

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
C12Q 1/34 C12Q 1/37

[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 94192191.3

[45] 授权公告日 2002 年 12 月 18 日

[11] 授权公告号 CN 1096501C

[22] 申请日 1994.4.13 [21] 申请号 94192191.3
[86] 国际申请 PCT/US94/04098 1994.4.13
[87] 国际公布 WO94/24306 英 1994.10.27
[85] 进入国家阶段日期 1995.11.21
[73] 专利权人 石蕊概念股份有限公司
地址 美国加利福尼亚州
[72] 发明人 P·J·劳伦斯 A·肖和瑞
T·J·安德烈亚森
[56] 参考文献
EP244932A 1988. 6. 1 C08B37/00
EP269362A 1988. 6. 1 G01N33/72
US4859581A 1989. 8.22 C12P1/00
审查员 刘菊芳

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所
代理人 林蕴和

权利要求书 4 页 说明书 95 页 附图 2 页

[54] 发明名称 报告酶释放技术：分析天冬氨酸蛋白酶及其它水解酶活性是否存在的方法

[57] 摘要

本发明公开了一种在样品中分析是否存在具有酶活性的水解酶的方法。尤其提供了一种通过分析在样品中是否存在具有酶活性的天冬氨酸蛋白酶而检测念珠菌病的方法。在这些方法中,将样品与固相载体接触,该固相载体具有固定在其上的报告酶,其固定方式使得一旦受水解酶的作用便会释放出报告酶;然后将与固相载体接触过的样品与指示剂混合,该指示剂会因报告酶的作用而产生可检测的变化;通过观察指示剂是否发生可检测的变化,所发生的可检测的变化便是在样品中存在具有酶活性的水解酶的标志。还提供了有关的测试设备。

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

1. 一种分析在样品中是否存在具有酶活性的水解酶的方法，其特征在于，该方法包括：

(a) 将样品与固相载体接触，该固相载体具有固定在其上的报告酶，其固定方式使得一旦受水解酶的作用便会释放出报告酶；

(b) 将与所述固相载体接触过的样品与指示剂混合，该指示剂会因报告酶的作用而产生可检测的变化；和

(c) 观察指示剂是否发生可检测的变化，可检测的变化便是在样品中存在具有酶活性的水解酶的标志，

其中，所述的报告酶是过氧化物酶。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，该水解酶是选自下组的蛋白酶：天冬氨酸蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、硫醇蛋白酶、金属蛋白酶、酸性蛋白酶、和碱性蛋白酶。

3. 如权利要求 2 所述的方法，其特征在于，该水解酶是天冬氨酸蛋白酶。

4. 一种分析在样品中是否存在具有酶活性的水解酶的方法，其特征在于，该方法包括：

将样品置于一个具有第一和第二固相载体的设备中，其中第一固相载体具有固定在其上的报告酶，其固定方式使得一旦受水解酶的作用便会释放出报告酶，第二固相载体并不与第一固相载体接触而且具有固定在其上的指示剂，该指示剂会因报告酶的作用而产生可检测的变化，样品置于设备的方式使得样品与第一和第二固相载体接触，从而任何被样品中存在的水解酶释放出的报告酶能够通过样品而扩散到第二固相载体；和

观察指示剂是否发生可检测的变化，可检测的变化便是在样品中存在具有酶活性的水解酶的标志。

5. 一种通过分析在样品中是否存在具有酶活性的天冬氨酸蛋白酶而检测念珠菌病的方法，其特征在于，该方法包括：

(a) 将样品与固相载体接触，该固相载体具有固定在其上的报告酶，其固定方式使得一旦受天冬氨酸蛋白酶的作用便会释放出报告酶；

(b) 将与固相载体接触过的样品与指示剂混合，该指示剂会因报告酶的作用而产生可检测的变化；和

(c) 观察指示剂是否发生可检测的变化，可检测的变化便是在样品中存在具有酶活性的天冬氨酸蛋白酶即具有念珠菌病的标志。

6. 一种通过分析在样品中是否存在具有酶活性的硫醇蛋白酶而检测阴道毛滴虫方法，其特征在于，该方法包括：

(a) 将样品与固相载体接触，该固相载体具有固定在其上的报告酶，其固定方式使得一旦受到具有酶活性的硫醇蛋白酶的作用便会释放出报告酶；

(b) 将与固相载体接触过的样品与指示剂混合，该指示剂会因报告酶的作用而产生可检测的变化；和

(c) 观察指示剂是否发生可检测的变化，可检测的变化便是在样品中存在具有酶活性的硫醇蛋白酶即具有阴道毛滴虫的标志。

7. 一种分析样品中是否存在靶水解酶的抑制剂的方法，其特征在于，该方法包括：

(a) 将样品和靶水解酶置于一个具有第一和第二固相载体的设备中，其中第一固相载体具有固定在其上的报告酶，其固定方式使得一旦受水解酶的作用便会释放出报告酶，第二固相载体并不与第一固相载体接触而且具有固定在其上的指示剂，该指示剂会因报告酶的作用而产生可检测的变化，样品和靶水解酶置于设备的方式使得样品和靶水解酶都与第一和第二固相载体接触，从而从第一固相载体上释放出的报告酶能够通过样品而扩散到第二固相载体；

(b) 观察指示剂是否发生可检测的变化，发生可检测的变化便表示在样品中不存在靶水解酶的抑制剂。

8. 一种用于分析样品中是否存在具有酶活性的水解酶的测试设备，其特征在于，该设备包括：

至少部分由具有内对表面的、相对的、第一和第二壁界定的容器，内对表面之间有一间隙，第一壁、第二壁或两壁都由透光材料构成；

固定在位于第一和第二壁之一的内对表面上的固相载体上的报告酶，其固定方式使得一旦受到水解酶的作用便会释放出报告酶；

位于第一和第二壁之一的内对表面上的指示剂，指示剂是受到报告酶的作用时会产生可检测变化的物质；

和容器上用于引入样品的开口。

9. 一种通过分析样品中是否存在具有酶活性的天冬氨酸蛋白酶而检测念珠菌病的测试设备，其特征在于，该设备包括：

至少部分由具有内对表面的、相对的、第一和第二壁界定的容器，内对表面之间有一间隙，第一壁、第二壁或两壁都由透光材料构成；

固定在位于第一和第二壁之一的内对表面上的固相载体上的报告酶，其固定方式使得一旦受到天冬氨酸蛋白酶的作用便会释放出报告酶；

位于第一和第二壁之一的内对表面上的指示剂，指示剂是受到报告酶的作用时会产生可检测变化的物质；和

容器上用于引入样品的开口。

10. 一种用于分析样品中是否存在靶水解酶的抑制剂的测试设备，其特征在于，该设备包括：

至少部分由具有内对表面的、相对的、第一和第二壁界定的容器，内对表面之间有一间隙，第一壁、第二壁或两壁都由透光材料构

成;

固定在该第一和第二壁之一的内对表面上的靶水解酶,该靶水解酶会因抑制剂的存在而失活;

固定在位于第一和第二壁之一的内对表面上的固相载体上的报告酶,其固定方式使得一旦受到靶水解酶的作用便会释放出报告酶,如果该靶水解酶不会因抑制剂的存在而失活;

位于第一和第二壁之一的内对表面上的指示剂,指示剂是受到报告酶的作用时会产生可检测变化的物质;

和容器上用于引入样品的开口。

报告酶释放技术:分析天冬氨酸蛋白酶及 其它水解酶活性是否存在的方法

发明领域

本发明涉及用于分析在样品中是否存在水解酶的方法。具体地,本发明涉及一种通过分析在样品中是否存在具有酶活性的天冬氨酸蛋白酶而检测念珠菌病的方法。

发明背景

白色念珠菌(*Candida albicans*)和其它的念珠菌品种造成了大量常见的、医学上的重感染。例如,在患免疫缺陷症的病人中,口腔念珠菌病是非常常见的。此外,外阴阴道念珠菌病是妇产科中最常见的病症中的一种。据估计,所有成年妇女中约 3/4 至少受到过一次这种疾病的侵袭(De Bernardis, et al., J. Clin. Microbiol. 27(11):2598-2603(1989))。因为其发生面广,所以已进行了广泛的研究以弄清念珠菌病的病因。

研究已经表明,白色念珠菌和其它的念珠菌品种与人类的念珠菌病在病因上存在联系,现在一般认为,念珠菌病主要是由于白色念珠菌的存在而引起的。此外,现在已经有相当多的证据表明,天冬氨酸蛋白酶或(可以互换的)酸性蛋白酶起着白色念珠菌的毒性因子的作用。已知白色念珠菌的纯培养物在严格限定的条件下生长时会分泌一种天冬氨酸蛋白酶。类似地,已知从患外阴阴道炎的妇女分离得到的白色念珠菌的纯菌株,当它们随后在被特别限定的培养基中生长时,会释放这种酶。

在所有分离出外阴阴道白色念珠菌的妇女中,已经用免疫法检测到白色念珠菌酸性蛋白酶抗原(即天冬氨酸蛋白酶抗原)。(De Bernardis, et al., Abstract No. F-91 In: Abstracts of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology, (Anaheim, CA 1990))。但是,在具有外阴阴道念珠菌病症的妇女中,白色念珠菌酸性蛋白酶抗原的浓度比在无病症的携带者中高得多。在患念珠菌病的妇女中该抗原在阴道液中浓度约为 $176 \pm 15.2 \text{ ng/ml}$,而在无白色念珠菌分离物的妇女(即无念珠菌病症的妇女)中该抗原在阴道液中的浓度小于 2 ng/ml 。无病症的白色念珠菌携带者具有中等的抗原水平($94 \pm 18.5 \text{ ng/ml}$)。这些发现有力地表明,酸性蛋白酶(即天冬氨酸蛋白酶)与外阴阴道念珠菌病的发生有关。但是已知白色念珠菌天冬氨酸蛋白酶在体温下是不稳定的。此外,用免疫法检测天冬氨酸蛋白酶抗原不能表明该酶是否是以酶活性的形式存在。

白色念珠菌酸性蛋白酶是一种胞外天冬氨酸蛋白酶。天冬氨酸蛋白酶是蛋白酶中的一大类。它们含有活性所需的一个或多个关键的天冬氨酸残基。白色念珠菌的天冬氨酸蛋白酶具有广谱的蛋白质底物特异性,底物包括,例如,白蛋白、血红蛋白、酪蛋白、免疫球蛋白A和许多其它蛋白质。该酶在酸性条件下(即 $\text{pH} 2.5-5.5$)的性能最佳,并且在高 pH (即在 $\text{pH} 7.5$)时会快速地失活。白色念珠菌天冬氨酸蛋白酶能够被胃酶抑素强烈抑制,但是不被硫醇试剂、螯合剂或丝氨酸蛋白酶抑制剂所抑制。

许多制药公司和领导学者正在研究用于潜在的药物用途的天冬氨酸蛋白酶的抑制剂。但是,他们的努力遇到很多困难,因为缺乏一种针对天冬氨酸蛋白酶的合适的酶分析法。尽管已有用某些丝氨酸、硫醇、金属、酸性及碱性蛋白酶和多肽酶的简单的比色分析法,但是没有针对天冬氨酸蛋白酶的比色分析法。这类特殊的酶的底物特异性需要存在若干个憎水的氨基酸。这种特性大大妨碍了对简单的、

合成的显色底物的研究,因为作为天冬氨酸蛋白酶的底物的憎水的氨基酸极难溶于水中。结果,天冬氨酸蛋白酶的显色底物仍无商业化产品,并且难以合成和定性,而且水溶性差。这些限制因素交织在一起的结果是,用这些显色底物确定的酶活性极低,因此针对天冬氨酸蛋白酶的比色分析法是很不灵敏的。同样,对用于天冬氨酸蛋白酶的荧光底物已有描述,但是,它们也只有有限的用途。首先,如前所述,这类特殊酶的底物特性要求存在若干个憎水的氨基酸,造成底物几乎不溶于水。其次,在可以达到的这些底物的低浓度下,荧光底物的水解非常缓慢,因而使荧光分析很费时。此外,很多生物样品含有荧光物质,从而干扰天冬氨酸蛋白酶的荧光分析。

由于缺乏合适的检测天冬氨酸蛋白酶的比色分析法或荧光分析法,所以,常用紫外线(UV)分光光度分析法分析这类特殊酶是否存在。在典型的UV光谱分析法中,天冬氨酸蛋白酶被加入一种蛋白质溶液(如,血红蛋白或白蛋白),然后混合物在30—37℃保温0.5—4小时。保温后,将冷的浓三氯乙酸(TCA)加入冷却的保温混合物中以沉淀未消化的蛋白质,将吸收紫外线的肽留在溶液中。最后,沉淀的、未消化的蛋白质通过冷冻离心约1小时来沉淀,吸出上清液,测定其在280纳米的光密度以反映蛋白质的水解量。尽管该分析法能用于检测天冬氨酸蛋白酶,但是费时费力。

因此,迄今还没有开发出能够检测具有酶活性的天冬氨酸蛋白酶的存在与否的方便的、简单的、现场的分析法。本发明涉及一种克服了已有技术中的问题和缺点的、分析具有酶活性的天冬氨酸蛋白酶是否存在的方法。此外,本发明的方法还能用于分析是否存在其它已知的水解酶。

发明概述

目前已经发现,具有酶活性的白色念珠菌天冬氨酸蛋白酶存在

于患有外阴阴道念珠菌病的妇女的阴道液中。还发现,在样品中是否存在具有酶活性的天冬氨酸蛋白酶可以作为检测和诊断念珠菌病的标志。因此,目前开发出了一种通过分析在样品中是否存在具有酶活性的天冬氨酸蛋白酶而检测念珠菌病的方法。

在这种方法中,让样品(如阴道液)与一固相载体接触。与样品接触的固相载体具有一种固定在其上面的报告酶(即产生信号的酶)。报告酶以这样的方式固定在固相载体上:如果具有酶活性的天冬氨酸蛋白酶确实存在于样品中,则其(指报告酶)一旦受到具有酶活性的天冬氨酸蛋白酶的作用就会从固相载体上释放出来。在与固相载体接触之后,样品将被与指示剂混合。指示剂可以是任何化学物质,它会因报告酶的作用而产生可见的或可检测的变化(如颜色的变化)。如果与样品接触后,指示剂发生了可检测的变化,则在样品中存在具有酶活性的天冬氨酸蛋白酶,因而可以说具有念珠菌病。

在本发明之前,还没有快速而直接的测定手段用于分析是否存在具有酶活性的天冬氨酸蛋白酶或更主要地,是否存在念珠菌病。虽然分光光度、荧光和免疫分析法都已经被用于分析天冬氨酸蛋白酶活性的存在与否,但是这些分析法费时、费力并且对于未经训练的、现场的诊所的工作人员来使用而言是不合适的。

同样,可以通过在限定的培养基中培养样本或者显微镜检湿计数法来检测白色念珠菌。培养法非常费时(即约需 48 小时),而且两种方法都需要昂贵的设备和广泛的培训。与以前使用的测定分析法相反,本发明中提出的用于分析是否存在具有酶活性的天冬氨酸蛋白酶及念珠菌病的方法是快速、准确、省钱和便于使用的。

作为天冬氨酸蛋白酶分析法基础的报告酶释放技术还可以用于分析是否存在任一具有活性的水解酶,这些水解酶包括(但并不限于此):蛋白酶、肽酶、脂酶、核酸酶、同型寡糖酶、异型寡糖酶、同型聚多糖酶、异型聚多糖酶、磷酸酯酶、硫酸酯酶、神经氨酸酶和酯酶。因此

目前已开发出了用于在样品中分析是否存在具有酶活性的水解酶的方法。

在这些方法中,让样品与一固相载体接触。与样品接触的固相载体具有一种固定在其上面的报告酶(即产生信号的酶)。报告酶以这样的方式固定在固相载体上:如果具有酶活性的水解酶确实存在于样品中,则其(报告酶)一旦受到水解酶的作用就会从固相载体上释放出来。在与固相载体接触之后,样品将被与指示剂混合。指示剂可以是任何化学物质,它会因报告酶的作用而产生可检测的变化,通常是颜色的变化。当指示剂发生可检测的变化时便表明在样品中存在具有酶活性的水解酶。相反,指示剂不发生可检测的变化则表明在样品中不存在具有酶活性的水解酶。与用于分析是否存在具有酶活性的天冬氨酸蛋白酶进而存在念珠菌病的分析法相同,本发明提出的用于分析在样品中是否存在具有酶活性的水解酶的方法是快速、准确、省钱和便于使用的。

作为上述分析法基础的报告酶释放技术还可以用于分析是否存在任一已知的水解酶的抑制剂,这些抑制剂包括(但并不限于此):蛋白酶、肽酶、脂酶、核酸酶、同型寡糖酶、异型寡糖酶、同型聚多糖酶、异型聚多糖酶、磷酸酯酶、硫酸酯酶、神经氨酸酶和酯酶的抑制剂。因此目前已开发出了用于在样品中分析是否存在水解酶抑制剂的方法。

