡聚糖(用 Saito 等的方法(Agri. Biol. Chem., 32, 1261-1269(1968)), 从茯苓制得的茯苓糖(Pachyman)的 50pg/ml 0.01M NaOH 水溶液)0.05ml 中加入上述色谱的各流份 0.05ml, 37 °C 加温 10 分钟, 加入按 Obayashi 等的方法(Clic. Chim. Acta, 149, 55-65(1985)) 从 *Tachypleus tridentatus* 变形细胞的胞溶产物制得的 G 因子(0.04ml)和プロクロッティング酶(Pro CE)(0.02ml), 以及 1M MgSO<sub>4</sub>(0.01ml)、2M Tris-盐酸缓冲液(pH8.0)(0.01ml)和作为プロクロッティング酶(Pro CE)底物的 5mM 叔丁氧基羰基-L-亮氨酸-甘氨酸-L-精氨酸-对硝基苯胺(Boc-Leu-Gly-Arg-pNA)(0.02ml), 37 °C 反应 20 分钟, 将游离的对硝基苯胺用重氮偶合反应发色后, 测定 545nm 的吸光度. 然后, 以用水代替样品时测定的 G 因子活化能力 (对照)作为 100 % 时的相对活性作为抑制活性. G 因子活化能力的抑制是由 GBP 和  $\beta$ -葡聚糖的结合引起的(参照后面的实施例). 因此, 将此 G 因子抑制活性作为 GBP 活性.

本发明的 GBP 纯度的测定可用聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)(pH7.0-8.0, 5-7.5%凝胶或 pH4-5, 5-7.5%凝胶)、SDS-PAGE(pH7.0-8.0, 6-7.5%凝胶, 0.1-0.2%SDS)或等电电泳(IEF)来进行.

GBP 的分子量测定可用 SDS-PAGE、Sephacryl S-300HR 或セルロフィン GCL-2000m 等凝胶过滤、干涉光学系的沉降平衡、超速离心的沉降测定、粘度、光散射、用火棉胶膜等的渗透压测定、氨基酸分析、激光离子化质谱法等进行.

但是, 本发明的 GBP 是对具有特定结构的  $\beta$ -葡聚糖有亲和性的物质, 而且与通常的蛋白质相比分子量也非常大, 因此在用具有糖苷键的不溶性载体进行凝胶过滤和质谱等物理测定的情况下, 难以得到真正的值. 这就需要选择无干扰作用的载体和条件.

本发明的 GBP 的紫外吸收光谱见图 7. 如图所示 280nm 处有最大吸收.

本发明的 GBP 的 N 末端氨基酸序列如序列表 1 号序列所示.

本发明也包括上述变体.

本发明的 GBP 特异性地结合于具有(1 → 3)- $\beta$ -D-葡聚糖结构的  $\beta$ -聚葡萄糖苷,

中和也具有对鲎 G 因子的活化能力的  $\beta$ -葡聚糖的生物化学性质和免疫药理学性质。而且也同样中和除直链(1 → 3)- $\beta$ -D-葡聚糖以外具有(1 → 6)- $\beta$ -D-或(1 → 4)- $\beta$ -D-等分子内侧链的支链(1 → 3)- $\beta$ -D-葡聚糖。

(抗体)

- 5 选择性识别本发明的 GBP 的抗体(以下称作抗 GBP 抗体), 为以精制的 GBP 作为抗原而得到的对此抗原的抗血清、多克隆抗体和单克隆抗体。

本发明中使用的多克隆抗体的制备方法, 可以列举将该抗原给予家兔、山羊等被免疫动物, 所得的抗血清再加以精制等方法。在投与被免疫动物时, 合用佐剂可望激活抗体产生细胞。

- 10 本发明中使用的单克隆抗体的制备方法, 可以列举如下制备方法, 即将该抗原给小鼠或大鼠腹腔注射后摘出脾脏等, 将从该脾脏等取出的细胞与肿瘤细胞株骨髓瘤细胞进行细胞融合, 建立杂交瘤, 使所得的杂交瘤在试管内连续增殖, 再从所得的杂交瘤中选出持续产生抗上述抗原的特异性抗体的细胞株, 将选出的此细胞株在试管内培养或在小鼠腹腔等生物体内培养, 大量地制备单克隆抗体。作为细胞融合用的细胞可用脾细胞以外的淋巴结细胞和末梢血液中的淋巴细胞。骨髓瘤细胞株来自同种细胞株的比来自异种细胞株的为好, 可得到稳定地产生抗体的杂交瘤。所得的多克隆抗体和单克隆抗体的精制方法可列举用硫酸钠、硫酸铵等中性盐的盐析、低温醇沉淀和聚乙二醇或按等电点选择的分步沉淀法、或电泳、用 DEAE 载体、CM 载体等离子交换剂和蛋白质 A、羟基磷灰石吸附剂的解吸法、凝胶过滤和超速离心法等。

(测定法)

本发明的 GBP 特异性地结合于具有(1 → 3)- $\beta$ -D-葡聚糖苷结构的  $\beta$ -聚葡萄糖苷(以下称作(1 → 3)- $\beta$ -D-葡聚糖), 因此, 该 GBP 与试样中的(1 → 3)- $\beta$ -D-葡聚糖反应, 形成复合物, 检出该复合物便可测定(1 → 3)- $\beta$ -D-葡聚糖。

- 25 本发明的(1 → 3)- $\beta$ -D-葡聚糖的测定方法可列举如下方法。

例如: 将试样中的(1 → 3)- $\beta$ -D-葡聚糖固定在固相上, 或以可固定的 GBP 和标记 GBP 挟持, 形成三明治状复合物, 蛋白质或其变体为可固定于固相的物质时, 将该复合物固定于固相上, 将固相与液相分离后, 用应用于该标记物质的方法测定任一相的标记物质, 从而测定(1 → 3)- $\beta$ -D-葡聚糖。

- 30 此(1 → 3)- $\beta$ -D-葡聚糖的测定方法可为例如: 在固定于固相上的 GBP 上添加含(1 → 3)- $\beta$ -D-葡聚糖的试样, 使该 GBP 与(1 → 3)- $\beta$ -D-葡聚糖结合, 同时或其后添加预先以标记物质标记的 GBP, 将该(1 → 3)- $\beta$ -D-葡聚糖以该 GBP 和含标记的 GBP 挟持, 形成三明治状复合物, 或将预先以标记物质标记的 GBP 和(1 → 3)- $\beta$ -D-葡聚糖的试样混合, 该标记的 GBP 与(1 → 3)- $\beta$ -D-葡聚糖结合形成结合物, 35 将此结合物添加在固定于固相上的 GBP 上, 形成上述三明治状复合物后, 将该复合物固定的固相与液相分离, 用适用于该标记物质的方法检出任一相的标记物质

(例如固定于固相的该复合物的标记物质)。

本发明中所用的标记 GBP 可以用已知方法以标记物质(酶(过氧化物酶、碱性磷酸酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶等)、放射性同位素( $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^3\text{H}$ 等)、荧光物质(荧光素异硫氰酸酯、缴形酮等)、化学发光物质(鲁米诺等)或其它物质(生物素、抗生物素蛋白(较好的为链霉抗生物素蛋白)等)直接标记 GBP 而得到。

GBP 的标记方法宜选自适用于标记物质的方法,如标记酶时的戊二醛法、高碘酸交联法、马来酰亚胺交联法、碳化二亚胺法等,用放射性同位素标记时的氯胺 T 法、乳过氧化物酶等(续生化学讲座 5 免疫生化学研究法、东京化学同人、1986 年发行、参照欧洲专利第 0163041 号说明书)。

10 将本发明的 GBP 固定于微量培养板、珠、管、膜、乳胶、试管、滤纸及琼脂糖、聚丙烯酰胺、纤维素和葡聚糖等不溶性载体的固相上的方法,可采用物理吸附法、共价结合法、包埋法等一般的固定化酶的制备方法(参照固定化酵素、1975 年、谈讲社发行、第 9-75 页),特别以较为简便的物理吸附法为佳。GBP 不结合的部分用血清白蛋白、明胶、乳蛋白等进行封闭为宜。

15 下面对本发明的测定方法作更详细的说明。

首先,将 GBP 固定在固相上。固定的方法可为例如将 GBP 溶解在 pH 9-10 的磷酸盐缓冲液或碳酸盐缓冲液中,加在固相上,于 4℃ 下保持 6-14 小时的固定方法。如上述固定后,添加封闭剂,该 GBP 未固定的部分必须预先被覆盖。封闭剂可为例如从牛等采取的血清白蛋白、血清或乳蛋白等。

20 接着,在上述 GBP 固定的固相上添加含(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-葡聚糖的试样,使(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-葡聚糖与上述 GBP 结合。含(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-葡聚糖的试样除可使用人、牛、大鼠、小鼠等血液和体液等之外,可将下述试样直接作为样品。使(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-葡聚糖结合后,一般推荐将固相用添加 Tween 类表面活性剂等的磷酸盐缓冲液洗涤。

25 再在上述(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-葡聚糖结合的固相上,添加标记的 GBP,使该标记的 GBP 结合于(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-葡聚糖。用此操作使(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-葡聚糖形成以上述 GBP 和该标记的 GBP 挟持的三明治状复合物。

30 然后,测定该三明治状复合物的标记物质,对(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-葡聚糖进行定量。标记物质的测定方法因标记物质而异,例如在对标记物质使用生物素的情况下,在上述形成三明治状复合物的固相或不溶性载体上添加结合有抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白的酶,使酶通过抗生物素蛋白结合于复合物上,测定该酶的酶促反应引起的底物的变化。

35 然后,对(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-葡聚糖浓度和标记物质测定结果的关系作出标准曲线,用未知样品的测定结果和该标准曲线,对未知检体中的(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-葡聚糖定量。

作为本发明的测定方法,可向固定的(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-葡聚糖(如细胞和组织中存

在的(1 → 3)-β-D-葡聚糖、以物理或化学方法结合于不溶性的载体等的(1 → 3)-β-D-葡聚糖等)添加以标记物质标记的 GBP, 形成该(1 → 3)-β-D-葡聚糖和该 GBP 的复合物, 从复合物的标记物质检出(1 → 3)-β-D-葡聚糖或进行定量。

5 本发明的测定方法还可以是在上述固定的(1 → 3)-β-D-葡聚糖上添加 GBP, 使该(1 → 3)-β-D-葡聚糖与该 GBP 形成复合物, 然后添加选择识别 GBP 的抗体, 再用特异性识别该抗体的物质进行标记, 通过该物质检出(1 → 3)-β-D-葡聚糖或加以定量, 或使该复合物形成后, 添加用标记物质预先标记的该抗体, 通过该标记物质检出(1 → 3)-β-D-葡聚糖或加以定量。

10 特异性识别该抗体的物质, 可为例如按已知方法用标记物质(如生物素、抗生物素蛋白、酶、同位素、荧光色素、化学发光物质等)标记的抗免疫球蛋白抗体所形成的化合物等。

本发明的试剂盒由 GBP 和标记的 GBP 构成, 使用本发明的试剂盒时, 必须有将该 GBP 固定于固相上的步骤, 但是, 通过将该 GBP 预先固定在固相上可省略该步骤。

15 本发明的试剂盒也可由 GBP 和选择性识别 GBP 的抗体构成, 也可再加上标记的抗免疫球蛋白抗体。

本发明的试剂盒还可由 GBP 和标记的抗 GBP 抗体构成。

本发明的试剂盒中也可再加上上述固相、检测标记物质的试剂、缓冲液、标准物质等, 制成试剂盒。

20 (除去)

本发明的 GBP 和样品中的(1 → 3)-β-D-葡聚糖反应形成复合物, 从样品中分离除去该复合物即可除去(1 → 3)-β-D-葡聚糖。该复合物的分离除去方法可使用公知的蛋白质分离方法。然而, 较好的是使试样中的(1 → 3)-β-D-葡聚糖与固定了 GBP 的载体(更好的是不溶性载体)接触, 使该 GBP 与(1 → 3)-β-D-葡聚糖形成复合物, 分离除去该复合物的方法。

这时所用的载体的形状可列举具有膜状(滤膜形、中空纤维状、管形、平膜形等)、粒状、乳胶状、片状、粉末状、微量培养板状等形状的物体, 载体以无(1 → 3)-β-D-葡聚糖的为佳。

30 将 GBP 与载体结合, 可以是使 GBP 与聚苯乙烯类或聚丙烯类等载体物理性的结合, 或 GBP 与聚酰胺类、纤维素类、琼脂糖类、聚丙烯酰胺类、葡聚糖类、乙烯基聚合物类(甲基丙烯酸环氧丙酯和乙二醇二甲基丙烯酸酯的多孔性共聚体)等载体的化学性结合。作为化学性结合法, 可根据载体的种类, 从以下公知的结合方法中选择适当的方法, 用于 GBP 的结合, 这些方法是利用载体的芳香族氨基进行重氮偶合反应的重氮法、用 CNBr 使载体的羟基活化形成肽键的 CNBr 法、  
35 用载体的胍衍生物等形成肽键的酰迭氮法、利用卤素等反应性强的载体官能团将蛋白质烷基化的烷化法、用戊二醛之类与游离氨基反应的交联试剂使载体和蛋白

质的游离氨基之间交联的方法、碳化二亚胺法、环氧活化法、以及用这些方法通过间隔物结合的方法等。

结合了 GBP 的载体与含(1 → 3)-β-D-葡聚糖的样品接触的方法可以是公知的固液接触方法,例如:将样品液通过膜状载体的方法;将样品液通过充填了粒状载体的柱的方法;将样品加入微量培养板载体的孔中,放置一定时间后将样品分离的方法;将样品加在任意形状的载体上,振摇一定时间后,静置,用通常的固液分离方法(过滤、离心分离、抽滤、倾析等)得到除去(1 → 3)-β-D-葡聚糖的样品的方法等。

在用采用鲎变形细胞胞溶产物的鲎反应测定 Et 时,通过在 LAL 或样品中加入该 GBP,该 GBP 结合于(1 → 3)-β-D-葡聚糖上,形成复合物,这样,利用抑制(1 → 3)-β-D-葡聚糖敏感因子(G 因子)的活化,通过 LAL 中的 C 因子系统反应,可特异性地测定含(1 → 3)-β-D-葡聚糖的样品中的 Et 而不受(1 → 3)-β-D-葡聚糖的影响。

这样,本发明的 GBP 可用作(1 → 3)-β-葡聚糖和 Et 的检出及测定试剂,而且,(1 → 3)-β-D-葡聚糖是真菌细胞壁的结构多糖,GBP 与此多糖结合,对真菌等的增殖可给予影响,因此可望开发成医药品,特别是抗真菌剂。

本发明的(1 → 3)-β-D-葡聚糖测定或除去方法可以是用于检出或除去血清、血浆、尿、脑脊液等体液、非经口医药品、输液、注射用水、生物学制剂等试样中可能含有的(1 → 3)-β-D-葡聚糖的方法。

关于本发明的内毒素的测定,可以是用于检出与上述同样的样品中含有的内毒素的方法。

#### 附图的简单说明

图 1 表示实施例 1 中鲎血球提取物的硫酸右旋糖酐琼脂糖 CL-6B 柱层析的洗脱曲线。

图 2 表示图 1 的 GBP 活性部分的 Sephacryl S-300 HR 色谱曲线。

图 3 表示图 2 的 GBP 活性部分的第二次 Sephacryl S-300 HR 色谱图。

图 4 表示用采用 Sephacryl S-300 HR 的凝胶过滤法得到的本发明的 GBP 的估计分子量。

图 5 表示用 SDS-PAGE 得到的本发明的 GBP 的估计分子量。

A 栏和 B 栏分别表示分子量标记和还原条件下的 GBP 的分子量。

图 6 表示用等电点电泳分析法得到的本发明的 GBP 的等电点。

A 栏和 B 栏分别表示 GBP 的等电点和标记物的等电点。

图 7 表示本发明的 GBP 的紫外吸收光谱。

图 8 表示本发明的 GBP 对 G 因子活化抑制能力和 GBP 用量。

图 9 为表示用本发明的测定方法得到的(1 → 3)-β-D-葡聚糖的浓度与吸光度

的关系的标准曲线。

实施本发明的最佳状态

下面举出实施例来表示实施本发明的最佳状态。

- 5 本实施例中所用的全部玻璃器具都经干热灭菌(250 ℃、2 小时)成为无 β-葡聚糖的状态加以使用。部分试剂在活性炭处理后用 121 ℃ 高压釜处理 20-90 分钟,也成为无 β-葡聚糖的状态。以下操作全部在无 β-葡聚糖的状态下进行。

实施例 1

10 GBP 的精制及理化性质

(1)GBP 的精制

- 将日本产的鲎(*Tachypleus tridentatus*)血淋巴液 2.5L 于 4 ℃、1,500rpm 下离心 10 分钟,在其沉淀部分(血球变形细胞)约 50g 中加入 0.02M Tris-盐酸缓冲液(pH8.0)500ml,用匀浆器(Politron R RT 10(商品名),Kinematica 公司制)破碎均匀并取出,于 4 ℃、10,000 × G 下冷却离心 30 分钟,得到上清液(溶胞产物)450ml。

- 将其全量添加在用 0.02M Tris-盐酸缓冲液(pH 8.0)平衡过的硫酸右旋糖酐-琼脂糖 CL-6B 柱(5 × 23cm)上,用同样的缓冲液 1.0 L 洗涤后,用含有 0.2M NaCl 的 0.02M Tris-盐酸缓冲液(pH 8.0)1.5L 洗脱,再用含 0.45M NaCl 的 0.02M Tris-盐酸缓冲液(pH 8.0)1.5L 洗脱。这些洗脱液以每 10ml 一份加以收集。按照 Obayashi 等的方法(*Clin. Chim. Acta*, 149, 55-65(1985))测定这样洗脱的流份的活性。即プロクロテイン酶(Pro CE)、B 因子、C 因子和 G 因子的活性测定采用 405nm 的吸光度,凝固蛋白原(coagulogen)的活性测定采用 360nm 的吸光度。GBP 的活性用后面叙述的方法(参照实施例 2-(4)实验 3,用水代替 GBP 作对照)进行测定。结果见图 1。GBP 存在于 0.45M NaCl 洗脱部分,对 β-葡聚糖引起的 G 因子的活化有很强的抑制作用。将此洗脱部分收集在茄形烧瓶中,冷冻干燥。