在这种方法中,让样品与靶水解酶和固相载体接触。与样品接触的固相载体具有一种固定在其上面的报告酶(即产生信号的酶)。报告酶以这样的方式固定在固相载体上:只要靶水解酶抑制的存在而失活。则报告酶一旦受到靶水解酶的作用就会从固相载体上释放出来。在与靶水解酶和报告酶接触之后,样品将被与指示剂混合。指示剂可以是任何化学物质,如果报告酶被靶水解酶从固相载体上释放出来,它会因报告酶的作用而产生可检测的变化,通常是颜色的变

化。当样品中不存在靶水解酶抑制剂时,靶水解酶便使报告酶从固相载体上释放出来,从而使指示剂产生可检测的变化。相反,如果当样品中存在靶水解酶抑制剂时,靶水解酶便被抑制,报告酶便不会从固相载体上释放出来,从而导致指示剂也不会产生可检测的变化或反应。与以上所描述的方法相同,本发明中提出的用于分析在样品中是否存在水解酶抑制剂的方法是快速、准确、省钱和便于使用的。

除了用于分析是否存在具有酶活性的天冬氨酸蛋白酶和其它水解酶活性的方法之外,还开发出一种干的、自含式的测试设备,它通过分析是否存在具有酶活性的天冬氨酸蛋白酶而检测样品是否存在念珠菌病。此外,还开发出一种干的、自含式的、用于分析样品是否存在具有酶活性的水解酶的设备。这些测试设备将固定在固相载体上的报告酶、指示剂、和处于干燥形式的一种或多种其它试剂结合在具有内腔的层板内。该腔在注入样品之前是空的。为方便起见,层板的各部件和板中各种具有功能的化学药品的位置将以相互参照的方式进行描述,其中的板是处于水平位置因为这是使用过程中板所采取的最常见的位置。当板处于这种位置时,尤其对于本发明的优选的具有薄而平的结构,样品将通过位于板上方的开口被注入内腔。在构成板的各层中,处于这种位置的最上面的层(样品通过该层而引入)是被称为板的上层,该上层的下表面构成了内腔的上表面。同样,板的最下面的层被称为板的底层,该底层的上表面构成了内腔的下表面。沿着这些上层和底层的四周的薄边被称为板的侧边。而沿着上表面和下表面的边缘的、腔的薄的侧面末端被称为腔的侧壁。在同一水平板上互相相邻的任一表面的区域被称为是水平相邻的,而直接位于其它层上的以构成平行的水平板的层被称为是垂直相邻的。

板的上层、底层或两层都由透光的、最好是透明的材料构成。固定于固相载体的报告酶、指示剂、和测试所需的其它组份和试剂被安置在腔中的一个或多个薄层中,或者作为腔的上表面的涂层,或者作

为腔的下表面的涂层、或者作为腔的上下表面的涂层。指示剂可以是任何化学物质,当被检测的具有酶活性的水解酶存在时,报告酶将从固相载体上释放出来,而指示剂也会与报告酶作用而产生可检测的变化,通常是颜色的变化。含有指示剂的薄层可以在腔的上表面或下表面。测试所需的一种或多种试剂也可以包含在与指示剂相同的薄层,或者在不同的薄层,位于相同的表面或相对的表面。在本发明的某些优选实施例中,指示剂含于直接位于透光壁下方薄层中,而固定在固相载体的报告酶位于相对的壁上的薄层中。

位于薄层上的试剂应尽量包括测试过程中所需的试剂,使得为了完成测试而所需的行动只是添加样品和少量其它试剂如显色剂。然而,在特别优选的例子中,薄层中含有除了样品之外的所有试剂,因此在测试过程中只需添加样品即可。

在与样品接触之前所有的薄层都是固相层,并且含有指示剂的薄层最好是由不溶于测试所针对的液态样品的组合物构成,从而在测试过程中指示剂留在薄层中。对于水性或水溶性的介质中的样品,优选的指示剂薄层是不溶于水的指示剂,或是包在不溶于水的基质中的指示剂。当保存在薄的、浓缩的薄层中的指示剂直接位于透光壁下方时,在短时间内,会产生可以通过透光壁的可检测的指示剂的变化,并且灵敏度高且快速。

本发明可以用于测试来自大量不同的来源的测试样品中的各种水解酶。而且,本发明可以用于测试各种水解酶抑制剂。测试可以涉及单个反应或一系列的通过积累使指示剂发生可检测的变化的反应,试剂和反应的数目和种类因此在不同的测试中可以有所不同,这取决于需要检测哪一种水解酶。在某些情况下,当预先涂覆的反应物被分布在腔的上下表面之间,并且被一个间隙所隔开(该间隙被测试样品填满时,它们才不再被隔开。)时,可以获得最佳测试结果。在其它情况下,反应物可以置于位于腔的上或下表面的一个共同的薄层

或者两个或多个不同的但垂直相邻的薄层,同样不会影响测试的可靠性。但是在所有情况下,薄层的结构和排列都应使只有当腔中注入测试样品时,才发生积累的可检测的指示剂变化的反应,还应使当指示剂发生变化时,它至少被浓缩于,更佳是局限于,紧挨着透光壁的薄层。

在本发明的优选例子中,测试设备包括一个嵌入式的阳性对照、一个嵌入式的阴性对照、或者包括两种对照。这些对照都因加入一个样品而激活。这些对照的激活与测试的进行同时发生,而且代表对照和测试结果的可检测的指示信号(如颜色变化或缺乏颜色变化)都通过简单地向设备添加样品而获得,并且可以通过透光壁而检测。对照在设备上占据的位置是与测试区域水平相邻的,并且在设备的上或下表面(优选上表面)附有指示说明以供鉴别对照并将其与测试区分开。对照本身通常还包括其它含有试剂或其它适当的种类的薄层。这些试剂或其它适当的种类或者诱导指示剂发生可检测的变化或者防止发生变化,并且只有当测试样品存在时才发挥作用而且与测试样品中是否存在可疑的水解酶无关。同样,在不同的测试之间,对照及通过何种化学机制发挥作用的选择,以及到底是将这些薄层置于与指示剂相同的表面还是置于相对的表面,这些选择都可能有所不同。

本发明的更优选的例子还具有其它的特性以增强测试的性能。对于水基样品,在紧邻被样品填满的间隙的薄层中掺入表面活性剂会促进样品与薄层的湿润化并使腔被快速而均匀地填满。表面活性剂可以是薄层中的单功能的成分,也可以和测试试剂一起位于某一薄层中。更佳地,间隙的两侧都有带表面活性剂的薄层。在设备中还包括样品加入孔以便直接将样品插入腔。更佳的例子还在腔上包括与样品加入孔隔开的样品一个或多个排气孔,从而方便将样品注入腔。

通过下面的描述,本发明的其它特征、目的和优点以及优选例子

将变得更明显。

附图的简单描述

图1是本发明的示意性的测试设备的透视图。

图2是图1中所示的测试设备的剖面的侧视图。

发明详述及最佳实施例

在本发明的一个方面,提供了一种分析在样品中是否存在具有酶活性的水解酶的方法。该方法包括:(a)将样品与固相载体接触,该固相载体具有固定在其上的报告酶,其固定方式使得一旦受水解酶的作用便会释放出报告酶;(b)将与固相载体接触过的样品与指示剂混合,该指示剂会因报告酶的作用而产生可检测的变化;和(c)观察指示剂是否发生可检测的变化,可检测的变化可以做为在样品中是否存在具有酶活性的水解酶的标志。

本文所用的术语“水解酶”指催化水解反应的酶。本发明方法可以用于分析任何已知的水解酶的存在。这些水解酶包括(但并不限于此):蛋白酶、肽酶、脂酶、核酸酶、同型寡糖酶、异型寡糖酶、同型聚多糖酶、异型聚多糖酶、磷酸酯酶、硫酸酯酶、神经氨酸酶和酯酶。在一个优选例中,本发明方法可以用于分析蛋白酶的存在,这些蛋白酶包括(但并不限于此):天冬氨酸蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、硫醇蛋白酶、金属蛋白酶、酸性蛋白酶、和碱性蛋白酶。在另一个优选例中,本发明方法可以用于分析同型寡糖酶或异型寡糖酶或同型聚多糖酶或异型聚多糖酶的存在,其中包括(但并不限于此):几丁质酶、淀粉酶、纤维素酶和溶菌酶。

本文所用的术语“报告酶”或“标记酶”(可以互换使用)指产生信号的酶,即其活性会导致一种可检测的变化的酶。这种报告酶包括(但并不限于此):过氧化物酶、磷酸酯酶、氧化还原酶、脱氢酶、转移

酶、异构酶、激酶、还原酶、脱氨酶、过氧化氢酶、脲酶和葡萄糖苷酸酶。在选择用于本发明的方法中的报告酶的过程中,至关重要的是报告酶不能被样品的任何试剂所失活,包括不能被样品中存在的任何水解酶活性的失活性的水解作用所失活。选择合适的报告酶或标记酶对于本领域的技术人员而言是很显而易见的。目前优选的报告酶是过氧化物酶,如辣根过氧化物酶。

报告酶被固定在固相载体上,即不溶性的聚合物材料、无机或有机基质、凝胶、集料、沉淀物或树脂,其固定方式使得一旦受待分析的水解酶的作用便会释放出报告酶。优选的固相载体包括(但并不限于此):纤维素、琼脂糖、葡聚糖、聚丙烯酸酯、聚丙烯酰胺、或其衍生物、几丁质、琼脂糖(sepharose)、环氧乙烷丙烯酸珠和聚二醛、淀粉、胶原蛋白、角蛋白、弹性蛋白、牛皮粉末、细菌细胞壁粘肽或其片段、尼龙、聚对苯二甲酸乙二醇酯、聚碳酸酯和可控多孔玻璃。将报告酶固定在固相载体可以用本领域技术人员已知和了解的常规方法和程序进行。

报告酶可以直接附着在固相载体上,在这种情况下,不溶性的载体可直接作为水解酶的底物。例如,当待分析的水解酶是几丁质酶时,报告酶或标记酶(如辣根过氧化物酶)可以直接附着在不溶性的几丁质上。当存在几丁质酶时,会从固相载体上释放出辣根过氧化物酶。同样,当待分析的水解酶是纤维素酶时,报告酶如辣根过氧化物酶可以直接附着在纤维素上。当存在水解纤维素酶时,会从固相载体上释放出辣根过氧化物酶。最后,当待分析的水解酶是溶菌酶时,报告酶如辣根过氧化物酶可以直接附着在细胞壁粘肽上。当存在水解溶菌酶时,会从固相载体上释放出辣根过氧化物酶。

或者,报告酶可以通过使用连接分子固定于固相载体上,这种连接分子是待检测的水解酶的可水解的底物。这种连接分子包括(但并不限于此):蛋白质、碳水化合物、脂类、肽、酯和核酸。用于将报告酶

连接于固相载体的具体的连接分子取决于待检测的水解酶的种类，而在任一情况下的筛选对于本领域的技术人员而言应该是很明显的。

本文所用的术语“指示剂”指当具有酶活性的水解酶存在于样品中时，因产生的反应或积累反应而发生可检测的变化的任何种类的化学药品。产生的可检测的变化是在样品中存在具有酶活性的水解酶的标志。

优选的指示剂是指当受到被待检测的具有酶活性的水解酶从固相载体上释放出的报告酶或标记酶作用时发生变化的视觉指示剂，尤其是显色指示剂即那些视觉变化是颜色的变化(其中包括在原来无色的材料中形成颜色)的指示剂。或者，报告酶一旦因水解酶的作用而从固相载体上释放出来，便能催化形成荧光信号、磷光信号、生物发光信号、化学发光信号或电化学信号。此外，报告酶也可以产生其它视觉上的或可检测的信号如凝块、凝集、沉淀或澄清带。在这些情况下，指示剂可以是报告酶或标记酶为了产生所需的可检测的变化而需要的化学物质或反应底物。

大量具有类似效果的显色指示剂(即色原)和其它种类可以在辣根过氧化物酶被用作报告酶时作为视觉指示剂来使用。本发明的优选的显色指示剂包括一种过氧化物和一种色原，其中包括(但并不限于此)：愈创木脂、2-2'-连氨基-双(3-乙基-噻唑啉-6-磺酸)、四甲基联苯胺、苯酚、4-氨基安替比林，和 4,5-二羟基萘-2,7-二磺酸。特别优选的显色指示剂由过氧化物和愈创木脂构成，该色原在还原状态时是无色的而在氧化状态是深蓝色的。最佳地，在使用之前通过溶剂萃取来纯化愈创木脂。对于任一给定的报告酶的最合适的显色指示剂将取决于报告酶能催化或引发的反应，并且在任一情况下的筛选对于本领域的技术人员应该是很明显的。

如果视觉指示剂是显色指示剂，那么可以采用液态显色系统或

固态显色系统。如果对于过氧化物酶使用液态显色系统时,这样的系统可以包括一种溶剂、一种过氧化物、和一种当存在过氧化物酶如辣根过氧化物酶时能够被过氧化物氧化的色原。或者,如果使用固态显色系统,这样的系统可以包括一种过氧化物、一种当存在过氧化物酶时能够被过氧化物氧化的色原、以及一种已经将色原浸渍或固化于其上并干燥的固相载体。在该系统中,色原能被浸渍在吸水纸或载体上比如 Hemocult® 片,或者色原也可以以薄层的形式沉积在塑料或其它材料的薄片上。在后面一种方式中,色原可以以含有聚合物材料(如羟基丙基纤维素,乙基纤维素等)的溶液形式涂成薄层。如果色原本身是水溶性的色原,则可以将其包在一种不溶于水的材料基质中。或者,当色原本身是不溶于水的时候,可以用其在有机溶剂中的溶液或与一种水溶性或水不溶性的聚合物的混合物进行施涂,形成薄层。

在用于检测过氧化物酶的固态色原系统中,可以以固体形式提供过氧化物(如过氧化钛),也可以在原位提供过氧化物。例如,过氧化氢可以用葡萄糖、环境中的氧气以及葡萄糖氧化酶在原位产生。或者,过氧化氢也可以通过使用一种干的薄层而在原位产生,该薄层是通过沉积过硼酸钠的醇溶液而形成的。在低 pH 条件下,过硼酸钠会自发地释放出过氧化氢。当存在过氧化氢和过氧化物酶(过氧化物酶被水解酶从固相载体上释放出)时,色原会被氧化并且产生视觉上的可检测的颜色变化。所产生的颜色变化标志着样品中存在具有酶活性的水解酶。

本发明的以上方法以及其它方法可以用于在一个样品中同时分析是否存在两种或多种具有活性的水解酶。这样的方法可以采用通过对特定的水解酶敏感的底物连接物而固定于固相载体的两种或多种报告酶的混合物、以及两种或多种对每种报告酶会产生可检测的反应的指示剂和试剂系统。例如,可以使用本发明的方法同时检测蛋

白酶、脂酶和多糖酶的混合物,从而获得某一病原体或疾病的水解图。

此外,本方法的反应条件(如连接分子即桥连分子的选择、固相载体、pH、缓冲液的缓冲能力、缓冲液种类、盐等的选择)可以被改变和调整以便增加水解酶的特异性和将样品中的不同水解酶区分开,这一点对于本领域的技术人员而言是显而易见的。例如,已经知道某些水解酶在低 pH 下具有活性而在高 pH 下被抑制。相反,另一些水解酶在高 pH 下具有活性而在低 pH 下被抑制。通过调节分析时的 pH,人们可以选择性地检测某种特定的水解酶的存在。此外,在本发明方法中可以使用特异的酶抑制剂以提高水解酶的活性和特异性并将其与不同的水解酶区分开,这一点对于熟练的技术人员而言是也显而易见的。

在本发明的另一个方面,提供了一种分析在样品中是否存在具有酶活性的水解酶的方法,该方法包括:将样品置于一个具有第一和第二固相载体的设备中,其中第一固相载体具有固定在其上的报告酶,其固定方式使得一旦受水解酶的作用便会释放出报告酶,第二固相载体并不与第一固相载体接触而且具有固定在其上的指示剂,该指示剂会因报告酶的作用而产生可检测的变化,样品置于设备中的方式使得样品与第一和第二固相载体接触,从而任何被样品中存在的水解酶释放出的报告酶能够通过样品而扩散到第二固相载体;观察指示剂是否发生可检测的变化,所发生的可检测的变化便是在样品中存在具有酶活性的水解酶的标志。

本发明方法可以用于分析任何已知的水解酶的存在。这些水解酶包括(但并不限于此):蛋白酶、肽酶、脂酶、核酸酶、同型寡糖酶、异型寡糖酶、同型聚多糖酶、异型聚多糖酶、磷酸酯酶、硫酸酯酶、神经氨酸酶和酯酶。在一个优选例中,本发明方法可以用于分析蛋白酶的存在,这些蛋白酶包括(但并不限于此):天冬氨酸蛋白酶、丝氨酸蛋