- 将此冷冻干燥物溶于 25ml 水,全量添加在以 0.05M Tris-盐酸缓冲液(pH 8.0,含有 0.5M NaCl、4mM CaCl<sub>2</sub>)平衡过的 Sephacryl S-300 HR 柱(2.2 × 95 cm)上,以 18ml/小时的流速洗脱,每流份 2.5ml。GBP 活性用上述方法测定,将抑制 G 因子活化能力 50% 的量作为 100 单位。以下 GBP 活性的单位有时用 U 表示。按照 Obayashi 等的方法(*Clin. Chim. Acta*, 149, 55-65(1985)),测定 545nm 处的吸光度,求出 B 因子和 C 因子的活性。结果见图 2。如图 2 所示,可见 GBP 的活性在第 70-88 流份(47.5ml)。

- 将此洗脱部分冷冻干燥,用 8ml 水溶解,再次添加在用与上面同样的缓冲液平衡过的 Sephacryl S-300 HR 柱(1.4 × 95 cm)上,以 4.5ml/小时的流速洗脱,每 0.93ml 为一流份,测定 GBP 活性。其结果见图 3。如图 3 所示,可见 GBP 的活

性在第 81-84 流份。

5 这样所得的 GBP 在用硫酸右旋糖酐-琼脂糖进行亲和层析(图 1)后,用 Sephacryl S-300 HR 凝胶过滤,可几乎完全分离 B 因子和 C 因子(图 2)。再通过用同样的载体的层析可得到高纯度的精制品。表 1 表示此精制步骤的比活性。溶胞产物(粗提取液)中存在大量 G 因子,因此不可能测定 GBP 的活性,进行这样的层析,与 G 因子相互分离,才能知道 GBP 活性和 GBP 的存在。该 GBP 也可从其它种的蜃(如 Limulus polyphemus、Tachypleus gigas、Carcinoscorpius rotundicauda)的溶胞产物同样地进行制备。

表 1

纯化步骤	总蛋白质 (mg)	总活性 (u)	比活性 (u/mg)	得率 (%)	纯化比 (倍)
粗提取液	4502.0				
硫酸葡聚糖- Sephacryl S-300 (第 1 次)	60.8	$2.13 \times 10^5$	$3.5 \times 10^3$	100	1
Sephacryl S-300 (第 2 次)	11.9	$6.31 \times 10^4$	$5.3 \times 10^3$	29.6	1.5
Sephacryl S-300 (第 2 次)	3.5	$5.95 \times 10^4$	$1.7 \times 10^4$	27.9	4.9

10

(2)GBP 的理化性质

(1)分子量的测定

15 使用上述 Sephacryl S-300HR 色谱柱(1.4 × 95cm, 柱床体积( $V_t$ ) = 146.2ml)进行色谱分析,算出具有 GBP 活性的流分的洗出位置( $V_e$ ),通过以高分子量凝胶过滤试剂盒(Pharmacia 公司产品)的各蛋白质的表观分配系数( $(V_e - V_0) / (V_t - V_0)$ , 以  $K_{av}$  表示)相对于分子量的对数而绘出的校正曲线,推定 GBP 的分子量。其结果,如图 4 所示,该 GBP 活性流分中的 GBP 的分子量约为 580 千道尔顿。

20 此外,将由上述方法纯化得到的 GBP( $1.9 \times 10^3$  units/ml, 蛋白质浓度: 245.2 $\mu$ g/ml)0.3ml 加至截留分子量 5,000 的离心过滤管(0.3ml 容量,ウルトラフリー(Ultrafree) C3LCC, Millipore 公司产品)中,在 4℃ 离心(4500 × g, 50 分钟)后,往浓缩液(0.03ml)中加水,使其达到 0.3ml,然后再在同样条件下离心过滤浓缩至变成 0.03ml。对该试样按 Laemmli 的方法〔Nature, 227, 680-685(1970)〕,在用 2-巯基乙醇还原的条件下进行 SDS-PAGE,用考马斯亮蓝 R-250 染色,测定分子量,其结果,如图 5 所示,测得分子量为约 170 千道尔顿。

25 使用的标记是下述 6 种蛋白质(Boehringer Mannheim GmbH 公司产品):  $\alpha_2$ -巨球蛋白(170k)、 $\beta$ -半乳糖苷酶(116.4k)、果糖-6-磷酸激酶(85.2k)、谷氨酸脱氢

酶(55.6k)、醛缩酶(39.2k)、磷酸丙糖异构酶(26.6k)。

### (2)等电点的测定

再使用 PhastGel IEF gradient 3-9 和 PhastSystem™(均为 Pharmacia 公司产品), 按常法(In Gel Electrophoresis and Isoelectric Focusing of Proteins 236-240 (1984))进行等电点电泳。将电泳后的凝胶用考马斯亮蓝 R-250 染色。其结果见图 6。如图 6 所示, 为单一的条带, 等电点(pI)约为 9.2。

使用的标记为下述 10 种蛋白质(Pharmacia 公司产品): 胰蛋白酶原(pI9.30)、兵豆凝集素碱性侧条带(pI8.65)、兵豆凝集素中间条带(pI8.45)、兵豆凝集素酸性侧条带(pI8.15)、肌红蛋白碱性侧条带(pI7.35)、肌红蛋白酸性侧条带(pI6.85)、牛碳酸酐酶 B(pI5.85)、β-乳球蛋白(pI5.20)、大豆胰蛋白酶抑制剂(pI4.55)和淀粉葡萄糖苷酶(pI3.50)。

### (3)GBP 的 N 末端氨基酸部分序列的测定

用 Matsudaira 的方法〔*J. Biol. Chem.*, 262, 10035-10038 (1987)〕测定 GBP 的 N 末端氨基酸序列。以每泳道(lane)0.01ml 的量将 GBP( $1.7 \times 10^4$ units/ml)加载在 7.5 % 的平板凝胶上, 用 30mA 的恒电流进行泳动, 切出泳动后的凝胶, 用水洗涤 5 分钟后, 在转移缓冲液〔0.01M 3-(环己基氨基)-1-丙磺酸(CAPS)/10 % 甲醇〕中浸渍 15 分钟。然后, 用トランスプロットングサンドイヂ transploting sandwich 装置于 4℃ 经 18 小时(20V, 恒电压)将蛋白质从凝胶复制至聚偏氟乙烯(PVDF)膜(Bio-Rad Laboratories 产品)上。取出 PVDF 膜, 水洗 5 分钟, 用 0.1 % 考马斯亮蓝 R-250/50 % 甲醇染色 5 分钟后, 反复水洗 3 次, 在洁净室干燥 1 小时后在 -35℃ 保存。用消毒切刀切割目的条带, 按常法用气相氨基酸序列分析仪(岛津制作所产品, PPSQ-10)进行分析。

其结果, 得到下列 N 末端的氨基酸序列。

Lys-Ser-Gly-Phe-Ile-Leu-Thr-Ala-Pro-Lys-Ser-Leu-Thr-Leu-Gly-Arg-Asn-  
Asn-Arg-Leu-Asn-Leu-His-Leu-Phe-Asp-Ile-Asn-Thr-Asn-Gly-Phe-Xaa-Arg-Ile-  
Gly-Val-Lys-Asp-Gln-Asn-Asp-Phe-Asn-

(式中, Xaa 表示自然界中存在的任何氨基酸)

### (4)GBP 的紫外吸收光谱和物性

测定该流分的紫外吸收光谱, 如图 7 所示, 得到在 280nm 具有最大吸收的特征光谱。将该流分冷冻干燥, 得到白色粉末。该白色粉末易溶于水。

## 实施例 2

### GBP 作用的研究

#### (1)对 G 因子的抑制活性

使用由实施例 1 制得的纯 GBP(10、20、40、60、80μg/ml)各 0.05ml, 按上述方法求出对 G 因子的抑制活性(GBP 活性)。结果见图 8。图 8 表明, GBP

活性存在对用量的依从关系。

### (2)加热处理对 GBP 活性的影响

将由实施例 1 制得的纯 GBP 在 100 ℃ 处理 3 分钟后离心(1000 × g, 15 分钟), 用水将所得上清液稀释 10 倍, 取出 0.05ml, 按上述方法比较处理前后对 G 因子的抑制活性的变化。结果见表 2。

表 2

方法	总活性(U)	残存活性(%)
对照(未处理)	42.8	100
加热(100 ℃, 3 分钟)	4.1	9.6

表 2 表明, GBP 是不耐热 (对热不稳定性)的蛋白质。

### (3)GBP 的结合特异性

往 GBP(1.6 × 10<sup>4</sup>units/ml)0.05ml 中加入直链(1 → 3)-β-D-葡聚糖和支链(1 → 3)-β-D-葡聚糖, 按上述方法测定 GBP 活性和残存活性, 算出抑制率。结果见表 3。这里使用的直链(1 → 3)-β-D-葡聚糖和支链(1 → 3)-β-D-葡聚糖的供应商如下所示。

直链(1 → 3)-β-D-葡聚糖:

茯苓糖(Pachyman)(按 *Agric. Biol. Chem.*, 32, 1261-1269 (1968)的方法制备)  
凝胶多糖(Curdlan)(来源于 *Alcaligenes Faecalis var. myxogenes*, 日本和光纯药工业株式会社销售)

羧甲基凝胶多糖(Carboxymethylated Curdlan; CMPS)(按 *Phytochemistry*, 1, 175-188 (1962)的方法制备, 取代度 0.63)。

眼虫糖(Paramylon)(来源于 *Euglena gracillis*, 按 *Biochim. Biophys. Acta.*, 44, 161-163(1960)的方法制备)

支链(1 → 3)-β-D-葡聚糖:

(1 → 6), (1 → 3)-β-D-葡聚糖: 裂褶菌素(Schizophyllan)(Sonifilan; 日本科研制药株式会社销售)、香菇多糖(Lentinan)(日本味之素株式会社销售)、昆布多糖(Laminaran)(来源于 *Laminaria digitata*, Sigma 公司销售)、昆布多糖(Laminaran)(来源于 *Eisenia araborea*, Nakarai Task 株式会社销售)

(1 → 4), (1 → 3)-β-D-葡聚糖: 地衣多糖(Lichenan)(来源于 *Cetraria islandica*, Sigma 公司销售)、大麦β-D-葡聚糖(Barley β-D-glucan)(Sigma 公司产品)

将昆布多糖、羧甲基凝胶多糖、裂褶菌素(2 × 10<sup>-6</sup>g/ml 溶液)、香菇多糖(2 × 10<sup>-8</sup>g/ml 溶液)、地衣多糖、大麦β-D-葡聚糖分别溶解在蒸馏水中, 将茯苓糖、凝胶多糖分别溶解在 0.1M 氢氧化钠水溶液中, 将眼虫糖、裂褶菌素(1 × 10<sup>-9</sup>g/ml 溶液)、香菇多糖(2 × 10<sup>-10</sup>g/ml 溶液)分别溶解在 0.3M 氢氧化钠水溶液中, 用蒸

馏水或 0.01M 氢氧化钠水溶液适当稀释后加以使用。

表 3

葡聚糖	结合形式	数均分子量 (kD)	葡聚糖浓度 (g/ml)	抑制率 (%)
茯苓糖	(1 → 3)-β-D	80	$5 \times 10^{-11}$ (0.1M NaOH)	99.0
凝胶多糖	(1 → 3)-β-D	> 136	$5 \times 10^{-11}$ (0.1M NaOH)	98.5
羧甲基凝胶多糖	(1 → 3)-β-D	> 95	$5 \times 10^{-11}$ (DW)	99.2
眼虫糖	(1 → 3)-β-D	> 118	$2.5 \times 10^{-11}$ (0.3M NaOH)	99.2
昆布多糖 来源于 ( <i>Laminaria digitata</i> )	(1 → 6), (1 → 3)-β-D	5.85	$1 \times 10^{-7}$ (DW)	95.8
来源于 ( <i>Eisenia araborea</i> )	(1 → 6), (1 → 3)-β-D	16.8	$1 \times 10^{-7}$ (DW)	95.2
裂褶菌素	(1 → 6), (1 → 3)-β-D	76.8	$1 \times 10^{-9}$ (0.3M NaOH)	63.6
	(1 → 6), (1 → 3)-β-D		$2 \times 10^{-6}$ (DW)	60.6
香菇多糖	(1 → 6), (1 → 3)-β-D	94.7	$2 \times 10^{-10}$ (0.3M NaOH)	59.4
	(1 → 6), (1 → 3)-β-D		$2 \times 10^{-8}$ (DW)	57.5
地衣多糖	(1 → 4), (1 → 3)-β-D	22	$7.5 \times 10^{-7}$ (DW)	40.7
大麦β-D-葡聚糖	(1 → 4), (1 → 3)-β-D	> 23.1	$1.25 \times 10^{-7}$ (DW)	36.2

DW、NaOH 表示样品的溶解液。DW 表示蒸馏水，NaOH 表示氢氧化钠水溶液。

- 5 此外，往 GBP( $1.6 \times 10^2$  units/ml) 0.025ml 中加入β-葡聚糖以外的各种多糖的样品 0.025ml，在 37℃ 加温 10 分钟后，加入 100pg/ml 的茯苓糖 0.025ml，再在 37℃ 放置 10 分钟，然后，加入 G 因子(0.04ml)、酶(Pro CE)(0.02ml)、1M MgSO<sub>4</sub>(0.01ml)、2M Tris-盐酸缓冲液(pH8.0)(0.01ml)、5mM Boc-Leu-Gly-Arg-

pNA(0.02ml), 在 37 °C 反应 20 分钟, 测定残存活性, 算出抑制率. 结果见表 4. 使用的多糖的供应商如下所示.

(1 → 4)-β-D-葡聚糖: 羧甲基纤维素(Carboxymethyl cellulose)(钠盐, ナカラ イテスク株式会社销售)

5 (1 → 6)-β-D-葡聚糖: 石耳多糖(Gyrophoran)(来源于 *Gyrophora esculenta*, 按 *J.Ferment. Technol.*, 50, 388-396(1971)的方法制备)

(1 → 6)-α-D-葡聚糖: 右旋糖酐(Dextran)(来源于 *Leuconostoc* sp, 分子量 - 40,000, 生化学工业株式会社销售)

10 (1 → 4), (1 → 6)-α-D-葡聚糖: 聚麦芽三糖(Pullulan)(来源于 *Pullularia pullulans*, 日本林原生物化学研究所销售)

(1 → 2), (1 → 3), (1 → 6)-α-D-甘露聚糖: 酵母α-D-甘露聚糖(Sigma 公司销售)

(1 → 3)-β-D-木聚糖(Xylan): (木糖的聚糖甙, 来源于 *Caulerpa brachypus*, 按 *Nature*, 187, 82-83 (1960)的方法制备)

15 将羧甲基纤维素、右旋糖酐和聚麦芽三糖溶解在蒸馏水中, 将石耳多糖溶解在 0.1M 氢氧化钠水溶液中, 将α-D-甘露聚糖和β-D-木聚糖溶解在 0.3M 氢氧化钠水溶液中, 分别用蒸馏水适当稀释后加以使用.

表 4

葡聚糖	结合形式	葡聚糖浓度 (g/ml)	抑制率 (%)
羧甲基纤维素	(1 → 4)-β-D	$1 \times 10^{-7}$ (DW)	1.5
石耳多糖	(1 → 6)-β-D	$2 \times 10^{-11}$ (0.1M NaOH)	1.1
右旋糖酐	(1 → 6)-α-D	$1 \times 10^{-7}$ (DW)	1.0
聚麦芽三糖	(1 → 4), (1 → 6)-α-D	$1 \times 10^{-7}$ (DW)	1.0
酵母α-D-甘露聚糖	(1 → 2), (1 → 3), (1 → 6)-α-D	$1 \times 10^{-8}$ (0.3M NaOH)	1.2
木聚糖	(1 → 3)-β-D	$1 \times 10^{-7}$ (0.3M NaOH)	1.1

20 DW、NaOH 表示样品的溶解液. DW 表示蒸馏水, NaOH 表示氢氧化钠水溶液.

如表 3 所示, 除直链(1 → 3)-β-D-葡聚糖以外, 发现对(1 → 6), (1 → 3)-β-

D-和(1 → 4), (1 → 3)-β-D-葡聚糖之类的支链(1 → 3)-β-D-葡聚糖以及羧甲基化(1 → 3)-β-D-葡聚糖也有抑制活性。

此外, 对具有(1 → 3)-β-D-葡聚糖以外结构的多糖, 如上所述, 预先与 GBP 混合加温后, 再加入(1 → 3)-β-D-葡聚糖, 根据(1 → 3)-β-D-葡聚糖结合能力即对 G 因子的抑制活性受到何种程度的抑制而加以判断。表 4 表明, 完全未发现对羧甲基纤维素((1 → 4)-β-D-), 石耳多糖((1 → 6)-β-D-), 右旋糖酐((1 → 6)-α-D-), 聚麦芽三糖((1 → 4), (1 → 6)-α-D-), 酵母α-甘露聚糖((1 → 2), (1 → 3), (1 → 6)-α-D-), 木聚糖(木糖的聚糖式, (1 → 3)-β-D-)的抑制活性。