白酶、硫醇蛋白酶、金属蛋白酶、酸性蛋白酶、和碱性蛋白酶。

在该方法中使用的报告酶或标记酶可以是任何产生信号并且不被样品中的任何试剂失活(包括不能被样品中存在的任何水解酶活性的失活性的水解作用所失活)的酶。这种报告酶包括(但并不限于此):过氧化物酶、磷酸酯酶、氧化还原酶、脱氢酶、转移酶、异构酶、激酶、还原酶、脱氨酶、过氧化氢酶、脲酶和葡萄糖苷酸酶。目前优选的报告酶是过氧化物酶,如辣根过氧化物酶。

报告酶被固定在第一固相载体上,即不溶性的基质、凝胶或树脂,其固定方式使得一旦受到待分析的水解酶的作用便会释放出报告酶。报告酶可以直接附着在第一固相载体上,如果固相载体是水解酶的底物。或者,报告酶可以通过使用连接分子固定于第一固相载体上,这种连接分子是待检测的具有酶活性的水解酶的底物。这种连接分子包括(但并不限于此):蛋白质、碳水化合物、脂类、肽、酯和核酸。用于将报告酶连于第一固相载体的特定的连接分子取决于待检测的水解酶的种类,而在任一情况下的选择对于本领域的技术人员而言是很显而易见的。将报告酶固定在第一固相载体的方法可以用本领域技术人员已知和了解的常规方法和程序进行。

在本发明的这种方法中,指示剂被附着于并不与第一固相载体接触的第二固相载体。本发明的优选的第一和第二固相载体包括,(但并不限于此):纤维素、琼脂糖、葡聚糖、聚丙烯酸酯、聚丙烯酰胺、或其衍生物、几丁质、琼脂糖(sepharose)、环氧乙烷丙烯酸珠和聚二醛、淀粉、胶原蛋白、角蛋白、弹性蛋白、牛皮粉末、细菌细胞壁粘肽或其片段、尼龙、聚对苯二甲酸乙二醇酯、聚碳酸酯和可控多孔玻璃。将视觉指示剂固定在第二固相载体的方法可以用本领域技术人员已知和了解的常规方法和程序进行。

指示剂可以是当具有酶活性的水解酶存在于样品中时,因产生的反应或积累反应而发生可检测的变化的任何种类的化学药品。所

产生的可检测的变化是在样品中存在具有酶活性的水解酶的标志。优选的指示剂是当受到被待检测的具有酶活性的水解酶从固相载体上释放出的报告酶或标记酶作用时而发生变化的视觉指示剂,尤其是显色指示剂即那些视觉变化是颜色的变化,其中包括在原来无色的材料中形成颜色的指示剂。

大量具有类似效果的显色指示剂(即色原)和其它种类可以用作视觉指示剂。本发明的用于类似过氧化物酶的报告酶的优选的显色指示剂包括一种过氧化物和一种色原,其中包括,(但并不限于此):愈创木脂、2-2'-连氨基-双(3-乙基-噻唑啉-6-磺酸)、四甲基联苯胺、苯酚、4-氨基安替比林,和 4,5-二羟基萘-2,7-二磺酸。特别优选的显色指示剂由过氧化物和愈创木脂构成,该色原在还原状态是无色的而在氧化状态是深蓝色。对于任一指定的报告酶的最合适的显色指示剂将取决于报告酶能催化或引发的反应,并且在任一情况下的筛选对于本领域的技术人员应该是很明显的。

如果视觉指示剂是用于过氧化物反应的显色指示剂,那么可以采用固态显色系统。这样的系统可以包括一种过氧化物、一种当存在过氧化物酶时能够被过氧化物氧化的色原、以及一种已经将色原浸渍或固化于其上并干燥的固相载体。在该系统中,色原能被浸渍在吸水纸或载体上比如 Hemocult[®] 片,或者色原也可以以薄层的形式沉积在塑料或其它材料的薄片上。在后面一种方式中,色原可以以含有聚合物材料(如羟基丙基纤维素,乙基纤维素等)的溶液形式涂成薄层。如果色原本身是水溶性的色原,则可以将其包于一种不溶于水的材料基质中。或者,当色原本身是不溶于水的时候,可以用其在有机溶剂中的溶液或与一种水溶性或水不溶性的聚合物的混合物进行施涂,形成薄层。

在固态色原系统中,可以以固体形式提供过氧化物(如过氧化钛),也可以在原位提供过氧化物。当存在过氧化物和过氧化物酶(过

氧化物酶被水解酶从固相载体上释放出)时,色原会被氧化并且产生可检测的视觉上的颜色变化。所产生的颜色变化标志着样品中存在具有酶活性的水解酶。

在本发明的这种方法的一个优选的例子中,待检测的水解酶是具有酶活性的天冬氨酸蛋白酶。该方法包括:将样品置于一个具有第一和第二固相载体的设备中,其中第一固相载体是聚丙烯酸酯并且具有通过肌红蛋白分子固定在其上的辣根过氧化物酶,肌红蛋白是天冬氨酸蛋白酶的底物,并不与第一固相载体接触的第二固相载体是纤维素衍生物而且具有固定在其上的过氧化物和愈创木脂,该指示剂是显色底物,当存在过氧化物时会在辣根过氧化物酶的作用下产生颜色变化。样品置于设备的方式使得样品与第一和第二固相载体接触,从而使被样品中存在的具有酶活性的天冬氨酸蛋白酶释放出的辣根过氧化物酶能够通过样品而扩散到第二固相载体;观察愈创木脂是否发生颜色变化,颜色变化便是在样品中存在具有酶活性的天冬氨酸蛋白酶的标志。

如前所述,可以使用特定的反应条件(如对连接分子、固相载体、pH、缓冲液缓冲能力、缓冲液种类、盐份等的选择)和特异的抑制剂来增加天冬氨酸蛋白酶的专一性,这一点对于本领域的技术人员而言是显而易见的。例如,通过在pH约2.5—5.0来分析天冬氨酸蛋白酶,人们可以选择性地在许多丝氨酸蛋白酶、硫醇蛋白酶、金属蛋白酶、和碱性蛋白酶中检测出天冬氨酸蛋白酶酶。此外,通过添加金属蛋白酶、硫醇蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、和酸性蛋白酶或碱性蛋白酶抑制剂,人们可以选择性地鉴定出天冬氨酸蛋白酶。

在本发明的另一个方面,提供了一种通过分析在样品中是否存在具有酶活性的天冬氨酸蛋白酶而检测念珠菌病的方法。该方法包括:(a)将样品与固相载体接触,该固相载体具有固定在其上的报告酶,其固定方式使得一旦受天冬氨酸蛋白酶的作用便会释放出报告

酶；(b)将与固相载体接触过的样品与指示剂混合，该指示剂会因报告酶的作用而产生可检测的变化；和(c)观察指示剂是否发生可检测的变化，所发生的可检测的变化便是在样品中存在具有酶活性的天冬氨酸蛋白酶即具有念珠菌病的标志。

在该方法中使用的报告酶或标记酶可以是任何能够产生信号的酶，即其活性会导致一种可见的或可检测的变化，并且不被样品中的任何试剂失活(包括不能被样品中存在的天冬氨酸蛋白酶或任何其它水解酶的失活性的水解作用所失活)的酶。这种报告酶包括，(但并不限于此)：过氧化物酶、磷酸酯酶、氧化还原酶、脱氢酶、转移酶、异构酶、激酶、还原酶、脱氨酶、过氧化氢酶、脲酶和葡萄糖苷酸酶。选择合适的报告酶或标记酶对于本领域的技术人员而言是很显而易见的。在本发明方法中，目前优选的报告酶是过氧化物酶。尤其，目前优选的报告酶是辣根过氧化物酶，因为辣根过氧化物酶不会轻易地被样品中存在的天冬氨酸蛋白酶或许多其它已知的蛋白酶所水解。

报告酶被固定在固相载体上，即不溶性的基质、凝胶或树脂，其固定方式使得一旦受到天冬氨酸蛋白酶的作用便会释放出报告酶。本发明的固相载体包括，(但并不限于此)：纤维素、琼脂糖、葡聚糖、聚丙烯酸酯、聚丙烯酰胺、或其衍生物、几丁质、琼脂糖(sepharose)、环氧乙烷丙烯酸珠和聚二醛、淀粉、胶原蛋白、角蛋白、弹性蛋白、牛皮粉末、细菌细胞壁粘肽或其片段、尼龙、聚对苯二甲酸乙二醇酯、聚碳酸酯和可控多孔玻璃。在本发明方法中目前优选的固相载体包括几丁质、聚丙烯酸酯、纤维素或其衍生物、和琼脂糖(sepharose)。将报告酶固定在固相载体上的方法可以用本领域技术人员已知和了解的常规方法和程序进行。

报告酶可以通过使用连接分子固定于固相载体上，这种连接分子是具有酶活性的天冬氨酸蛋白酶的可水解的底物。在本发明方法中，这种连接分子包括蛋白质和肽，其中蛋白质是较佳的连接分子。

如果连接分子是蛋白质,则优选的蛋白质包括(但并不限于此):偶氮酪蛋白、酪蛋白、k-酪蛋白、免疫球蛋白、血红蛋白、肌红蛋白、白蛋白、弹性蛋白、角蛋白和胶原蛋白。在本发明方法的优选例子中,连接分子是k-酪蛋白、酪蛋白、血红蛋白、或肌红蛋白。

指示剂可以是当具有酶活性的天冬氨酸蛋白酶存在于样品中时,因产生的反应或积累反应而发生可检测的变化的任何种类的化学药品。产生的可检测的变化是在样品中存在具有酶活性的天冬氨酸蛋白酶的标志,而在样品中存在具有酶活性的天冬氨酸蛋白酶便标志着存在念珠菌病。

优选的指示剂是当受到被待检测的具有酶活性的天冬氨酸蛋白酶从固相载体上释放出的报告酶或标记酶作用时而发生变化的视觉指示剂,尤其是显色指示剂即那些视觉变化是颜色的变化,其中包括在原来无色的材料中形成颜色的指示剂。或者,报告酶可以一旦因天冬氨酸蛋白酶的作用而从固相载体上释放出来,便能催化形成荧光信号、磷光信号、生物发光信号、化学发光信号或电化学信号。另外,报告酶也可以产生其它视觉上的或可检测的信号如凝块、凝集、沉淀或澄清带。在这些情况下,指示剂可以是报告酶为了产生所需的可检测的变化而需要的化学物质或反应底物。

大量具有类似效果的显色指示剂(即色原)和其它种类可以在辣根过氧化物酶被用作报告酶时用作视觉指示剂。本发明的优选的显色指示剂包括一种过氧化物和一种色原,其中包括,(但并不限于此):愈创木脂、2-2'-连氨基-双(3-乙基-噻唑啉-6-磺酸)、四甲基联苯胺、苯酚、4-氨基安替比林,和4,5-二羟基萘-2,7-二磺酸。一种特别优选的显色指示剂由过氧化物和愈创木脂构成,该色原在还原状态是无色的而在氧化状态是深蓝色。最佳地,在使用之前通过溶剂萃取来纯化愈创木脂。对于任一指定的报告酶的最合适的显色指示剂将取决于报告酶能催化或引发的反应,并且在任一情况下的筛选对

于本领域的技术人员应该是很明显的。如前所述,如果视觉指示剂是显色指示剂,那么可以采用液态显色系统或固态显色系统。

在本发明的另一个方面,提供了一种通过分析在样品中是否存在具有酶活性的硫醇蛋白酶而检测阴道毛滴虫(*Trichomonas vaginalis*)的方法。该方法包括:(a)将样品与固相载体接触,该固相载体具有固定在其上的报告酶,其固定方式使得一旦受到具有酶活性的硫醇蛋白酶的作用便会释放出报告酶;(b)将与固相载体接触过的样品与指示剂混合,该指示剂会因报告酶的作用而产生可检测的变化;和(c)观察指示剂是否发生可检测的变化,所发生的可检测的变化便是在样品中存在具有酶活性的硫醇蛋白酶即具有阴道毛滴虫的标志。

与上述的方法相同,在本发明的该方法中使用的报告酶或标记酶可以是任何能够产生信号的酶,即其活性会导致一种可见的或可检测的变化,并且不被样品中的任何试剂所失活(包括不被样品中存在的任何水解酶的失活性的水解作用所失活)的酶。这种报告酶包括,(但并不限于此):过氧化物酶、磷酸酯酶、氧化还原酶、脱氢酶、转移酶、异构酶、激酶、还原酶、脱氨酶、过氧化氢酶、脲酶和葡萄糖苷酸酶。选择合适的报告酶或标记酶对于本领域的技术人员而言是很显而易见的。在本发明方法中,目前优选的报告酶是过氧化物酶。尤其是辣根过氧化物酶。

报告酶被固定在固相载体上,即不溶性的基质、凝胶或树脂,其固定方式使得一旦受到硫醇蛋白酶的作用便会释放出报告酶。本发明的固相载体包括,(但并不限于此):纤维素、琼脂糖、葡聚糖、聚丙烯酸酯、聚丙烯酰胺、或其衍生物、几丁质、琼脂糖(sepharose)、环氧乙烷丙烯酸珠和聚二醛、淀粉、胶原蛋白、角蛋白、弹性蛋白、牛皮粉末、细菌细胞壁粘肽或其片段、尼龙、聚对苯二甲酸乙二醇酯、聚碳酸酯和可控多孔玻璃。在本发明方法中目前优选的固相载体包括几丁

质、聚丙烯酸酯、纤维素或其衍生物、和琼脂糖(sepharose)。将报告酶固定在固相载体的方法可以用本领域技术人员已知和了解的常规方法和程序进行。

报告酶可以通过使用连接分子固定于固相载体上,这种连接分子是具有酶活性的硫醇蛋白酶的可水解的底物。在本发明方法中,这种连接分子包括蛋白质和肽,其中蛋白质是较佳的连接分子。如果连接分子是蛋白质,则优选的蛋白质包括(但并不限于此):偶氮酪蛋白、酪蛋白、k-酪蛋白、免疫球蛋白、血红蛋白、肌红蛋白、白蛋白、弹性蛋白、角蛋白和胶原蛋白。在本发明方法的优选例子中,连接分子是k-酪蛋白、酪蛋白、血红蛋白、或肌红蛋白。

指示剂可以是当具有酶活性的硫醇蛋白酶存在于样品中时,因产生的反应或积累反应而发生可检测的变化的任何种类的化学药品。所产生的可检测的变化是在样品中存在具有酶活性的硫醇蛋白酶的标志,而在样品中存在具有酶活性的硫醇蛋白酶便标志着存在阴道毛滴虫。

优选的指示剂是当受到被待检测的具有酶活性的硫醇蛋白酶从固相载体上释放出的报告酶或标记酶作用时而发生变化的视觉指示剂,尤其是显色指示剂即那些视觉变化是颜色的变化,其中包括在原来无色的材料中形成颜色的指示剂。或者,报告酶可以一旦因硫醇蛋白酶的作用而从固相载体上释放出来,便能催化形成荧光信号、磷光信号、生物发光信号、化学发光信号或电化学信号。另外,报告酶也可以产生其它视觉上的或可检测的信号如凝块、凝集、沉淀或澄清区域。在这些情况下,指示剂可以是报告酶为了产生所需的可检测的变化而需要的化学物质或反应底物。

大量具有类似效果的显色指示剂(即色原)和其它种类可以在过氧化物酶被用作报告酶时用作视觉指示剂。本发明的优选的显色指示剂包括一种过氧化物和一种色原,其中包括,(但并不限于此):愈

创木脂、2-2'-连氨基-双(3-乙基-噻唑啉-6-磺酸)、四甲基联苯胺、苯酚、4-氨基安替比林,和4,5-二羟基萘-2,7-二磺酸。一种特别优选的显色指示剂由过氧化物和愈创木脂构成,该色原在还原状态是无色的而在氧化状态是深蓝色。对于任一指定的报告酶的最合适的显色指示剂将取决于报告酶能催化或引发的反应,并且在任一情况下的筛选对于本领域的技术人员应该是很明显的。如前所述,如果视觉指示剂是显色指示剂,那么可以采用液态显色系统或固态显色系统。

如对天冬氨酸蛋白酶的测定相同,可以使用特定的反应条件和特异的抑制剂来增加硫醇蛋白酶的活性和专一性。例如,人们通过向测试系统中添加抑制剂(如加入胃酶抑素来抑制天冬氨酸蛋白酶,加入大豆胰蛋白酶抑制剂来抑制胰蛋白酶,加入EDTA或其它螯合剂来抑制金属蛋白酶,以及许多已知的天然的非硫醇蛋白质的蛋白酶的抑制剂),可以使只有硫醇蛋白酶发挥功能从而被检测出。此外,通过在pH约7.4的条件下进行测定,可以激活许多硫醇蛋白酶,但是天冬氨酸蛋白酶被失活。

应注意,本发明的报告酶释放技术还可以用于检测样品中水解酶抑制剂的存在或不存在。许多生物过程,包括血压的调节、血液凝结、细菌复制等,都涉及到非常特异的、精细调节的水解酶的作用。此外,已知许多药物、杀虫剂和除草剂等是通过抑制特异的水解酶而发挥作用的。在某些情况下,非常需要确定血液中抑制水解酶的药物浓度,或者确定在生产中是否存在潜在的杀虫剂水解酶抑制剂的污染。因此,在这些情况下,有必要检测水解酶的抑制剂而不是检测水解酶本身。

因此,在本发明的另一方面,提供了一种分析样品中是否存在靶水解酶的抑制剂的方法。该方法包括:(a)让样品与靶水解酶和固相载体接触,固相载体具有一种固定在其上面的报告酶,其固定方式使得一旦受到靶水解酶的作用就会从固相载体上释放出报告酶,只要

靶水解酶不因水解酶抑制剂的存在而失活；(b)在样品与靶水解酶和固相载体接触之后，样品与指示剂混合，指示剂是任何会因报告酶的作用而产生可检测的变化的物质；和(c)观察指示剂是否发生可检测的变化，所发生的可检测的变化便表示在样品中不存在靶水解酶的抑制剂。

为了检测样品中水解酶抑制剂的存在，需将一定量的靶水解酶加入测试系统，而测试检测样品抑制靶水解酶的能力。当靶水解酶抑制剂不存在于样品中时，靶水解酶会将报告酶从固相载体上释放出，从而使指示剂产生可检测的变化。相反，当靶水解酶抑制剂存在于样品中时，靶水解酶将被抑制，所以不会将报告酶从固相载体上释放出，也不会使指示剂产生可检测的变化或反应。没有必要要求样品中的抑制剂完全抑制加入到测试系统中的靶水解酶。只需要发生足够量的靶水解酶的抑制，从而能够在预期的可检测反应中产生较大的差异即可。

本发明方法可以用于分析任何已知的水解酶抑制剂的存在与否。这些水解酶包括，(但并不限于此)：蛋白酶、肽酶、脂酶、核酸酶、同型寡糖酶、异型寡糖酶、同型聚多糖酶、异型聚多糖酶、磷酸酯酶、硫酸酯酶、神经氨酸酶和酯酶。在一个优选例中，本发明方法可以用于分析蛋白酶抑制剂的存在，这些蛋白酶抑制剂包括，(但并不限于此)：天冬氨酸蛋白酶抑制剂、丝氨酸蛋白酶抑制剂、硫醇蛋白酶抑制剂、金属蛋白酶抑制剂、酸性蛋白酶抑制剂、和碱性蛋白酶抑制剂。在一个更优选的例子中，本发明方法可以用于分析天冬氨酸蛋白酶抑制剂的存在与否，如胃酶抑素、卵巨球蛋白、氟哌啶醇、过渡态类似物、U-81749、H-261、MV7-101、A-75925、A-76928 和 A-7003。U-81749、H-261、MV7-101、A-75925、A-76928 和 A-7003 是以前在文献中描述过的试验药物。在本发明方法的更优选的例子中，待检测的是天冬氨酸蛋白酶抑制剂胃酶拟素。

根据本发明的该方法,靶水解酶包括,(但并不限于此):蛋白酶、肽酶、脂酶、核酸酶、同型寡糖酶、异型寡糖酶、同型聚多糖酶、异型聚多糖酶、磷酸酯酶、硫酸酯酶、神经氨酸酶和酯酶。选择用于上述方法的特定的靶水解酶将取决于待检测的抑制剂,而且在任何情况下,这种选择对于本领域的技术人员而言是很显而易见的。例如,如果待检测的是胃酶抑素,则天冬氨酸蛋白酶可以是用于上述测试系统的靶水解酶。

在本发明的该方法中使用的报告酶或标记酶可以是任何能够产生信号的酶,即其活性会导致一种可见的或可检测的变化,并且不被样品中的任何试剂所失活(包括不被加入测试系统的任何靶水解酶的失活性的水解作用所失活)的酶。这种报告酶包括,(但并不限于此):过氧化物酶、磷酸酯酶、氧化还原酶、脱氢酶、转移酶、异构酶、激酶、还原酶、脱氨酶、过氧化氢酶、脲酶和葡萄糖苷酸酶。选择合适的报告酶或标记酶对于本领域的技术人员而言是很显而易见的。在本发明方法中,目前优选的报告酶是过氧化物酶,尤其是辣根过氧化物酶。

报告酶被固定在固相载体上,即不溶性的基质、凝胶或树脂,其固定方式使得一旦受到靶水解酶的作用便会从固相载体上释放出报告酶,如果靶水解酶不因抑制剂的存在而失活。本发明的固相载体包括,(但并不限于此):纤维素、琼脂糖、葡聚糖、聚丙烯酸酯、聚丙烯酰胺、或其衍生物、几丁质、琼脂糖(sepharose)、环氧乙烷丙烯酸珠、聚二醛、淀粉、胶原蛋白、角蛋白、弹性蛋白、牛皮粉末、细菌细胞壁粘肽或其片段、尼龙、聚对苯二甲酸乙二醇酯、聚碳酸酯和可控多孔玻璃。

报告酶可以通过使用连接分子固定于固相载体上,这种连接分子是具有酶活性的靶水解酶的可水解的底物。这种连接分子包括蛋白质、碳水化合物、脂类、肽、酯和核酸。用于将报告酶连接于固相载体的具体的连接分子将取决于加入测试系统的靶水解酶的种类,而

在任何情况下,这种选择对于本领域的技术人员而言是很显而易见的。

指示剂可以是当具有酶活性的靶水解酶不被存在于样品中的抑制剂所失活时,由于发生的反应或积累反应而产生可检测的变化的任何种类的化学药品。优选的指示剂是一旦受到被具有酶活性的靶水解酶(只要靶水解酶不被样品中存在抑制剂失活)从固相载体上释放出的报告酶或标记酶的作用时会发生变化的视觉指示剂,尤其是显色指示剂即那些视觉变化是颜色的变化,其中包括在原来无色的材料中形成颜色的指示剂。

大量具有类似效果的显色指示剂(即色原)和其它种类可以用作视觉指示剂。本发明的用于类似过氧化物酶的报告酶的优选的显色指示剂包括一种过氧化物和一种色原,其中包括,(但并不限于此):愈创木脂、2-2'-连氨基-双(3-乙基-噻唑啉-6-磺酸)、四甲基联苯胺、苯酚、4-氨基安替比林,和 4,5-二羟基萘-2,7-二磺酸。一种特别优选的显色指示剂由过氧化物和愈创木脂构成,该色原在还原状态是无色的而在氧化状态是深蓝色。如前所述,如果视觉指示剂是显色指示剂,那么可以采用液态显色系统或固态显色系统。

在本发明的另一方面,提供了一种用于分析样品中是否存在具有酶活性的水解酶的测试设备。该设备包括:至少部分由具有内对表面的、相对的、第一和第二壁界定的容器,内对表面之间有一间隙,第一壁、第二壁或两壁都由透光材料构成;其固定在位于第一和第二壁之一的内对表面上的固相载体上的报告酶,其固定方式使得一旦受到水解酶的作用便会释放出报告酶;位于第一和第二壁之一的内对表面上的指示剂,指示剂是当受到报告酶的作用时会产生可检测变化的物质;和容器上用于引入样品的开口。

根据本发明,该容器最好是平的、薄的、而且其大小应便于用手拿。因此,腔最好是平的、浅的、且其宽度和长度大于其深度,而且深

度大体一致。腔最好是足够浅,以便样品能够自发地湿润腔从而实现样品和位于上和下表面的干试剂涂层之间的最大接触。当试剂涂层同时位于腔的上下表面时,这一点特别重要。当试剂涂于施涂指示剂的表面对面时,在这种情况下,在这些表面之间的小的固定距离还可以减小对面的试剂扩散并到达指示剂所需通过的距离。

在这些考虑因素中,腔的深度在本发明中并不是最重要的,可以有所不同。在大多数情况下,当腔的深度为约 3—50 密耳(0.003—0.050 英寸;0.0076—0.127 厘米),更佳为约 5—15 密耳(0.005—0.015 英寸;0.0127—0.0381 厘米)时可以获得最佳的结果。对于任一给定的深度,腔的侧面尺寸(即其侧壁之间的间隔距离)将限定设备可以容纳的样品的大小,除了限定设备外表面上的可见的测试区域的大小和形状之外,该尺寸是不重要的。因此,该侧面尺寸应能够提供足够大的供观察的测试区域,还应足够小以便腔能够被具有合理大小的样品所完全填满。随着样品类型、来源和采样方式的不同,样品的尺寸可以改变。在典型的结构中,腔的侧面区域可以为约 0.1—10 平方厘米,更佳为约 0.3—3 平方厘米。在典型结构中的腔的内体积同样可以改变,并且,对于大多数类型的样品,约 3—300 微升的体积是最合适和方便的。

本发明的测试设备可以用于分析任何已知的水解酶的存在。这些水解酶包括,(但并不限于此):蛋白酶、肽酶、脂酶、核酸酶、同型寡糖酶、异型寡糖酶、同型聚多糖酶、异型聚多糖酶、磷酸酯酶、硫酸酯酶、神经氨酸酶和酯酶。在一个优选例中,本发明测试设备可以用于分析蛋白酶的存在,这些蛋白酶包括,(但并不限于此):天冬氨酸蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、硫醇蛋白酶、金属蛋白酶、酸性蛋白酶、和碱性蛋白酶。在另一个优选例中,本发明测试设备可以用于分析同型寡糖酶或异型寡糖酶或同-多糖酶或异-多糖酶的存在,其中包括,(但并不限于此):几丁质酶、淀粉酶、纤维素酶和溶菌酶。

在本发明的测试设备中使用的报告酶或标记酶可以是任何能够产生信号的酶,即其活性会导致一种可见的或可检测的变化,并且不被样品中的任何试剂所失活(包括不被样品中所存在的任何靶水解酶的失活性的水解作用所失活)的酶。这种报告酶包括,(但并不限于此):过氧化物酶、磷酸酯酶、氧化还原酶、脱氢酶、转移酶、异构酶、激酶、还原酶、脱氨酶、过氧化氢酶、脲酶和葡萄糖苷酸酶。选择合适的报告酶或标记酶对于本领域的技术人员而言是很显而易见的。目前优选的报告酶是过氧化物酶,尤其是辣根过氧化物酶。

报告酶被固定在第一固相载体上,即不溶性的基质、凝胶或树脂,其固定方式使得一旦受到待检测的水解酶的作用便会从固相载体上释放出报告酶。本发明的优选的固相载体包括,(但并不限于此):纤维素、琼脂糖、葡聚糖、聚丙烯酸酯、聚丙烯酰胺、或其衍生物、几丁质、琼脂糖(sepharose)、环氧乙烷丙烯酸珠、聚二醛、淀粉、胶原蛋白、角蛋白、弹性蛋白、牛皮粉末、细菌细胞壁粘肽或其片段、尼龙、聚对苯二甲酸乙二醇酯、聚碳酸酯和可控多孔玻璃。将报告酶固定在第一固相载体的方法可以用本领域技术人员已知和了解的常规方法和程序进行。

报告酶可以直接附着在第一固相载体上,或者,报告酶可以通过使用连接分子固定于第一固相载体上,这种连接分子是待检测的具有酶活性的水解酶的底物的可水解的连接物。这种连接分子包括,(但并不限于此):蛋白质、碳水化合物、脂类、肽、酯和核酸。用于将报告酶连接于第一固相载体的具体的连接分子取决于待检测的水解酶的种类,而在任一情况下的选择对于本领域的技术人员而言是很显而易见的。

在本发明的这种测试设备中,指示剂被附着于并不与第一固相载体接触的第二固相载体。本发明的优选的固相载体包括,(但并不限于此):纤维素、琼脂糖、葡聚糖、聚丙烯酸酯、聚丙烯酰胺、或其衍

生物、几丁质、琼脂糖(sepharose)、环氧乙烷丙烯酸珠和聚二醛、淀粉、胶原蛋白、角蛋白、弹性蛋白、牛皮粉末、细菌细胞壁粘肽或其片段、尼龙、聚对苯二甲酸乙二醇酯、聚碳酸酯和可控多孔玻璃。将指示剂固定在第二固相载体的方法可以用本领域技术人员已知和了解的常规方法和程序进行。

指示剂可以是当具有酶活性的水解酶存在于样品中时,因产生的反应或积累反应而发生可检测的变化的任何种类的化学药品。因此产生的可检测的变化是在样品中存在具有酶活性的水解酶的标志。优选的指示剂是当受到被待检测的水解酶从固相载体上释放出的报告酶或标记酶作用时而发生变化的视觉指示剂,尤其是显色指示剂即那些视觉变化是颜色的变化,其中包括在原来无色的材料中形成颜色的指示剂。或者,报告酶可以一旦因水解酶的作用而从固相载体上释放出来,便能催化形成荧光信号、磷光信号、生物发光信号、化学发光信号或电化学信号。另外,报告酶也可以产生其它视觉上的或可检测的信号如凝块、凝集、沉淀或澄清带。在这些情况下,指示剂可以是报告酶为了产生所需的可检测的变化而需要的化学物质或反应底物。

大量具有类似效果的显色指示剂(即色原)和其它种类可以用作视觉指示剂。当过氧化物酶被用作报告酶或标记酶时,优选的显色指示剂包括一种过氧化物和一种色原,其中包括,(但并不限于此):愈创木脂、2-2'-连氨基-双(3-乙基-噻唑啉-6-磺酸)、四甲基联苯胺、苯酚、4-氨基安替比林,和 4,5-二羟基萘-2,7-二磺酸。特别优选的显色指示剂由过氧化物和愈创木脂构成,该色原在还原状态是无色的而在氧化状态是深蓝色。最佳地,在使用之前通过溶剂萃取来纯化愈创木脂。对于任一指定的报告酶的最合适的显色指示剂将取决于报告酶能催化或引发的反应,并且在任一情况下的选择对于本领域的技术人员是很显而易见的。

如果视觉指示剂是显色指示剂,那么可以采用固态显色系统。这样的系统可以包括一种过氧化物、一种当存在过氧化物酶时能够被过氧化物氧化的色原、以及一种已经将色原浸渍或固化于其上并干燥的固相载体。在该系统中,色原能被浸渍在吸水纸或载体上比如 Hemocult® 片,或者色原也可以以薄层的形式沉积在塑料或其它材料的薄片上。在后面一种方式中,色原可以以含有聚合物材料(如羟基丙基纤维素,乙基纤维素等)的溶液形式涂成薄层。如果色原本身是水溶性的色原,则可以将其包于一种不溶于水的材料基质中。或者,当色原本身是不溶于水的时候,可以用其在有机溶剂中的溶液或与一种水溶性或水不溶性的聚合物的混合物进行施涂,形成薄层。

在该特定的色原系统中,可以以固体形式提供过氧化物(如过氧化钛),也可以在原位提供过氧化物。通过在测试设备的内表面涂一层干的葡萄糖和葡萄糖氧化酶,可以在原位产生过氧化氢。或者通过在测试设备的内表面涂一层过硼酸钠的醇悬浮液而在原位产生过氧化氢。在低 pH 条件下,过硼酸钠会自发地释放出过氧化氢。当存在过氧化氢和过氧化物酶如辣根过氧化物酶(过氧化物酶被水解酶从固相载体上释放出)时,色原会被氧化并且产生视觉上的可检测的颜色变化。所产生的颜色变化标志着样品中存在具有酶活性的水解酶。

本测试设备的反应条件(如连接分子、固相载体、pH、缓冲液的缓冲能力、缓冲液种类、盐等的选择)可以改变和调整以便增加水解酶的活性和特异性并将样品中的不同水解酶区分开,这一点对于本领域的技术人员而言是显而易见的。此外,在本发明的测试设备中可以加入特异的酶抑制剂以提高水解酶的活性和特异性并在样品中将其与不同的水解酶区分开,这一点对于熟练的技术人员而言是也显而易见的。

该测试设备具有一个样品引入孔,通过该孔可以将样品置于腔中。该孔最好位于观察视觉指示剂变化的相同的壁,即透光壁上。孔

的形状应适合用于将样品从其来源处传递过来的转移设备,因而孔可以改变以适合各种可能使用的转移设备。转移设备的例子有注射器、移液吸管、药签和窥器。其它的转移设备对于本领域的熟练技术人员而言是显而易见的。通常一个圆形孔就足够了。尽管对于如药签之类的转移设备,孔可以具有一个直的边缘以便沿着该边缘可以刮转移设备从而更方便地释放出样品。