#### (4)关于 GBP 对 G 因子的抑制作用的详细研究

10 实验 1: 将 G 因子 0.04ml、酶(Pro CE)0.02ml、1M MgSO<sub>4</sub> 0.01ml、2M Tris-盐酸缓冲液(pH8.0)0.01ml 和 50pg/ml 的茯苓糖(以下有时称 BG)0.05ml 混合, 在 37 °C 反应 20 分钟后, 分别加入 GBP(1.6 × 10<sup>4</sup>units/ml) 0.05ml 和 5mM 底物 (Boc-Leu-Gly-Arg-pNA; 以下有时称 Sub)0.02ml, 在 37 °C 反应 3 分钟, 按已知方法(Tamura, H 等, *Thromb. Res.*, 27, 51-57 (1982))用重氮偶合剂使游离的 p-硝基苯胺发色, 测定 545nm 的吸光度。

15 实验 2: 往 G 因子 0.04ml 中加入 GBP0.05ml, 在 37 °C 加温 10 分钟后, 分别加入 50pg/ml BG 0.05ml、Pro CE 0.02ml、1M MgSO<sub>4</sub> 0.01ml、2M Tris-盐酸缓冲液(pH8.0)0.01ml 和 5mM Sub 0.02ml, 在 37 °C 反应 20 分钟, 与(1)同样, 用重氮偶合剂发色后, 测定 545nm 的吸光度。

20 实验 3: 往 BG 0.05ml 中加入 GBP0.05ml, 在 37 °C 加温 10 分钟后, 分别加入 G 因子 0.04ml、Pro CE 0.02ml、1M MgSO<sub>4</sub> 0.01ml、2M Tris-盐酸缓冲液(pH8.0)0.01ml 和 5mM Sub 0.02ml, 在 37 °C 反应 20 分钟, 与(1)同样, 用重氮偶合剂发色后, 测定 545nm 的吸光度。

25 实验 4: 往 G 因子 0.04ml、Pro CE 0.02ml、50pg/ml BG 0.05ml、1M MgSO<sub>4</sub> 0.01ml、2M Tris-盐酸缓冲液(pH8.0)0.01ml 和 5mM Sub 0.02ml 的混合液中加入 GBP0.05ml, 在 37 °C 反应 20 分钟, 与(1)同样, 用重氮偶合剂使游离的 p-硝基苯胺发色后, 测定 545nm 的吸光度。

同时, 在(1)~(4)中, 分别用水代替 GBP 进行实验, 以作为对照, 算出 G 因子活化的抑制率(%). 结果见表 5。

30

表 5

实验	步 骤	抑制率(%)
1	FG+BG+Pro CE(37 °C, 20 分钟) → +GBP+Sub(37 °C, 3 分钟)	0
2	FG+GBP(37 °C, 10 分钟) → +BG+Pro CE+Sub(37 °C, 20 分钟)	37.5
3	BG+GBP(37 °C, 10 分钟) → +FG+Pro CE+Sub(37 °C, 20 分钟)	100
4	FG+ BG+GBP + Pro CE+Sub(37 °C, 20 分钟)	33.4

FG 表示 G 因子, BG 表示茯苓糖((1 → 3)-β-D-葡聚糖), Pro CE 表示酶, GBP 表示硫酸右旋糖酐-Sepharose CL-6B 的 0.45M NaCl 洗脱流分(含本发明的蛋白质), Sub 表示底物( Boc-Leu-Gly-Arg-pNA).

5 表 5 显示, 预先将本发明的蛋白质(GBP)与(1 → 3)-β-D-葡聚糖混合、加温(37 °C), 可显著提高对 G 因子活化的抑制能力. 因此, 这与在迄今已知的小分子的水溶性聚糖甙(G 因子活化抑制剂; 参见国际专利公开公报 WO90/02951)如昆布多糖低聚糖、凝胶多糖甲酸水解物中发现的 G 因子活化抑制剂和 G 因子的直接结合而产生的与(1 → 3)-β-D-葡聚糖(BG)的拮抗抑制不同, 被认为是(1 → 3)-β-D-葡聚糖与 GBP 的直接结合即由外源凝集素样相互作用而产生的 G 因子活化抑制。  
10 本发明的蛋白质(GBP)直接结合在(1 → 3)-β-D-葡聚糖上的观点得到支持。

通过上述研究, 可以认为, GBP 在以(1 → 3)-β-D-葡聚糖为触发剂的 G 因子系统的控制、调节以及体内的(1 → 3)-β-D-葡聚糖的输送以及真菌增殖的抑制等方面具有重要作用。

### 15 实施例 3

#### 对 GBP 的抗血清的制备及纯化

将 400μg/ml 的纯 GBP 水溶液 500μl 和等容量的弗氏完全佐剂(ヤトロン株式会社产品)混合, 然后皮下注射于 2 只兔子(JW, 雄性, 体重 1.8kg), 每 2 周重复同样的致敏操作, 重复 4 次后, 作为追加免疫, 静脉注射 100μg/ml 的 GBP 水溶液 0.2ml。在末次注射 1 周后, 取出兔子全部的血, 接着, 在室温放置 1  
20 小时, 并在 4 °C 放置一晚, 然后以 2000rpm 离心分离 5 分钟, 将所得血清 60ml 在 56 °C 加热处理 30 分钟, 进行灭活后, 添加防腐剂叠氮化钠 0.06g(0.1 % (W/V)), 得到抗血清。用オクタロニ-双重扩散法测定抗血清的抗体效价。

再按常法, 用硫酸铵对该血清进行盐析和用蛋白质 A 进行亲和色谱精制,  
25 得到纯免疫球蛋白。

### 实施例 4

#### 使用 GBP 进行(1 → 3)-β-D-葡聚糖的定量

将纯 GBP 水溶液(400μg/ml)用 0.1M 碳酸氢钠缓冲液(pH9.6)稀释 10<sup>3</sup> 倍, 并将稀释液 50μl 分别滴加在无β-葡聚糖的 96 孔微量培养板(トキシペットプレート, 日本生化学工业株式会社销售)上, 然后在 4 °C 放置 12 小时, 使该 GBP 吸附在培养板的固相上(固定)。吸出该溶液, 用 PBS 缓冲液(以下称 PBS)洗涤 3 次后, 将所有孔用含 5 % 牛血清白蛋白(BSA)的 PBS 封闭, 在 37 °C 加温 2 小时。接着, 用含 0.1 % Tween-20 的 PBS(以下称 PBS-TW)洗涤 3 次, 加入(1 → 3)-β-D-葡聚糖溶液(0.1、1、10、100、1000ng/ml) 100μl, 在 37 °C 反应 2 小时。  
35 然后用 PBS-TW 洗涤 3 次, 加入用生物素标记的 GBP 水溶液(0.2μg/ml)100μl,

- 在 37 ℃ 反应 2 小时后, 加入过氧化物酶(HRP)标记的链霉生物素结合蛋白 (1 $\mu$ g/ml)100 $\mu$ L, 在 37 ℃ 放置 2 小时. 再加入发色底物溶液〔含四甲基联苯胺 10mg 和 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2 $\mu$ l 的 50mM 乙酸缓冲液, pH5.0(10ml)〕 100 $\mu$ l, 在室温下加温 10 分钟后, 加入 2M 硫酸 50 $\mu$ l, 停止反应, 用微量培养板读数器(Well Reader SK601, 日本生化学工业株式会社销售)测定 450nm 的吸光度(对照: 630nm).
- 5 (1 → 3)- $\beta$ -D-葡聚糖的用量依从性(与 GBP 的反应性, 校正曲线)见图 9.

#### 实施例 5

使用 GBP 进行的(1 → 3)- $\beta$ -D-葡聚糖的检出

- 10 将含作为抗原的(1 → 3)- $\beta$ -D-葡聚糖和牛血清白蛋白(BSA)的结合物(按 *Agric. Biol. Chem.*, 54, 1953-1959 (1990)的方法制备)1.5 $\mu$ g 的抗原溶液 100 $\mu$ l 加至无 $\beta$ -葡聚糖的 96 孔微量培养板(トキシベットプレート 96F, 日本生化学工业株式会社销售)的孔中, 在 4 ℃ 放置 12 小时, 使抗原涂布在培养板上. 吸出抗原溶液, 用磷酸缓冲液(PBS)洗涤 3 次后, 将所有孔用含 5 % BSA 的 PBS(以下称封闭溶液)充满, 在 37 ℃ 加温 2 小时. 接着, 除去孔中的封闭溶液, 用含 0.1 % Tween-20 的 PBS(以下简称 PBS-Tween-20)洗涤 3 次, 然后往孔中加入 1 $\mu$ g/ml 的 GBP 水溶液 100 $\mu$ l, 在 37 ℃ 保温 2 小时. 用 PBS-Tween-20 洗涤孔后, 将用 PBS 以 1: 5000、1: 10000 和 1: 50000 的比例稀释过的抗 GBP 血清或正常兔血清加入孔中, 在 37 ℃ 加温 2 小时. 用 PBS-Tween-20 洗涤后, 加入用 PBS 以 1: 1000 的比例稀释过的过氧化物酶标记的羊的抗兔 IgG 血清, 在 37 ℃ 保温 2 小时. 用 PBS-Tween-20 洗涤孔, 然后加入发色底物溶液〔含四甲基联苯胺 10mg 和 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2 $\mu$ l 的 50mmol/L 乙酸缓冲液, pH5.0(10ml)〕 100 $\mu$ l, 在室温下保温 10 分钟. 然后加入 2M 硫酸 50 $\mu$ l, 停止反应, 以 660nm 为对照, 用微量培养板读数器(Well Reader SK601, 日本生化学工业株式会社销售)测定 450nm 的吸光度.
- 20 使用抗 GBP 血清, 如上所述, 以实验证明 GBP 和(1 → 3)- $\beta$ -D-葡聚糖系直接结合.