优选的测试系统还含有其它的特征,从而进一步促进流体迁移以便填满腔并且使所有的试剂都与样品接触。一个这样的特征是腔具有一个或多个排气孔以便排出空气。排气孔应距样品引入孔有足够的距离,从而最大限度地扩大被样品湿润的表面区域。当在腔中与测试区域水平相邻的位置处含有被样品激活的阳性和阴性对照时,在这种设备中排气孔的排列方式应保证样品到达两个对照并且填满它们,以避免任何错误的或模棱两可的读数。如下所述,设备的一种优选的排列方式是将测试区域置于对照区域中间,这样尽管阳性对照和阴性对照区域都与测试区域共有一个共同的边界,但是两个对照区域之间不会有共同边界。在这种排列方式中,最方便的是将样品引入孔置于直接位于测试区域的上方,而排气孔位于两个对照区域上方或者靠近这些区域的外侧,因此可以使样品先填满测试区域然后再填满两个对照区域。

在本发明的一个优选例子中,另一个促进流体迁移的特征是沿腔的内表面放置表面活性剂。表面活性剂可以沿着腔的上下表面中的一个表面,更佳为沿着两个表面,并且可以作为构成表面上的最靠内的薄层或涂层的载体基质中的干溶质。在某些情况下,薄层也含有一种或多种参加测试反应的试剂。在其它情况下,表面活性剂可以是薄层的唯一的功能组份。

表面活性剂可以用于水基的样品,而大多数生物样品正是水基的。合适的表面活性剂是可以以固体形式提供的种类,而且大量具有

表面活性效果的物质可以被使用。这种物质一般是去污剂、湿润剂、或乳化剂,而且它们的化学结构和电性质可以有很不相同,其中包括阴离子型、阳离子型、两性离子型和非离子型物质。例子有硫酸烷基烷氧基酯、磺酸烷基芳基酯、脂肪酸甘油酯、羊毛脂基的衍生物、聚氧乙烯烷基苯酚、聚氧乙烯胺、聚氧乙烯脂肪酸和酯、聚氧乙烯脂肪醇和醚、聚(乙二醇)脂肪酸和酯、聚氧乙烯脂肪酸酯和油、聚氧丙烯/聚氧乙烯缩合物和嵌段聚合物、脱水山梨醇脂肪酸酯、琥珀酸酯的磺基衍生物、烷基葡萄糖苷、和胆汁酸衍生物。某些属于这种类型的产品的商品名称是Lubrol, Brij, Tween, Tergitol, Igepal, Triton, Teepol等。

可以通过施涂液态形式的薄层材料然后干燥或其它固化手段固化而形成包括指示剂薄层和试剂薄层的固态薄层。物质的液态形式可以是,例如,溶液、悬浮液或处于未凝固液态的该物质。因此固化步骤可以是蒸去溶剂或使该物质凝固。所需的物质还可以与其它材料混合以便实现不同的目的,这些目的包括例如:

- (1) 通过改变液体的粘度而便于将液体施涂于表面。
- (2) 协助形成连续而光滑的固体涂层,该涂层在长时间内或在将其其它的涂层涂覆在其上面时不会解体或粒化。
- (3) 改变涂层对于涂覆于其上的涂层中所用的溶剂的溶解性,或者使涂层可以溶于不会溶解涂于其下的涂层的溶剂中。

或者同时实现上述目的。可溶性的聚合物材料是用于实现这些目的中的一个或多个目的的优选的添加剂。例子有纤维素和各种纤维素衍生物,可以用经过适当选择的替代物以实现所需的溶解性能。对于为水性或其它水基的样品而设计的测试设备,指示剂薄层最好含有包含在不溶于水的固态材料基质中的指示剂。这样可防止指示剂从薄层中迁移出并离开透光的表面。或者,指示剂本身可以是不溶于水的,而且可以自身形成一种保持完整的凝结薄层。

对于那些在设备中具有阳性对照指示剂、阴性对照指示剂或两种对照指示剂的本发明的例子而言,可以对每种对照都提供一种或多种试剂。这些额外的试剂可以掺入在已有的薄层中并且处于该薄层的水平界定的部分,或者可以作为单独的、垂直相邻的薄层施涂于已有的薄层的水平界定的部分的上方。依据它们在腔中的位置,这些额外的试剂可以界定出对照区域,这些对照区域互相水平隔开并且与测试区域隔开。

选择用于阳性或阴性对照的合适试剂取决于整个测试所针对的水解酶、用于检测水解酶存在的视觉指示剂的类型、以及该试剂是否准备用作阳性或阴性对照。通过利用已知的化学知识,在大多数情况下选择一种合适的试剂本领域的技术人员而言是显而易见的。例如,用于阳性对照的试剂可以是水解酶本身的样品、水解酶的类似物或任何其它的具有类似的作用模式、能够引起或诱导指示剂发生可检测的反应(或一系列反应)的种类。含有该试剂的薄层可以位于腔的上或下表面,只要该试剂在样品存在之前不会引起可检测的变化,但是该试剂应不论样品中是否存在具有酶活性的水解酶都能够引起可检测的变化(阳性对照)。用于阴性对照的试剂同样可以是抑制种类,如变性剂、抑制剂或其它能够防止或阻断反应(或一系列反应)的失活剂,因此不论在样品中是否存在具有酶活性的水解酶该试剂都能防止发生可检测的变化。

当样品加入测试设备时,两种对照都被激活。在某些情况下,这一点可以通过下列发生最有效地实现:将对照试剂置于某薄层,而该薄层位于与含有其它试剂的薄层所处的相同的表面上。在其它情况下,当对照试剂被置于位于具有其它试剂的表面对面的腔表面上的薄层中,从而使对照试剂和其余试剂被空气间隙隔开时,可以获得最佳结果。在优选例子中,设备的对照区域含有用于测试区域的所有组份和试剂以及对照试剂,它们可以掺入用于测试区域的一个或多个

相同薄层的水平界定部分,或者作为单独的薄层施涂在该水平界定部分的上方。为了对照区域形成清晰的边界以及为了防止对照试剂使测试区域激活或失活,有效的做法是在薄层中于边界处放置隔离物以便将对照区域和测试区隔开,从而减小或消除对照试剂从各自的对照区域向侧面扩散的可能性。在薄层中,这些隔离物可以沿着上表面、下表面或两个表面。

如上所述,对照最好是被用于测试的同一样品所激活。这可以将对照区域排列成测试区域的延伸部分而方便地实现。所有区域都位于测试设备的同一腔,其中在不同的区域之间流体可以不受阻拦地流动。在优选的具有阳性和阴性对照区域的例子中,对照区域被位于两个对照区域中间的测试区域所隔开。通过使用上述的样品引入孔和排气孔的排列方式,只需加样一次便可以填满所有的区域。因为可以通过设备的透光壁观察可检测的变化的存在与否,所以将适当的说明置于设备的外表面便能够方便地鉴别阳性和阴性对照区域。

透光材料可以是任何惰性并且具有足够硬度能够支撑指示剂薄层、而且又具有足够的透光性从而能够在指示剂发生变化时显示其变化的材料。可以使用半透明或透明的材料,最好是不吸收光的材料。而且最佳为透明材料。适合用于该用途的透明聚合物材料的例子有聚对苯二甲酸乙二醇酯(如 Mylar®)和聚碳酸酯(如 Lexan®)。设备的对面(即底面)同样可以由透明或半透明材料构成,尽管也可以由不透明材料构成,因为只需从设备的一面观察测试结果以及阴性和阳性对照。当底面壁是透明时,通过用着色或反光材料在底面壁的某一表面施涂印刷图案或涂层,可以增加颜色反差,从而可以增强通过顶部壁对测试区域或对照区域或两个区域发生的变化的检测。

测试设备可以用大量不同的方法制成。聚合物材料的板材可以层压在一起,并进行适当的切削以形成腔的形状以及样品引入孔和排气孔。腔的深度及其形状和侧面尺寸可以由中央板的厚度所决定,

排气孔。腔的深度及其形状和侧面尺寸可以由中央板的厚度所决定,同时孔的位置将由顶部板所决定。在板被拼装成层压板之前,可以按需要将指示剂和试剂涂层施涂在顶部板、底面板或两者上。接着,板材用常规方式牢固地结合在一起,例如通过热封或使用粘合剂。

一种特别优选的形成设备的方法是通过使用一片透明或透光的聚合物材料薄板,其中一部分经过机械或化学的压印或处理,在腔的内表面具有深度恒定的凹陷部分。该凹陷部分位于薄板的一半,而样品引入孔和排气孔位于薄板的另一半。指示剂和试剂涂层都涂在薄板的适当位置。然后将具有孔的一半折叠在另一半上,形成闭合的腔并将腔的上表面和下表面准确地对齐。薄板的相对的表面被粘成上面段落中所述的层压板结构。

一种优选的将薄板的两半粘合在一起的方法是使用热敏的、压敏的、水基或溶剂基的粘合剂。粘合剂被限定在腔的四周以避免与测试试剂接触,或者也可以在施涂指示剂和试剂涂层之前将粘合剂施涂在薄板的全部表面上。在后一种情况中,合适的粘合剂是透明的、惰性的、可以被施涂在其上的涂层所湿润或与之共存的粘合剂。存在许多种适合该应用的粘合剂,而且在不同的系统中,最合适的选择取决于将要施涂在其上的涂层的种类。

在本发明的另一方面,提供了一种通过分析样品中是否存在具有酶活性的天冬氨酸蛋白酶而检测念珠菌病的测试设备。该设备包括:至少部分由具有内对表面的、相对的、第一和第二壁界定的容器,内对表面之间有一间隙,第一壁、第二壁或两壁都由透光材料构成;固定在位于第一和第二壁之一的内对表面上的固相载体上的报告酶,其固定方式使得一旦受到天冬氨酸蛋白酶的作用便会释放出报告酶;位于第一和第二壁之一的内对表面上的指示剂,指示剂是受到报告酶的作用时会产生可检测变化的物质;和容器上用于引入样品的开口。

本测试设备中所用的报告酶和标记酶可以是不会被样品中的任一试剂所失活的任何能够产生信号的酶,这种失活包括因天冬氨酸蛋白酶活性或样品中存在的其他水解活性而产生的水解作用。这样的报告酶包括(但不局限于此):过氧化物酶,磷酸酯酶,氧化还原酶,脱氢酶,转移酶,异构酶,激酶,还原酶,脱氨酶,过氧化氢酶,脲酶,和葡萄糖苷酸酶。目前较好的报告酶是过氧化物酶类,例如,辣根过氧化物酶。

报告酶被以一种可由天冬氨酸蛋白酶的作用而释放的方式固定在第一固体载体上,即一种不溶性载体,凝胶或树脂。可使用一个连接分子将报告酶固定在固体载体上,该连接分子的连接作用可被天冬氨酸蛋白酶所水解。在该测试装置中,这样的连接分子包括蛋白质和肽,以蛋白质为佳。如果连接分子是蛋白质,那么优选的蛋白质包括(但不局限于此):偶氮酪蛋白,酪蛋白,K-酪蛋白,免疫球蛋白,血红蛋白,肌红蛋白,清蛋白,弹性蛋白,角蛋白和胶原蛋白。在本测试装置的优选实施方案中,连接分子是K-酪蛋白,酪蛋白,血红蛋白,或肌红蛋白。

在本测试装置中,指示剂被固定于不与第一固体载体接触的第二固体载体上。本发明的优选固体载体包括(但不局限于此),纤维素,琼脂糖,葡聚糖,聚丙烯酸酯,或它们的衍生物,几丁质,琼脂糖(sepharose),环氧乙烷丙烯酸珠,聚二醛,淀粉,胶原蛋白,角蛋白,弹性蛋白,牛皮粉,细菌细胞壁粘肽或它们的碎片,聚丙烯酰胺,尼龙,聚对苯二甲酸乙二醇酯,聚碳酸酯,和可控多孔玻璃。通过使用常规方法和本行业熟练技术人员已知的方法来进行指示剂在第二固体载体上的固定化。

指示剂可以是,当样品中存在有活性水解酶时因反应或积累反应而发生某种可测变化的任何化学药品。这样反应后产生的可测变化表明样品中活性天冬氨酸蛋白酶的存在,而天冬氨酸蛋白酶的存在

在表明了念珠菌病的存在。优选的指示剂是视觉指示剂和显色指试剂,即,获得在其中的可见变化是一种颜色变化,包括在测试天冬氨酸蛋白酶的存在时,由于它的活性作用使报告酶或标记酶由固体载体上释放而发生反应,因反应而在一种无色物质中生成某种颜色。

许多显色指示剂(即,色原)和其他具有类似作用的物质可被用作可见指示剂。根据本发明,若使用过氧化物酶为可释放报告酶,优选的显色指示剂包含一个过氧化物和一个色原,该色原包括(但不限于此),愈创木脂,2-2'-连氨基-双(3-乙基-噻唑啉-6-磺酸),四甲基联苯胺,苯酚,4-氨基安替比林,和4,5-二羟基萘-2,7-二磺酸。一种特别优选的显色指示剂由一种过氧化物和愈创木脂组成,它在还原态显无色而在氧化态呈深蓝色。

如果可见指试剂是针对过氧化物酶或假过氧化物酶的一种显色指示剂,那就要使用一个固体显色系统,这样的系统包含一种过氧化物,在过氧化物酶的存在下可被过氧化物氧化的一种色原,和一种已被显色剂浸透或可将显色剂固定其上并干燥的固体载体。在该系统中,可用色原象使用 Hemocult® 片那样浸渍一张吸水纸或吸水载体,或者,也可将色原沉积在一种塑料或其它材料的薄片上以形成一个薄层。在后一种方式中,色原可以一种含有某种聚合材料(例如,羟基丙基纤维素,乙基纤维素等)的溶液形式进行涂布。如果色原本身是水溶性的,可将它包埋于一种水不溶性的载体物质中。或者,如果色原本身不溶于水,它可以某种有机溶剂的溶液形式涂布或将该有机溶剂与一种水溶性或水不溶性的聚合物合并使用。

在此固体显色系统中,过氧化物可以固体形式供给(例如,过氧化钛)或者,它也可在测试装置中原位生成。当存在着过氧化物和由于活性天冬氨酸蛋白酶的作用而由第一固体载体解离下来的过氧化物酶时,色原将被氧化,从而产生一种可见的颜色变化。如前面所提到的,发生的颜色变化表明样品中有活性天冬氨酸蛋白酶存在,活性

天冬氨酸蛋白酶的存在表明念珠菌病的存在。

本发明的最后一方面,提供了一种用于测试样品中是否存在有靶水解酶的抑制剂的测试装置,该测试装置包括:一个由相对的第一和第二器壁至少部分分界的容器,两具内对表面的器壁间隔开一定间隙,第一器壁,第二器壁或这两者由透光材料制成;在第一和第二器壁中一个的内对表面上含有靶水解酶,该靶水解酶容易因抑制剂的存在而失活;以某种方式将报告酶固定在位于第一和第二器壁之一的内对表面上的固体载体上,其固定方式使得如果靶水解酶没有因抑制剂的存在而失活,则该报告酶会因靶水解酶的作用而释放出来;指示剂位于第一和第二器壁之中的内对表面上,该指示剂容易因报告酶的作用而产生可检测的变化;和一个向容器中引入样品的开口。

为了检测某样品中是否存在某种水解酶抑制剂,在测试开始前的即刻或在该测试装置的制造过程中(较佳)向装置中加入一定量的靶水解酶。测试操作包括检测样品抑制靶水解酶的能力。如果样品中没有靶水解酶的抑制剂,靶水解酶将把报告酶由固体载体中释放出来,由此在指示剂中产生一个可检测得的反应。相反的,如果样品中有靶水解酶的抑制剂,报告酶将不能从固体载体上解离下来,也就不能在指示剂中产生一个可检测得的变化或反应。样品中的抑制剂不一定必须完全抑制加入装置的靶水解酶。只需要对足够数量的靶水解酶产生抑制以在预计的可检测的反应中产生一个可观测到的变化。实验装置的正负对照提供了用于显示靶水解酶被完全抑制和完全不抑制的对照反应。

可以通过向测试装置中定量加入靶水解酶来按需要调节该酶释放技术的灵敏度。同样,如果需要,靶水解酶与样品中的任何抑制剂的作用时间可通过用物理或化学的方法将靶水解酶与固定化报告酶分离来调节。例如,通过将固定化报告酶涂覆在一个定时释放的载体

中,一种可通过 pH 降解的涂层,或其它相对较缓慢地溶解的可控释放物质,可控制靶水解酶与固定化报告酶的短暂接触。或者,可将靶水解酶定位或以某种化学状态出现,使之可立刻与可能存在于样品中的任何抑制剂接触。所以,在与固定化报告酶接触前,可先将靶水解酶在抑制剂中作用足够时间以使抑制作用产生。由于与固定化报告酶的接触时间是可调的,实验结果甚至可检测出缓慢作用的抑制剂的存在。

本发明的测试装置可检测样品中任何一种水解酶的抑制剂的存在与否,包括(但不局限于此):蛋白酶、肽酶、脂酶、核酸酶,同型或异型寡糖酶,同型聚或异型聚多糖酶,磷酸酯酶,硫酸酯酶,神经氨糖酸苷酶和酯酶的抑制剂。在一个优选实施例中,该测试装置被用于分析蛋白酶抑制剂的存在,该蛋白酶抑制剂包括(但不局限于此):天冬氨酸蛋白酶抑制剂,丝氨酸蛋白酶抑制剂,硫醇蛋白酶抑制剂,金属蛋白酶抑制剂,酸性蛋白酶抑制剂和碱性蛋白酶抑制剂。在一个更优的实施例中,该测试装置被用于检测天冬氨酸蛋白酶抑制剂的存在,例如:胃酶抑素,卵巨球蛋白,氟哌啶醇,过渡态类似物,U-81749,H-261,MV7-101,A-75925;A-76928 和 A-7003。U-81749,H-261,MV7-101,A-75925,A-76928 和 A-7003 是文献中所记述的尚处于试验阶段的药物。在一个更进一步的优选实施例中,胃酶抑素是被检的天冬氨酸蛋白酶抑制剂。

根据本发明的测试装置,靶水解酶包括(但不局限于此):蛋白酶,肽酶、脂酶,核酸酶,同型或异型寡糖酶,同型或异型聚多糖酶,磷酸酯酶,硫酸酯酶,神经氨糖酸苷酶和酯酶。本实验装置中所用的特定的靶水解酶取决于所要检测的抑制剂,并且各种情况下所作的选择对本专业熟练技术人员来说是显而易见的。如果,例如,胃酶抑素是欲测抑制剂,那么用于上述测试装置的靶水解酶就是天冬氨酸蛋白酶。而且,靶水解酶的适当浓度,靶水解酶在测试装置中的几何位

置,合适的定时和可控释放技术以及载体对于本专业熟练技术人员来说都是已知的。

用于此特定测试装置和在此声明的其他测试装置的报告酶或标记酶可以是任何一种能够产生信号的酶,即某种酶,其活性可导致一种可见或可检测的变化,且不会因样品中的任何试剂而失活,包括因测试装置中靶水解酶的水解作用而失活。这样的报告酶包括,(但不局限于此):过氧化物酶,磷酸酶,氧化过原酶,脱氢酶,转移酶,异构酶,激酶,还原酶,脱氨基酶,过氧化氢酶,脲酶,和葡萄糖苷酸酶。合适的报告酶或标记酶的选择对本专业的熟练技术人员来说是显而易见的。在本发明的测试装置中,优选的报告酶是过氧化物酶,更具体的说是辣根过氧化物酶。

报告酶被固定于固体载体上,即,一种不溶性载体,凝胶或树脂,其固定方式可使报告酶在靶水解酶不因样品中的抑制剂而失活时因其水解作用而释放。根据本发明,这些固体载体包括(但不局限于此):纤维素,琼脂糖,葡聚糖,聚丙烯酸酯,或它们的衍生物,几丁质,琼脂糖(sepharose),环氧乙烷丙烯酸珠,聚二醛,淀粉,胶原蛋白,角蛋白,弹性蛋白,牛皮粉,细菌细胞壁粘肽或它们的碎片,聚丙烯酰胺,尼龙,聚对苯二甲酸乙二醇酯,聚碳酸酯,和可控多孔玻璃。

如前所述,该报告酶可通过一个是活性靶水解酶的水解底物的一个连接分子而固定在固体载体上。这样的连接分子包括(但不局限于此):蛋白质,糖类,脂类,肽类,酯类和核酸。用于将报告酶固定于固体载体上的特定的连接分子取决于装在测试装置中的靶水解酶,此类选择对本专业的熟练技术人员来说是显而易见的。

指示剂可以是如果活性靶水解酶不因样品中的抑制剂而失活时因反应或积累反应而发生某种可检测的变化的任何化学药品。优选的指示剂是可见指示剂,尤其是显色指试剂,即,在其中的可见变化是一种颜色变化,包括若靶水解酶没有因样品中的抑制剂而失活而

由它的的活性作用使报告酶或标记酶由固体载体上释放而发生反应,因反应而在一种无色物质中生成某种颜色。

许多显色指示剂(即,色原)和其他具有类似作用的物质可被用作可见指示剂。根据本发明,针对过氧化物酶类的报告酶的优选显色剂包含一个过氧化物和一个色原,该色原包括(但不局限于此):愈创木脂,2-2'-连氨基-双(3-乙基-噻唑啉-6-磺酸),四甲基联苯胺,苯酚,4-氨基安替比林,和4,5-二羟基萘-2,7-二磺酸。如前所述,若可见指示剂是一种显色指示剂,有可能要使用一种液体显色系统或一种固体显色系统。

必须理解,前面有关用以检测某种水解酶的存在测试装置的结构、它的装配和它的实用方法的论述完全可运用于通过检测活性天冬氨酸蛋白酶的存在来用本测试装置检测样品中有否含珠菌病,和用本测试装置来测定样品中是否含有某种靶水解酶的某种抑制剂。

因为本发明将不受任何测试装置的特定装配方式所限制,附图并不限定范围,仅说明一台这样的装置可能的安装方式。

图1是装入指示剂和试剂前且腔关闭时的装置的支持结构的透视图。该支持结构的构成为;由较硬的,透明的,化学惰性的塑料材料制成的单层薄板11,其上的划线12形成一个折痕将薄板分成具有相同长度和宽度的两半13和14。下半部分13包含了一个复合形状凹槽,由中部的圆15和两个向相反方向延伸的两个矩形16,17构成。上半部分14有3个洞,中部是用于引入样品的孔18,两侧有用作通气口的孔19,20。孔19,20是圆形,而样品导入口18是具有一条直边的圆形,可便于从用作转移装置的刷子上刮下样品。孔的布局为:当沿划线12将塑料板折起且顶半部分14和底半部分13接触时,样品导入孔18在凹槽的圆形15的中心之上,通气孔19,20在两个矩形延伸16,17的最外沿边线上。两个矩形延伸16,17代表了装

置的正负对照区域。

可以就图 1 的装置作许多的改变。为了不同的原图两个半部 13,14 可以有不同的长度、宽度、或两者都不同。唯一的关键特征是,底半部分的凹槽和上半部分的洞以划线为基准定位以使洞和凹槽在沿划线将两半折叠时正好对正。作为另一个实施例,该结构底半部分上的矩形延伸 16,17 的两端可以是圆形的(或半圆形的)以配合顶部的通气孔 19,20。通气孔本身可以是任何形状的。其实,将通气孔做成与样品导入孔 18 不同的形状具有防止使用者发生加样位置错误的优点。

图 2 是图 1 所示装置的侧视剖面图,以剖面形式表示了除层以后且两个半部 13、14 折合并相互密封后的腔 31。由透明聚合物制成的两部分 13,14 的内表面分别涂上粘合剂 32,33。直接位于上部胶粘层 33 下的是含有可见指示剂 34 的涂层,后者之下是反应试剂层 35。必须指出,可见指示剂层 34 和反应试剂层 35 都可以围绕样品导入孔 18 沿腔的全长和全宽延伸至腔的全部表面。

通常在腔的底壁 13 上水平定位涂层来界定腔的测试区和对照区。用于负对照的反应试剂包含于涂层 36 中,它占据腔下表面上两个矩形延伸区域中的 16(见图 1),用于正对照的反应试剂含于第二涂层 37 中,以相同的方式位于另一矩形延伸区 17。或者,用于对照的试剂可放在腔的上表面而非下表面。这样做在某些实际分析实验中较为有利。腔下表面位于中心圆 15 下方的部位涂有涂层 38,该涂层可以含有一种用于测试的附加试剂或不含任何试剂。这样,俯视关闭着的装置,圆形测试区域 41 在中间,矩形负对照区 42 和矩形正对照区 43 在它的两侧。可以用空隙 44,45 隔开三种涂料 36,37,38,以防止其所含成份间的扩散或接触,或将这种结果减到最小程度。也可以在可见指示剂层和反应试剂层 34,35 中的一层或两层,在正对下表面隔断 44,45 上方的位置设置相似的隔断。在可见指示剂层和反

应试剂层上的隔断可以进一步防止对照组份或其它反应试剂由对照区向测试剂扩散。

在层 35,36,37,38 的最内侧表面,除了已有的试剂外都可以含有一种润湿剂或去污剂,用以促进样品沿上下表面迅速而充分地扩散直至充满整个腔。有时,可以用一层蛋白质获得相同的效果。

在本发明某些特定的实施方法中,试剂会因长期暴露于空气或由空气中的湿汽而变质。在图 2 所示的装置中,用一薄层既不透湿也不透气的材料 46 防止了这种情况的发生。这一薄层覆盖在样品注入品和两个通气孔上,在揭去该层使用装置前将内腔与外界密封隔绝,该层很容易被揭去。对于对水敏感或对空气敏感的物质,还可能要在装置的底部置一层不透湿不透气的薄层,该薄层可以永久性地固定于其上也可以是可剥落的。可以将装置放在一个全包围的盒子中以进一步防湿和防空气。

如上所示,图 1 和图 2 中的各尺寸,布局和形状都是可改变的。一个典型的实例中,支撑层的材料是 Mylar,厚 5 密取(mil)(0.005 英寸,0.0127cm),胶粘层是低密度聚乙烯,厚 2mil(0.002 英寸,0.0051cm),间隙宽度 47 是 7.5mil(0.0075 英寸,0.019cm),测试区是一个直径为 5/16 英寸的圆(面积:0.0766 平方英寸,0.494cm²),正负对照区都是 1/8 英寸×1/16 英寸(面积:0.0078 平方英寸,0.0504cm²)。在该例中的通气孔都是圆形,它们和样品注入口的直径都是 1/8 英寸(0.32cm)。腔容积约为 12μL。

本发明的测试装置可用于测试样品中各种来源的水解酶的存在性,包括生物来源及其他体液。如:血液、血清,血浆,尿液,尿道分泌物,泪液,阴道液体,颈渗出液,脊髓液和唾液,非体液的如食物,池塘水或游泳池水,和液体废物,都可作为测试样品。

实施例

I. 制备

A. 溴化氰活化的固体载体的制备

1. 材料

- a. 固体不溶性载体(琼脂糖 4B(Sepharese 4B),和 Sigmacell® 20[购自 Sigma Chemical Co.])
- b. 蒸馏水和由蒸馏水制备的冰
- c. 4.0M NaOH
- d. 固体 CNBr
- e. 偶合缓冲液(含 0.5M NaCl 的 0.1M NaHCO₃)
- f. 磁性搅拌马达和搅拌棒;pH 计;化学烟气通风橱

2. 步骤

在 5g 潮湿的,清洗过的固体载体中加入 10 毫升(10ml)的冷却蒸馏水,将混合物降温至 10℃~15℃。用 4.0M NaOH 将悬浮液的 pH 调节至 10.8,以每克潮湿固体载体中加 100 毫克的比例加压碎的固体 CNBr。根据需要加入 4.0M NaOH 的维持 pH10.8,在活化过程中可允许悬浮液的温度升至 18℃~20℃。当不需要再加入 4.0M NaOH 以维持 pH8.0 时,可认为活化已完成。此时,加入碎冰冷却反应混合物,在一个预冷的烧结漏斗上过滤悬浮液。用一个装有固体硫酸亚铁的吸滤瓶收集滤液,硫酸亚铁用于灭活残留在反应混合物中的剩余的 CNBr 和氰化物。在抽滤状态下用 1L 冷却蒸馏水和 1L 偶合缓冲液清洗固体载体,并以膏体状态保存 4℃。

B. [卡巴-酪蛋白-HRPO]共轭物的制备(酰肼法)

1. 材料

- a. 卡巴-酪蛋白和辣根过氧化物酶(HRPO)酰肼[购自 Sigma Chemical Co.]
- b. 蒸馏水
- c. 缓冲液

- i. 50mM2-[吗啉代]乙烷磺酸(MES)缓冲液,pH6.0

ii. 100mM 乙酸钠缓冲液, pH4.0, 含 0.5M NaCl

iii. 100mM 硼酸钠缓冲液, pH9.0, 含 0.5M NaCl

d. 固体高碘酸钠

e. 100mM 甲醛

2. 步骤

a. 卡巴(kappa)-酪蛋白的高碘化物活化

将 20mg kappa 酪蛋白溶于 2ml MES 缓冲液中并加入 8.6mg 固体高碘酸钠。将混和物放在一个转头上, 在暗环境中, 室温下孵育 30 分钟。该反应混合物在约 300ml 50mM EMS, pH6.0 中, 室温下渗析约 45 分钟。然后更换渗析液再渗析 45 分钟。

b. HRPO 与 Kappa-酪蛋白的共价连接

在活化的, 渗析后的 kappa-酪蛋白中加入 5mg HRPO 酰肼(约 175 单位/mg 蛋白质), 室温下将混和物搅拌孵育 4 小时。在混和物中加入 200 μ l 的 100mM 甲醛, 然后在室温下继续孵育 30 分钟。加入 2ml 1M, pH4.0 的冷的乙酸缓冲液, 4 $^{\circ}$ C 沉淀共轭物 30 分钟。离心分离微球体, 重溶于 2ml 10mM 硼酸缓冲液中, pH9.0, 用之前于 4 $^{\circ}$ C 保存。

C. [kappa-酪蛋白-HRPO]共轭物(酰肼法)在溴化氰活化的载体上的固定

1. 材料

a. [kappa-酪蛋白-HRPO]共轭物(制备 B)

b. 蒸馏水

c. 缓冲液

i 偶合缓冲液(0.1M NaHCO₃, 含 0.5M NaCl)

ii. 1.0M Tris 缓冲液, pH8.0

iii. 100mM 乙酸钠缓冲液, pH4.0, 含 0.5M NaCl

iv. 100mM 硼酸钠缓冲液, pH9.0, 含 0.5m NaCl

d. 溴化氰活化琼脂糖(Sepharose 4B)和 Sigma cell20(制备 A)

e. 溴化氰活化的 Sepharose 6MB (购自 Sigma Chemical Co.)

2. 步骤

a. 溴化氰活化的 Sepharose 4B 和 Sigma cell® 20

用 3ml 偶合缓冲液稀释如制备 B 所述由 HRPO 酰肼制备的 2ml[kappa-酪蛋白-HRPO]共轭物,并将其加入 1g 潮显的溴化氰活化的 Sepharose4B 或 Sigma cell® 中。在室温下,颠倒混和混合物 2 小时。用偶合缓冲液和水清洗固体载体,并加入 1.0MpH 为 8 的 Tris 缓冲液。将悬浮液在室温下孵育 2 小时以灭活固体载体中的活性位点。先用 pH4.0 的乙酸缓冲液洗再用偶合缓冲液洗,如此清洗 3 次由载体上去除未结合的物质。最后用蒸馏水洗,将含水的悬浮液保存于 4℃直至使用。

b. 商用活性 Sepharose 6MB (Sigma Chemical Co.)如上所述,在使用前用 200ml1mM HCl 洗涤潮湿的凝胶(1g 湿重)。

c. 活性几丁质

使用上述 A 部分所述的方法,但使用 500mg 潮湿的活性几丁质取代原来的 1g。

D. 辣根过氧化物酶(HRPO)醛的制备

1. 材料

a. HRPO, I 型,200 单位/mg(Sigma Chemical Co. 制品)

b. 20mM 2-(N-吗啉代)乙烷磺酸(MES)缓冲液,pH5.0

c. 固体高碘酸钠

d. 购自 Bio-Rad 的 Biogel[®] P-30 聚丙烯酰胺凝胶

2. 步骤

在溶于 3ml MES 缓冲液的 30mg HRPO 中加入 25.7mg 固体高碘酸钠(400 毫摩尔)。在黑暗中,室温下,将该溶液连续旋转孵育 30 分钟。将该溶液通过浸在 MES 缓冲液中的 P-30 柱以去除剩余的

高碘酸钠,收集总体积为 3ml 的有色的 HRPO。所得的 HRPO 醛立即与目的蛋白(血红蛋白,肌红蛋白,或酪蛋白)偶合。

E. 血红蛋白和肌红蛋白在溴化氰活化的固体载体上的固定

1. 材料

a. 不溶性固体载体

- i. 溴化氰活化的琼脂糖 6MB(Sigma Chemical Co. 出品)
- ii. Sigmacell®(如制备 A 中所述)

b. 缓冲液

- i. 偶合缓冲液(0.1M NaHCO₃,含 0.5M NaCl)
- ii. 1.0M Tris 缓冲液,pH8.0
- iii. 100mM 乙酸钠缓冲液,pH4.0,含 0.5m NaCl
- iv. 100mM 硼酸钠缓冲液,pH9.0,含 0.5M NaCl
- v. 0.1%(v/v)戊二醛水溶液