兔抗 GBP 血清对 GBP 和(1 → 3)- $\beta$ -D-葡聚糖的复合体的反应性的结果见表 6.

表 6

抗血清	抗体的稀释度	450nm 的吸光度
抗 GBP 血清	1: 5000	2.856
	1: 10000	2.632
	1: 50000	0.752
兔血清 (对照)	1: 5000	0.109
	1: 10000	0.074
	1: 50000	0.016

### 实施例 6

#### 使用 GBP 除去(1 → 3)-β-D-葡聚糖

将无(1 → 3)-β-D-葡聚糖的 Sepharose 4B(Pharmacia 公司产品)100ml 移至玻璃滤器(# 2)上, 用 2 升注射用蒸馏水(以下称 DW)抽吸洗涤后, 放入 1 升容量的烧杯中, 加入蒸馏水 200ml. 边用磁力搅拌器搅拌, 边用 10N 氢氧化钠调至 pH11-12, 然后, 缓慢加入溶解在蒸馏水 500ml 中的溴化氰(CNBr)25g, 当 pH 不变化时即中止反应. 用玻璃滤器过滤该经 CNBr 活化的 Sepharose 4B, 并用冷水 2 升、0.1M 碳酸氢钠 1 升洗涤. 往该活化的 Sepharose 4B 10ml 中加入 GBP 冻干粉末 2mg, 使其浓度为 0.2mg/ml, 在用旋转器(rotator)搅拌的同时, 在 4℃ 处理 24 小时. 反应后, 为使残存的杂质(亚氨碳酸酯类)失活, 在 0.2M Tris-盐酸缓冲液(pH8.0)中放置 5 小时. 往固定了 GBP 的 Sepharose 4B 0.5g 中加入(1 → 3)-β-D-葡聚糖溶液(0.1、1、10、100μg/ml), 用复式搅拌器(multishaker)连续搅拌 8 小时. 然后, 以 3000rpm 离心 10 分钟后, 往上清液 50μl 中加入(1 → 3)-β-D-葡聚糖特异性的合成底物试剂(グルスペシ - , 日本生化学工业株式会社销售)50μl, 测定溶液中残存的(1 → 3)-β-D-葡聚糖量. 以在无载体的条件下进行同样操作时为 100%, 算出使用本载体的(1 → 3)-β-D-葡聚糖除去率. 用固定了 GBP 的载体进行的(1 → 3)-β-D-葡聚糖除去试验, 其结果见表 7.

表 7

(1 → 3)-β-D-葡聚糖(μg/ml)		除去率 (%)
处理前	处理后	
0.1	0	100
1	0	100
10	0.01	99.9
100	0.08	99.9

20

#### 工业上应用的可能性

如上所述, 由于本发明的(1 → 3)-β-D-葡聚糖结合性蛋白质及识别其的抗体可特异性地检测出试样中的内毒素、(1 → 3)-β-D-葡聚糖等或高效率地除去样品中的(1 → 3)-β-D-葡聚糖, 因此, 可用作这些物质的检测试剂或除去剂. 所以, 可用于检测试样或样品中的这些物质以及使它们无毒化.

25

此外, 本发明的(1 → 3)-β-D-葡聚糖结合性蛋白质具有与真菌细胞壁的主要结构多糖(1 → 3)-β-D-葡聚糖结合, 抑制真菌增殖的可能性, 可望开发成医药, 尤其是抗真菌药.

## 序 列 表

序列号: 1

5 序列的长度: 44

序列的类型: 氨基酸

拓扑学: 直链状

序列的种类: 蛋白质

来源: 鲎血球

10 序列

Lys	Ser	Gly	Phe	Ile	Leu	Thr	Ala	Pro	Lys
1				5					10
Ser	Leu	Thr	Leu	Gly	Arg	Asn	Asn	Arg	Leu
				15					20
Asn	Leu	His	Leu	Phe	Asp	Ile	Asn	Thr	Asn
				25					30
Gly	Phe	Xaa	Arg	Ile	Gly	Val	Lys	Asp	Gln
				35					40
Asn	Asp	Phe	Asn						