2. 步骤

在 1g 潮湿的固体载体中加入溶于 5ml 偶合缓冲液的 100mg 血红蛋白或肌红蛋白。在室温下将混合物颠倒混和 2 小时。用偶和缓冲液和水洗涤固体载体,并加入 pH8 的 1.0M Tris 缓冲液,然后在室温下,将悬浮液孵育 2 小时以灭活固体载体上的活性位点。先用 pH4.0 的乙酸缓冲液洗再用硼酸缓冲液洗,如此洗涤 3 次以由载体上去除未结合的物质。若是肌红蛋白衍生载体,最后用蒸馏水洗,用前将该潮湿的悬浮液保存于 4℃。若是血红蛋白衍生载体,在前述过程后,再加入 5ml0.1%的戊二醛溶液,并将溶液于 4℃放置过夜。先用 pH4.0 的乙酸缓冲液洗再用 pH8.0 的硼酸缓冲液洗,如此三次以从载体上去除未结合物质。最后用蒸馏水洗,用前将该含水的悬浮液保存于 4℃。

F. 辣根过氧化物酶(HRPO)醛在血红蛋白或肌红蛋白衍生载体上的固定

1. 材料

a. 按制备 D 所述方法制备的 HRPO 醛

b. 按制备 E 所述方法制备的血红蛋白或肌红蛋白衍生固体载体

c. 100mM 氰基硼氢化钠

d. 1.0M NaCl

e. 蒸馏水

2. 步骤

将在制备 D 中从 P-30 柱上回收的 3mlHRPO 醛(30mg)加入 1g 制备 E 中所述的血红蛋白和肌红蛋白衍生固体载体中。悬浮液在 4℃孵育 16 小时,然后在室温下孵育 4 小时。用蒸馏水和 1.0M NaCl 洗三次以从载体上去除未结合物质。然后在 5ml 100mM 的氰基硼氢化钠中于 4℃将固体载体孵育过夜。最后用蒸馏水洗,并在使用前将含水的悬浮液保存于 4℃。

G. 醛活化的 Sigmacell® 20 的制备

1. 材料

a. Sigmacell® 20(Sigma Chemical Co. 出品)

b. 蒸馏水

c. 固体高碘酸钠

d. 20mM 碳酸氢钠,pH9.5

2. 步骤

固体高碘酸钠(428mg)加入 1g 悬于 10ml 蒸馏水中的 Sigma-cell® 中。混和物在室温下连续旋转 2 小时。离心分离微球体,用 10ml 蒸馏水洗 5 次,用 10mlpH9.5,20mM 的碳酸氢钠洗一次。该树脂制备后应立即使用。

H. 血红蛋白和肌红蛋白与醛活化的 Sigmacell® 20 的共价连接

1. 材料

- a. 醛活化的 Sigmacell® 20(制备 G)
- b. 蒸馏水
- c. 100mM 氰基硼氢化钠
- d. 人血红蛋白和马心脏的肌红蛋白(均由 Sigma chemical Co. 出品)
- e. 缓冲液

- i. 20mM 碳酸氢钠, pH9.5
- ii. 50mM 乙醇胺, pH9.5
- iii. 1.0M Tris 缓冲液, pH8.0
- iv. 100mM 乙酸钠缓冲液, pH4.0, 含 0.5M NaCl
- v. 20mM MES 缓冲液, pH5.0

2. 步骤

50mg 溶于 9ml NaHCO_3 液中的肌红蛋白或血红蛋白加入 1ml 醛活化的 Sigmacell® 20(制备 G)中。悬浮液在室温下旋转过夜,离心分离沉淀。用 10ml 水洗涤沉淀。加入 pH9.5 的 9ml 50mM 乙醇胺,室温下将混和物连续旋转 1 小时。离心分离沉淀,依次用 10ml 的乙酸缓冲液,Tris 缓冲液,MES 缓冲液洗涤沉淀。加入 20mL 的 100mM 的氰基硼氢化钠的水溶液,混合物在室温下连续转动孵育一小时,然后 4℃ 孵育过夜。孵育过夜后,用 10ml 蒸馏水洗涤衍生后载体 5 次,再用 10ml MES 缓冲液洗 2 次。

I. 固定在醛激活的 Sigmacell® 20 上的血红蛋白或肌红蛋白与 HRPO 醛的共价连接

- 1. 材料
 - a. 血红蛋白或肌红蛋白衍生的 Sigmacell® 20(制备 H)
 - b. 蒸馏水
 - c. 100mM 氰基硼氢化钠
 - d. 缓冲液

- i. 100mM Tris 缓冲液, pH8.0, 含 0.5M NaCl
- ii. 100mM 乙酸钠缓冲液, pH4.0, 含 0.5M NaCl
- iii. 20mM EMS 缓冲液, pH5.0

c. 醛活化的 HRPO(制备 D)

2. 步骤

将 20mg 溶于 2mL pH5.0 的 MES 缓冲液中的脱盐 HRPO 醛(制备 D)加入 1g 血红蛋白或肌红蛋白衍生的 Sigmacell® 20(制备 H), 该悬浮液于室温下转动 1 小时, 然后于 4℃ 孵育过夜。离心分离载体, 用 10mL 蒸馏水洗涤 2 次。加入 20mL 100mM 的氰基硼氢化钠, 悬浮液于 4℃ 孵育 60 小时。沉淀以下述溶液次序洗涤 2 次: 蒸馏水; 乙酸缓冲液; Tris 缓冲液; 和 MES 缓冲液。

J. 血红蛋白与购得的 Eupergit® C 丙烯酸珠的共价连接

1. 材料

- a. 环氧乙烷丙烯酸珠(Eupergit® C Sigma Chemical Co. 制品)
- b. 人血红蛋白(IV 型, Sigma Chemical Co. 出品)
- c. 缓冲液和溶液

- i. 1.0M 磷酸钾缓冲液, pH7.5, 含 0.1% 叠氮化钠(w/v)
- ii. 1.0M NaCl
- iii. 5%(v/v) 巯基乙醇, 用 0.5M NaOH 调 pH 至 8.0
- iv. 100mM 磷酸钾缓冲液, pH7.4
- v. 500mM 磷酸钾缓冲液, pH7.4
- vi. 3.5M 硫氰酸钠
- vii. 磷酸盐缓冲液(PBS)(0.01M 磷酸钠, pH7.2, 含 0.15M NaCl)

d. 蒸馏水

2. 步骤

血红蛋白(125mg)溶于 5ml 含有叠氮化钠, pH7.5, 1.0M 磷酸

缓冲液中,将其加入 1g Eupergit® C。混合物在室温下,不搅拌孵育 72 小时。载体用 1.0M NaCl 洗 3 次,用蒸馏水洗 5 次。载体与预调 pH 至 8.0 的巯基乙醇混和,悬浮液于室温静置过夜。(丙烯酸)珠子用蒸馏水洗 10 次,放在一个烧结玻璃漏斗上,依次以 50ml 以下溶液洗涤:0.5M 磷酸钾缓冲液,pH7.5;0.1M 磷酸钾缓冲液,pH7.5;3.5M 硫氰酸钠;并在最后用大量磷酸盐缓冲液(PBS)(0.01M 磷酸钠,pH7.2,含 0.15M NaCl)洗。衍生珠用 0.1%(v/v)的戊二醛处理同时在室温下转动 2 小时,4℃过夜,然后用蒸馏水洗。

K. HRPO 醛(制备 D)与血红蛋白衍生 Eupergit® C(制备 J)的共价连接

1. 材料

- a. HRPO 醛(制备 D)
- b. 血红蛋白衍生 Eupergit® C(制备 J)
- c. 100mM 氰基硼氢钠
- d. 1.0M NaCl
- e 蒸馏水

2. 步骤

将溶于 3mL MES 缓冲液中的 30mg HRPO 醛(制备 D)加入 1g 血红蛋白衍生 Eupergit® C(制备 J)中。悬浮液在 4℃孵育 16 小时,再在室温下孵育 4 小时。用蒸馏水和 1.0M NaCl 洗三次以从载体上去除未结合物质。然后将固体介质在氰基硼氢钠中,于 4℃孵育 60 小时。最后用蒸馏水洗涤,将含水悬浮液在 4℃保存至使用。

L. 酪蛋白-HRPO 与聚二醛的共价连结

1. 材料

- a. 溶于 2mL pH9.0,100mM 硼酸缓冲液中的由酰肼法制备的 25mg kappa-酪蛋白-HRPO 共轭物。
- b. 聚二醛(Sigma Chemical Co. 出品)

c. 缓冲液:

- i. 100mM 乙醇胺 pH9.5
 - ii. 100mM 硼酸钠缓冲液, pH9.0, 含 0.5M NaCl
 - iii. 100mM 乙酸钠缓冲液, pH9.0, 含 0.5M NaCl
 - iv. 50mM MES 缓冲液, pH6.0
- d. 100mM 甲醛
- e. 100mM 氰基硼氢钠

2. 步骤

按制备 B 的方法制备 2mL 的 kappa-酪蛋白-HRPO 共轭体, 并在一处改动为: 省略甲醛处理。该溶液与 3mL MES 缓冲液混和, 再将此溶液加入 1g 的聚二醛中。该悬浮液在室温下转动 6 小时, 然后于 4℃ 孵育过夜。在该悬浮液中加入 200μL 的 100mM 甲醛, 该混合物于室温下孵育 1 小时。离心分离树脂, 水洗, 以 3mL pH8.5, 100mM 乙醇胺重悬。在室温下转动孵育 2 小时后, 依次以乙酸缓冲液, 硼酸缓冲液和水洗涤树脂。然后固体载体在 5mL 100mM 氰基硼氢钠中于 4℃ 孵育过夜。最后用蒸馏水洗, 将含水悬浮液于 4℃ 保存至使用。

M. HRPO-标记(醛法)完整酪蛋白或 Kappa-酪蛋白在 Eupergit® C 丙烯酸珠上的固定

1. 材料

- a. 环氧乙烷丙烯酸珠 (Eupergit® C, Sigma Chemical Co. 出品)
- b. 牛的完整酪蛋白或 kappa-酪蛋白 (Sigma Chemical Co. 出品)

c. 缓冲液和溶液

- i. 100mM 碳酸氢钠缓冲液, pH8.5, 含 0.5M NaCl
- ii. 100mM 乙酸钠缓冲液, pH4.0, 含 0.5M NaCl

- iii. 100mM Tris 缓冲液, pH8.0, 含 0.5M NaCl
- iv. 20mM MES 缓冲液, pH5.0
- v. 5%(v/v) 巯基乙醇的水溶液
- vi. 200mM 硼氢化钠的水溶液

2. 步骤

a. 酪蛋白或 kappa-酪蛋白在 Eupergit® C 珠上的共价连接

将 2mL 溶于 pH8.5, 含 0.5M NaCl, 100mM 碳酸氢钠缓冲液中的完整酪蛋白或 Kappa-酪蛋白溶液(10mg/mL)加入 1ml 悬于水中的 Eupergit® C 珠中。混合物在室温下转动孵育 48 小时。离心分离颗粒物, 依次以 9ml 的乙酸和 Tris 缓冲液洗涤, 再用 9mL MES 缓冲液洗 2 次。加入 10mL 5% 的巯基乙醇后, 混合物在室温下转动混和孵育过夜。离心分离酪蛋白-衍生载体, 用 9mL MES 缓冲液洗 4 次。

b. 用 HRPO 标记固定在 Eupergit® C 上的酪蛋白

在由上述部分 A 制备的酪蛋白-衍生 Eupergit® C 中加入 3ml 醛活化的 HRPO(制备 D),

混合物在室温下转动孵育 1 小时再在 4℃ 孵育 60 小时。离心分离沉淀, 用 10ml 的水洗涤 2 次, 加入 5mL 硼氢化钠溶液后, 混和物在室温下转动混和孵育 6 小时。离心分离沉淀, 依次用 9ml 乙酸, Tris, 乙酸, Tris 和 MES 缓冲液洗涤。

N. 肌红蛋白-HRPO 与聚二醛的共价连接

1. 材料

a. 溶于 2ml 20mM 碳酸氢钠缓冲液的 30mg 马心肌红蛋白, pH9.5

b. 聚二醛(纤维素聚二醛, 购自 Sigma Chemical Co.)

c. 缓冲液

- i. 50mM 乙醇胺 pH9.5

- ii. 100mM 硼酸钠缓冲液, pH9.0, 含 0.5M NaCl
- iii. 100mM 乙酸钠缓冲液, pH4.0 含 0.5M NaCl
- iv. 50mM MES 缓冲液, pH6.0
- v. 100mM Tris 缓冲液, pH8.0, 含 0.5M NaCl
- d. 100mM 甲醛
- e. 100mM 氰基硼氢钠水溶液

2. 步骤

a. 肌红蛋白与聚二醛的共价连接

2ml 肌红蛋白溶液与 1mL 聚二醛的悬浮液混和;

混合物在室温下转动孵育过夜。离心分离树脂, 用 10mL 水洗 2 次。加入 9mL 乙醇胺溶液后, 混和物在室温下转动混和孵育 1 小时。离心分离树脂, 依次用 10ml 乙酸, Tris 和 MES 缓冲液洗。加入 20mL 氰基硼氢钠。悬浮液在 4℃ 孵育过夜。肌红蛋白-衍生的聚二醛用 10ml 水洗 5 次, 用 MES 缓冲液洗 2 次。

b. 用 HRPO 醛(制备 D)标记肌红蛋白-衍生珠

在树脂中加入 2mL 脱盐的 HRPO 醛(制备 D), 混合物在室温下转动孵育 1 小时, 再在 4℃ 孵育过夜离心分离树脂, 用 10mL 水洗 2 次后, 悬于 20ml 氰基硼氢钠中, 4℃ 孵育 60 小时。离心分离树脂, 用 10ml 水洗 2 次, 然后依次用 10ml 乙酸/NaCl 和 Tris/NaCl 缓冲液洗 4 次。最后用 10ml MES 缓冲液洗涤树脂, 保存于 4℃ 至使用。

O. HRPO 标记的几丁质的制备及其在几丁质酶测试中的应用

1. 材料

- a. 溴化氰活化的几丁质(制备 A)
- b. HRPO (Ⅱ型, Sigma Chemical Co. 出品, 78 单位/mg)
- c. 几丁质酶(EC3. 2. 1. 14, 分离自 Streptomyces griseus 并由 Sigma Chemical Co. 出品)
- d. 缓冲液

- i. 500mM Tris/MES 缓冲液, pH5.4
- ii. 偶合缓冲液, (0.1M NaHCO_3 , 含 0.5M NaCl)
- iii. 100mM 乙酸钠缓冲液, pH4.0, 含 0.5M NaCl
- iv. 100mM 硼酸钠缓冲液, pH8.0, 含 0.5M NaCl
- v. 1.0M Tris 缓冲液, pH8.0

e. ABTS 测试混和物: 400 μL 25mg/mL ABTS(2,2'-连氨基-二[3-乙基苯噻唑啉磺酸, 二铵盐]; 10 μL 1%(v/v)过氧化氢; 950 μL 水

2. 步骤

a. HRPO-衍生几丁质的制备

将 500mg 溴化氰活化的几丁质(制备 A)悬浮于 5ml 偶合缓冲液中, 加入 5mg HRPO, 在室温下颠倒混和悬浮液 2 小时。用蒸馏水和偶合缓冲液洗涤固体物质。在载体中加入 3ml pH8.0, 1.0M Tris 缓冲液, 室温下搅拌 2 小时, 然后依次用乙酸和硼酸缓冲液洗 3 次, 最后用水洗。

b. 几丁酶分析

用 200 μL MES/Tris 缓冲液悬溶 50mg MRPO 标记的几丁质。加入 50 μL 几丁酶溶液(50 单位/mL), 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 小时。离心沉淀反应混合物中的几丁质, 以 10 μL 上清液为一份与 100 μL 的 ABTS 测试混合物混和。溶液中有绿色产生, 说明 HRPO 由几丁酶催化而从几丁质上释放。

P. 溴化氢活化的琼脂糖-酪蛋白或 kappa-酪蛋白-HRPO 酶的制备

1. 材料

a. CNBr 活化的琼脂糖(Sepharose)(制备 A)

b. 10mg/mL 的溶于偶合缓冲液(0.1M NaHCO_3 , 含 0.5M NaCl)中的酪蛋白或 kappa-酪蛋白溶液

c. 缓冲液和溶液

- i. 50mM 乙醇胺 pH9.5
- ii. 100mM 硼酸钠缓冲液, pH9.0, 含 0.5M NaCl
- iii. 100mM 乙酸钠缓冲液, pH4.0 含 0.5M NaCl
- iv. 20mM MES 缓冲液, pH5.0
- v. 100mM Tris 缓冲液, pH8.5 含 0.5M NaCl
- vi. 100mM 硼氢钠水溶液

d. HRPO 醛(制备 D)