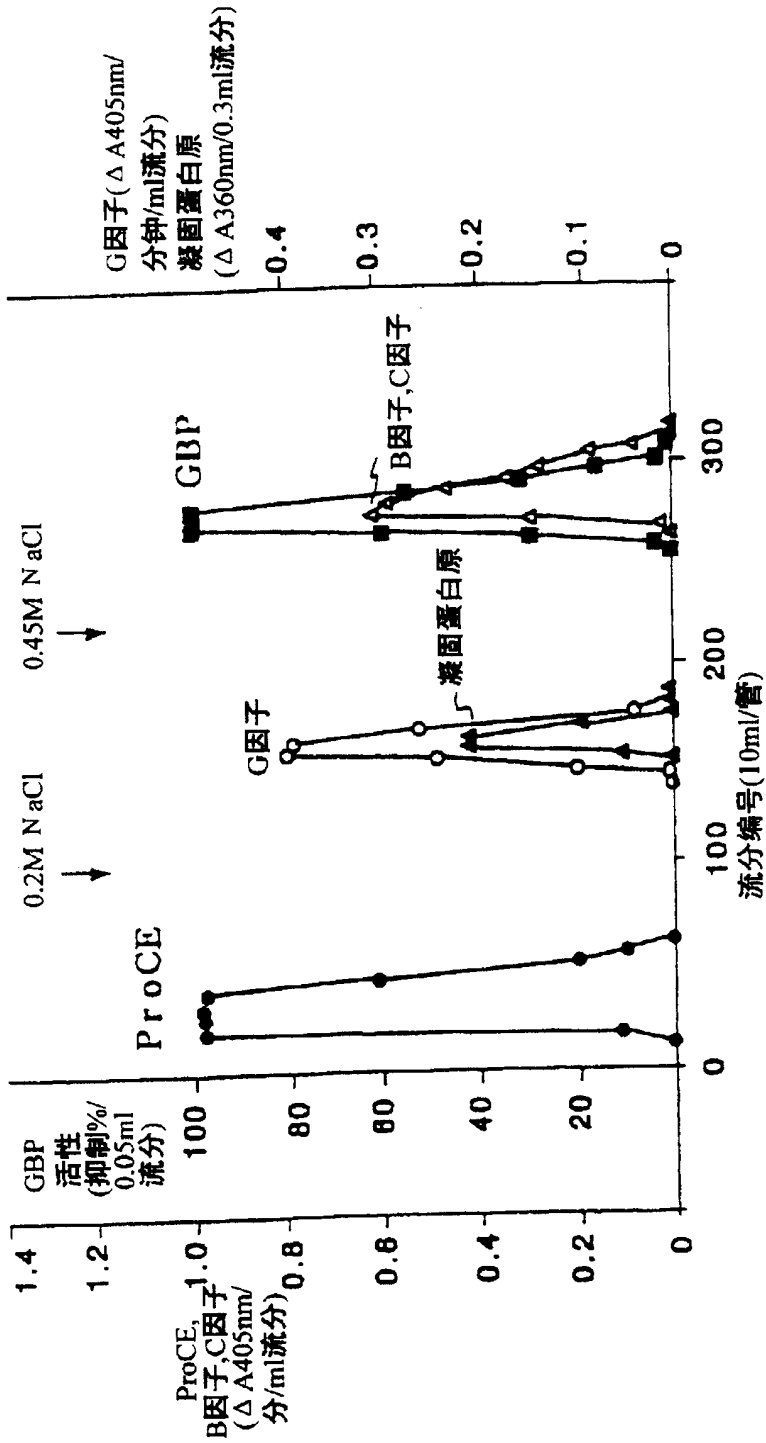


图 1

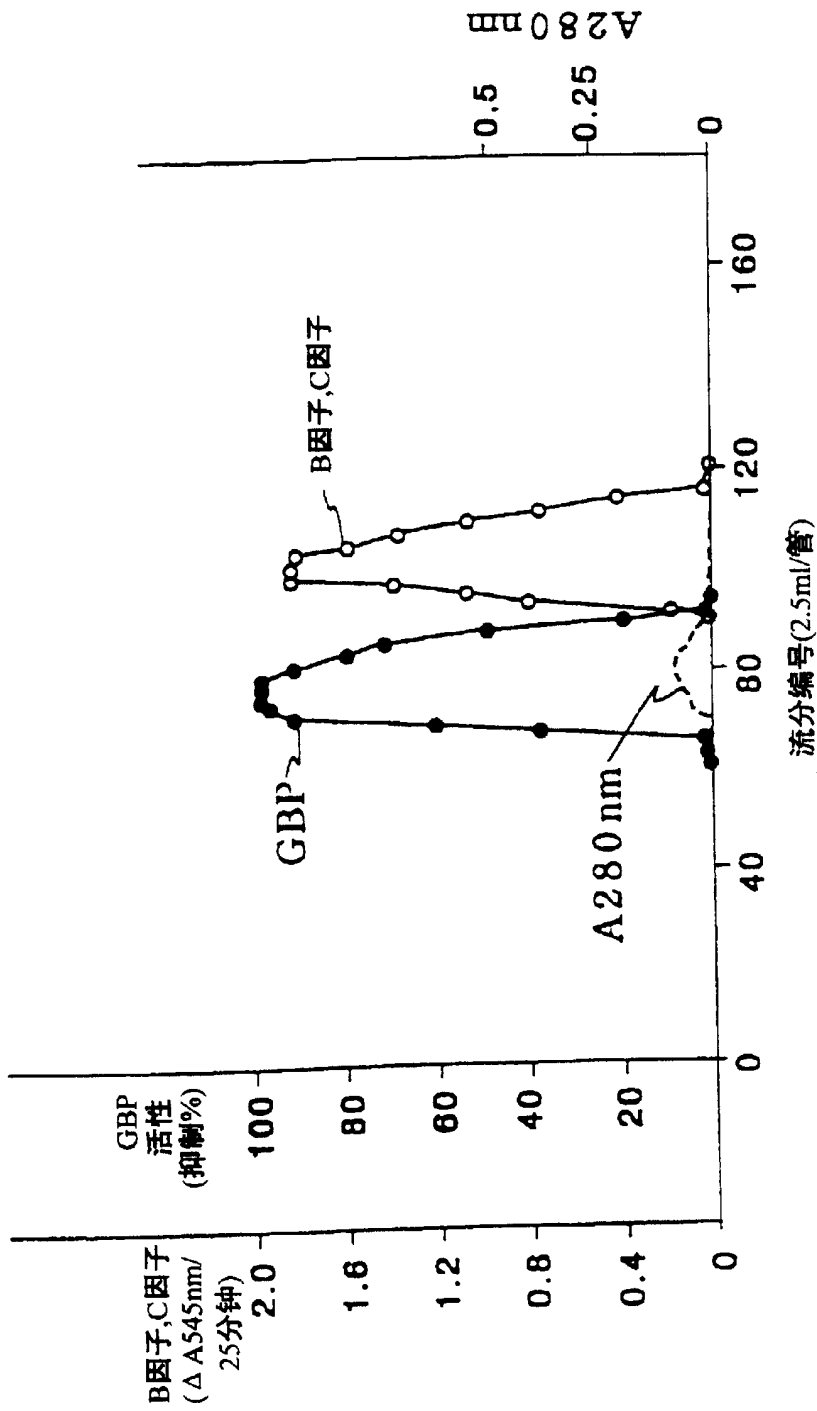


图 2

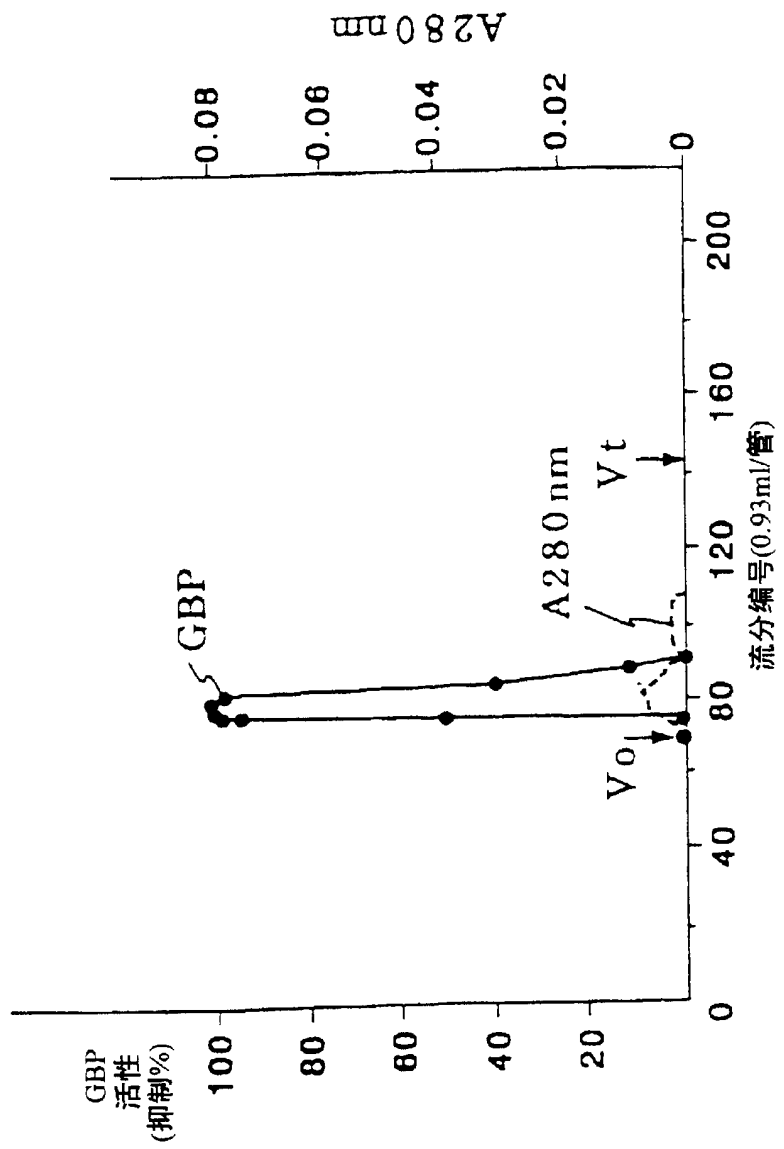


图 3

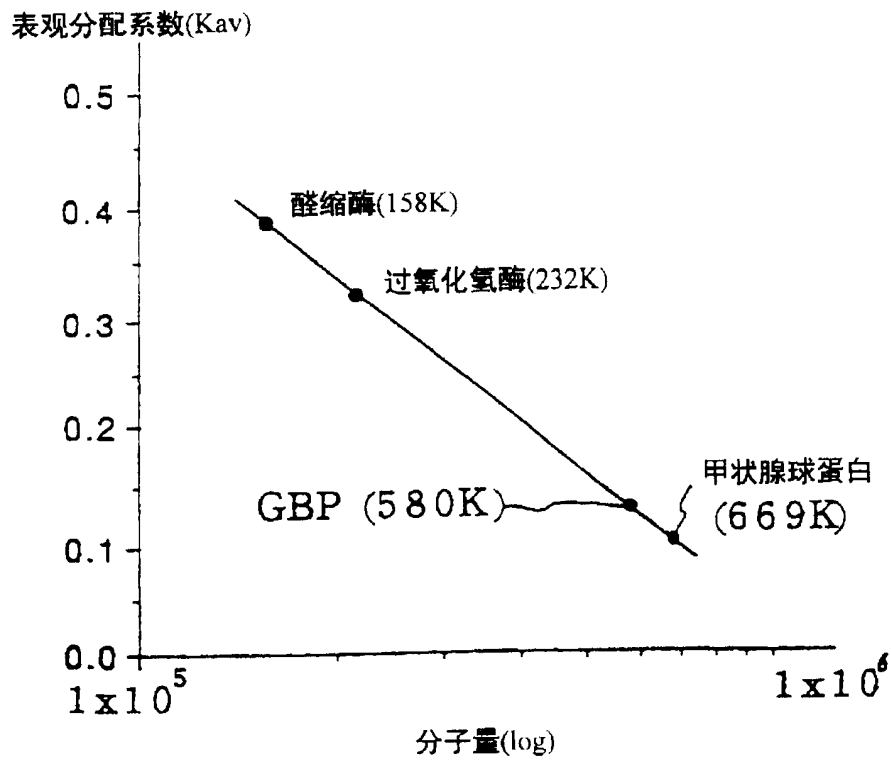


图 4

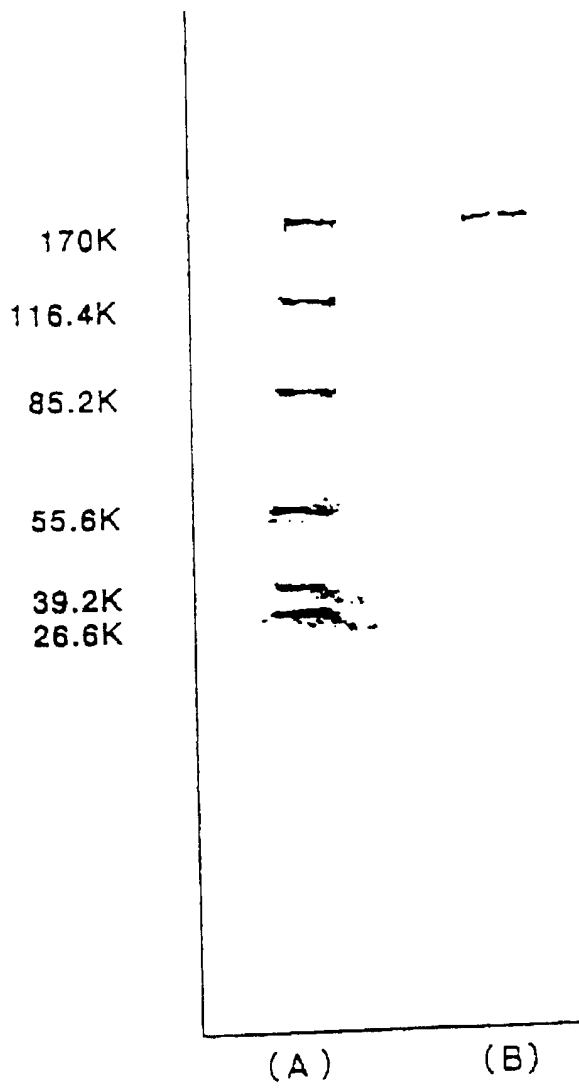


图 5

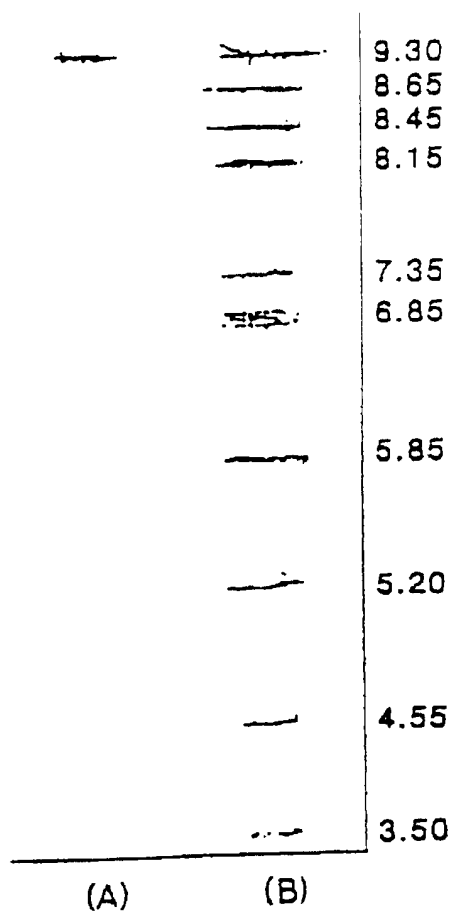


图 6

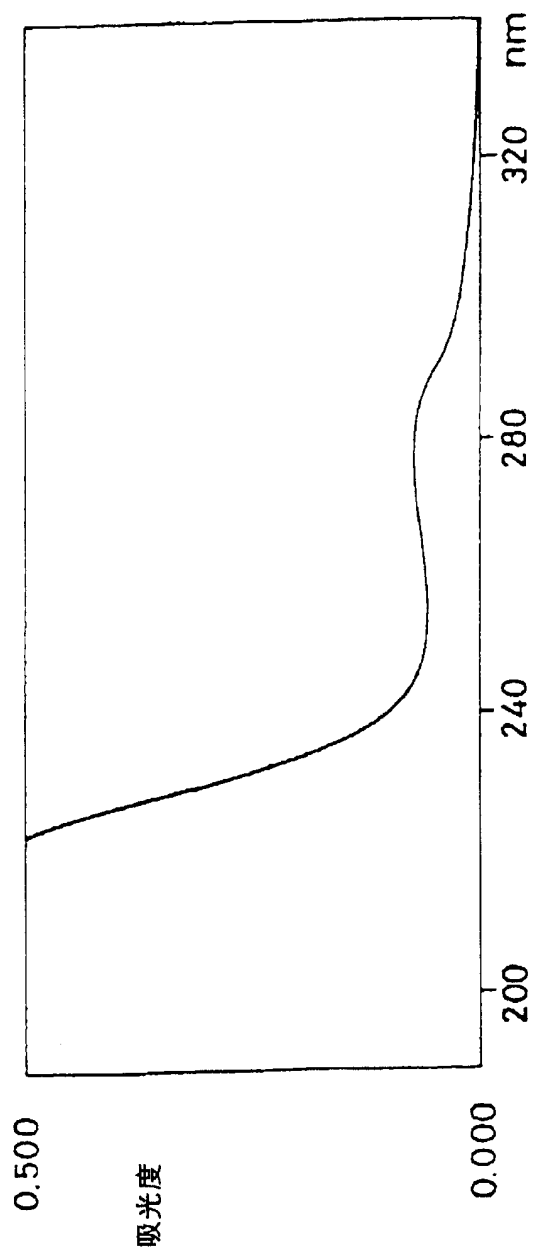


图 7

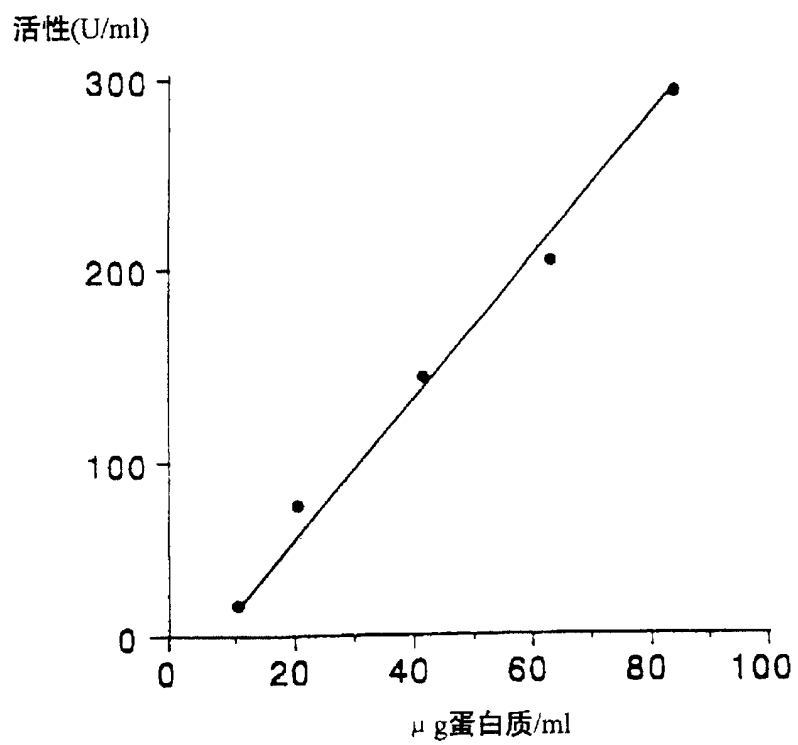


图 8

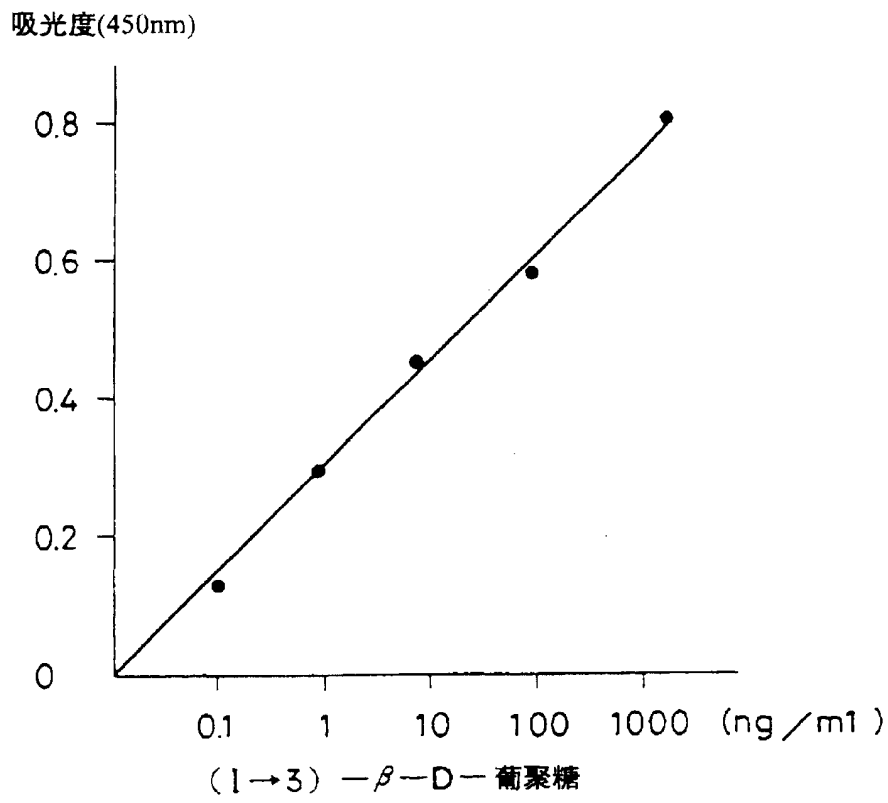


图 9