2. 步骤

在 1mL 溴化氰活化的琼脂糖(Sepharose)中加入 2mL 酪蛋白或 kappa-酪蛋白溶液, 室温下, 悬浮液转动孵育 2 小时。加入 7mL 乙醇胺溶液, 混合物在室温下孵育 1 小时。离心分离树脂, 依次用 9ml 含 NaCl 的乙酸和 Tris 缓冲液洗涤, 再用 9ml 的 MES 缓冲液洗 2 次。

加入 3ml 脱盐 HRPO 醛(制备 D), 室温下转动混合物 1 小时, 再在 4℃孵育过夜。离心分离树脂, 用 10mL 水洗 2 次。用 10mL 硼氢化钠悬浮树脂, 混合物在室温下孵育 2 小时。最后, 离心分离树脂, 依次用 9mL 含有 0.5M NaCl 的下列缓冲液洗涤: 乙酸; Tris; 乙酸; 和 Tris。最后用 9mL MES 缓冲液洗涤树脂, 并于 4℃保存于 MES 缓冲液中直至使用。

Q. 肌红蛋白与牛血清白蛋白与磨碎的 Eupergit® C 丙烯酸珠(Eupergit® C)的共价连接及其后的以辣根过氧化物酶标记(醛法)。

第一步: 肌红蛋白和牛血清白蛋白与 Eupergit® 丙烯酸珠(Eupergit® C)的共价连接

1. 材料

a. 环氧乙烷丙烯酸珠(Eupergit® C, Sigma Chemical Co. 出品的 150 微米珠)

b. 马心肌红蛋白(N型)或牛血清白蛋白(Sigma Chemical Co. 出品)

c. 缓冲液和溶液

- i. 1.0M 磷酸钾缓冲液, pH7.5, 含 0.1% 叠氮化钠(w/v)
- ii. 1.0M NaCl
- iii. 5%(v/v) 巯基乙醇, 用 0.5M NaOH 调 pH 至 8.0
- iv. 100mM 磷酸钾缓冲液, pH7.5
- v. 500mM 磷酸钾缓冲液, pH7.5
- vi. 3.5M 硫氰酸钠
- vii. 磷酸盐缓冲液(PBS)(0.01M 磷酸钠, pH7.2, 含 0.15M NaCl)

d. 蒸馏水

2. 步骤

用研钵和研杵将 1g 环氧乙烷丙烯酸珠手工磨成细粉。将肌红蛋白或牛血清白蛋白(125mg)溶于 5mL, pH7.5, 含叠氮化钠的 1.0M 磷酸缓冲液中, 并将其加入 1g 磨细的 Eupergit® C 中。混和物在室温下孵育 72 小时, 不搅拌。离心分离后, 载体用 1.0M NaCl 离心洗涤三次, 用 20mL 蒸馏水洗 5 次。将载体与 2.5mL pH 预调至 8.0 的巯基乙醇混和, 悬浮液在室温下静置过夜。微珠用蒸馏水离心洗涤 10 次, 再依次用 50mL 下述溶液洗涤: 0.5M 磷酸钾缓冲液, pH7.5; 0.1M 磷酸钾缓冲液, pH7.5; 3.5M 硫氰酸钠; 最后用大量的磷酸盐缓冲液(PBS)(0.01M 磷酸钠, pH7.2, 含 0.15M NaCl)来洗涤。

第 2 步: 用辣根过氧化物酶进行共价标记(醛法)

按步骤 F 中的方法, 用辣根过氧化物酶(制备 D)标记由上述第一步制得的肌红蛋白或清蛋白衍生的丙烯酸珠。

R. 与 HRPO 连接的 Sigmacell® 20 肌红蛋白与戊二醛的偶合

1. 材料

- a. 共价固定在溴化氰活化的 Sigmacell® 20 上的肌红蛋白(制备 E)

- b. 0.5M MES 缓冲液, pH5.0
- c. 1%(v/v)戊二醛水溶液
- d. HRPO-酰肼(Sigma chemical Co. 出品, 200 单位/mg)
- e. 100mM 甲醛
- f. 100mM 氰基硼氢钠
- g. 0.5M NaCl

2. 步骤

在 1g 肌红蛋白与 Sigmacell® 20 的混合物中加入 1mL 戊二醛溶液,并在室温下转动 30 分钟,再用水洗。在洗涤过的树脂中加入 5mg 溶于 2mL 100mM MES 缓冲液中的 HRPO 醛,并在室温下转动悬浮液 4 小时。加入 200 μ L 100mM 甲醛溶液,混合物在室温下孵育 30 分钟。用水洗涤树脂,用 5mL 100mM 氰基硼氢钠悬浮,并于 4℃ 孵育过夜。然后用蒸馏水和 0.5M NaCl 洗涤树脂,并保存此潮湿的膏状物直至使用。

S. 愈创木脂溶液和愈创木脂板的制备

1. 愈创木脂,羟基丙基纤维素溶液(即愈创木脂墨水)

将 150g 粉状愈创木脂在搅拌下溶于 660ml 温热的乙醇。在所得溶液中加入 1330mL 蒸馏水,并将所得的悬浮液冷却至室温。2 小时后,倾析法弃上清,保留剩余悬浮液。

250mL 10%(w/w)的羟基丙基纤维素的乙醇溶液与另外的 250mL 乙醇混和,所得溶液加入愈创木酯浆中。搅拌该混和物直至愈创木脂完全溶解。

2. 愈创木脂板

将 1mL 上述愈创木脂溶液移至一张 10 英寸×10 英寸的聚酯薄膜(Mylar)/聚乙烯层压板(7 密耳 Mylar/3 密尔聚乙烯)的聚乙烯表面上。用一根标准的绕线测试棒将愈创木脂溶液铺展在层压板表面,室温下干燥。

T. 高硼酸钠悬浮液(即高硼酸钠墨水原料的制备)

将 20g 固体高硼酸钠细粉与足量的 10%(w/w)的羟基丙基纤维素(溶于无水乙醇)溶液混和,从而形成 1L 悬浮液。

II 实验

实 验 I

本实验涉及因 Candida albicans 孵育物中天冬氨酸蛋白酶的作用而导致的 HRPO 由[琼脂糖—酪蛋白-HRPO]和[琼脂糖-kappa-酪蛋白-HRPO]上的解离。

A. 材料:(溴化氢活化的琼脂糖)(HRPO 醛偶和法)

1. 先由酪蛋白或 kappa-酪蛋白共价衍生(制备 P)的溴化氢活化的 Sepharose 4B (制备 A)
2. 如 Journal of General Microbiology, (1983)129:431-438 中所述,液体孵育的产天冬氨酸蛋白酶的 Candida albicans (ATCC 28366)孵育物
3. 愈创木脂层合板(制备 S)
4. 缓冲液和溶液
 - a. 20mM 过氧化氢
 - b. 500mM MES 缓冲液, pH6.0

B. 步骤

将 10mg(湿重)[琼脂糖-酪蛋白-HRPO]共轭物(或与之相当的 kappa-酪蛋白)分别悬浮于 300 μ L 含有分泌出的活性天冬氨酸蛋白酶和经煮沸 20 分钟以灭活天冬氨酸蛋白酶的 Candida albicans 孵育物中。室温下,将混和合转动 15 分钟,离心沉淀固体共轭物和 Candida albicans 细胞。

取 80 μ L 上清液与 10 μ L 过氧化氢和 10 μ L MES 缓冲液混和。分别取 20 μ L 的两种溶液加到创木脂层合板上,检测该板上蓝色的形成情况。

比色值	说 明
0	无可见的蓝色形成
+/-	可能有蓝色
0.25	可目测的微弱蓝色
0.5	明显的蓝色
1.0	深蓝色
1.5	深度在 1.0 和 2.0 之间的蓝色
2.0	测试系统中可能得到的最深的蓝色

C. 结果

在愈创木脂层合板上加有经 *Candida albicans* 处理的琼脂糖-蛋白质-HRPO 上清液的区域呈深蓝色。加有经煮沸过的孵育物处理的琼脂糖-蛋白质-HRPO 上清液的区域不显色。

酶来源	比色值
孵育物	1.5
煮沸过的孵育物	0

D. 解释

由 *Candida albicans* 分泌入孵育液的活性天冬氨酸蛋白酶水解了与琼脂糖结合的酪蛋白或 kappe 酪蛋白, 释放出可溶的活性 HRPO。经离心沉淀与琼脂糖结合的 HRPO 后, 在溶液中只留下天冬氨酸蛋白酶—可溶性 HRPO。这些可溶性 HRPO 催化过氧化氢对愈创木脂的氧化, 由此生成蓝色。所以, 愈创木脂层合板上蓝色的生

成提供了一种检测天冬氨酸蛋白酶的简便方法。

煮沸孵育液灭活了由 Candida albicans 细胞分泌入其中的天冬氨酸蛋白酶。所以,与琼脂糖结合的酪蛋白或 kappa-酪蛋白不会被水解,可溶性的活性 HRPO 不能由载体上解离。经离心沉淀与琼脂糖结合的 HRPO 后,溶液中无天冬氨酸蛋白酶-可溶性 HRPO 存在。无法催化过氧化氢对愈创木脂的氧化,因而只生成勉强可测得的蓝色。这些 HRPO 由载体上的解离可能是孵育基中盐或其他组分造成 HRPO 的非特异性解离等复杂原因造成的。

II 实验

实验 II

本实验涉及因 Candida albicans 孵育物中天冬氨酸蛋白酶的作用而导致的 HRPO 由[Eupergit® C 丙烯酸珠-酪蛋白-HRPO]和[Eupergit® C 丙烯酸珠-kappa-酪蛋白-HRPO]上的解离。

A. 材料:(溴化氢活化的 Eupergit® C 丙烯酸珠(HRPO 醛偶和法)

1. 用酪蛋白或 kappa-酪蛋白处理环氧乙烷丙烯酸珠(Eupergit® C)(制备 M)然后用 HRPO 醛标记(制备 D)。
2. 如 Journal of General Microbiology, (1983)129:431-438 中所述,液体孵育的产天冬氨酸蛋白酶的 Candida albicans (ATCC 28366)孵育物
3. 愈创木脂层合板(制备 S)
4. 缓冲液和溶液
 - a. 20mM 过氧化氢
 - b. 500mM MES 缓冲液, pH6.0

B. 步骤

将 10mg(湿重)[Eupergit® C-酪蛋白-HRPO]共轭物(或与之相当的 kappa-酪蛋白)分别悬浮于 300 μ L 含有分泌出的活性天冬氨酸蛋白酶和经煮沸 20 分钟以灭活天冬氨酸蛋白酶的 Candida albicans

孵育物中。室温下，将混和合转动 15 分钟，离心沉淀固体共轭物和 *Candida albicans* 细胞。

取 80μL 上清液与 10μL 过氧化氢和 10μL MES 缓冲液混和。分别取 20μL 的两种溶液加到创木脂层合板上，检测该板上蓝色的形成情况。

比色值	说 明
0	无可见的蓝色形成
+/-	可能有蓝色
0.25	可目测的微弱蓝色
0.5	明显的蓝色
1.0	深蓝色
1.5	深度在 1.0 和 2.0 之间的蓝色
2.0	测试系统中可能得到的最深的蓝色

C. 结果

在愈创木脂层合板上加有经 *Candida albicans* 处理的[Eupergit® C-蛋白质-HRPO]上清液的区域呈深蓝色。加有经煮沸过的孵育物处理的[Eupergit® C 蛋白质-HRPO]上清液的区域不显色。

酶来源	比色值
孵育物	1.5
煮沸过的孵育物	0

D. 解释

由 Candida albicans 分泌入孵育液的活性天冬氨酸蛋白酶水解了与 Eupergit® C 结合的酪蛋白或 kappa 酪蛋白,释放出可溶的活性 HRPO。经离心沉淀与 Eupergit® C 结合的 HRPO 后,在溶液中只留下天冬氨酸蛋白酶—可溶性 HRPO。这些可溶性 HRPO 催化过氧化氢对愈创木脂的氧化,由此生成蓝色。所以,愈创木脂层合板上蓝色的生成提供了一种检测天冬氨酸蛋白酶的简便方法。

煮沸孵育液灭活了由 Candida albicans 细胞分泌入其中的天冬氨酸蛋白酶。所以,与 Eupergit® C 结合的酪蛋白或 kappa-酪蛋白不会被水解,可溶性的活性 HRPO 不能由载体上解离。经离心沉淀与 Eupergit® C 结合的 HRPO 后,溶液中无天冬氨酸蛋白酶-可溶性 HRPO 存在。无法催化过氧化氢对愈创木脂的氧化,因而只生成勉强可测得的蓝色。这些 HRPO 由载体上的解离可能是孵育基中盐或其他组分造成 HRPO 的非特异性解离等复杂原因造成的。

实验 III

本实验涉及因 Aspergillus saitoi 孵育物中天冬氨酸蛋白酶的作用而导致的 HRPO 由[琼脂糖-血红蛋白-HRPO]和[琼脂糖-肌红蛋白-HRPO]上的解离。

A. 材料:(溴化氢活化的琼脂糖)(HRPO 醛偶和法)

1. 先由血红蛋白或肌红蛋白共价衍生(制备 E)的溴化氢活化的 Sepharose 4B(制备 A),然后以 HRPO 醛标记(制备 D 和 F)。在室温下,该共轭物由氰基硼氢钠处理过夜,使用前用 0.5M NaCl 洗涤。
2. 测试溶液:a. 购得的由 Asperigillus saitoi 分泌的天冬氨酸蛋白酶(XIII 型)(30mg/mL, 0.6 单位/mg);b. 胃蛋白酶(1mg/mL, 2900 单位/mg);和 C. 牛血清白蛋白(BSA)(2mg/mL 水溶液)(均购自 Sigma Chemical Co.)。
3. 愈创木酯浸渍过的纸片,即可购得的 Hemocult® 薄片

(Smithkline Diagnostics 出品)

4. 缓冲液和溶液

- a. 含 0.02%(v/v)过氧化氢的 200mM 磷酸缓冲液溶液, pH7.0
- b. 100mM 乙酸缓冲液, pH4.0

B. 步骤

将 40mg(湿重)的[琼脂糖-血红蛋白-HRPO](或代以肌红蛋白)共轭物悬浮于 75 μ l pH4.0 的乙酸缓冲液中, 并加入 25 μ l 的测试液。该悬浮液在室温下孵育 15 分钟, 然后离心分离固体共轭物。在一张愈创木脂薄片上加 5 μ l 的上清液, 再加 5 μ l 过氧化氢溶液。

比色值	说 明
0	无可见的蓝色形成
+/-	可能有蓝色
0.25	可目测的微弱蓝色
0.5	明显的蓝色
1.0	深蓝色
2.0	测试系统中可能得到的最深的蓝色

C. 结果

在愈伤木脂浸润片上加有含由 *Aspergillus saitoi* 分泌的天冬氨酸蛋白酶或胃蛋白酶的上清液的区域显深蓝色。在加有只含 BSA (2mg/ml) 的上清液或缓冲液的区域, 只可看见极淡的颜色。

酶来源	比色值
天冬氨酸蛋白酶	2.0
胃蛋白酶	2.0
BSA	+/-
缓冲液	+/-

D. 解释

活性 Aspergillus saitoi 天冬氨酸蛋白酶和胃蛋白酶——一种来源于猪胃的天冬氨酸蛋白酶、水解了与琼脂糖结合的酪蛋白或 kappa 酪蛋白,释放出可溶的活性 HRPO。经离心沉淀与琼脂糖结合的 HRPO 后,在溶液中只留下酶-可溶性 HRPO。这些可溶性 HRPO 催化过氧化氢对创木脂的氧化,由此生成蓝色。所以,愈创木脂层合板上蓝色的生成提供了一种检测活性 Aspergillus 天冬氨酸蛋白酶或猪胃蛋白酶的简便方法。

BSA 和缓冲液没有天冬氨酸蛋白酶活性。所以,与琼脂糖结合的酪蛋白或 kappa-酪蛋白不会被水解,可溶性的活性 HRPO 不能由载体上解离。经离心沉淀与琼脂糖结合的 HRPO 后,溶液中无酶-可溶性 HRPO 存在。无法催化过氧化氢对愈创木脂的氧化,因而只生成勉强可测得的蓝色。

实验 IV

本实验涉及因 Asperigillus saitoi 孵育物中天冬氨酸蛋白酶和胃蛋白酶作用而导致的 HRPO 由[琼脂糖-酪蛋白-HRPO]和[琼脂糖-kappa-酪蛋白-HRPO]上的解离。

A. 材料:(溴化氢活化的琼脂糖)(HRPO 酰肼偶和法)

1. 令溴化氢活化的 Sepharose 4B(制备 A)与 kappa-酪蛋白-

HRPO 或酪蛋白-HRPO(酰肼法)(制备 B 和 C)

2. 测试溶液:a. 购得的由 Asperigillus saitoi 分泌的天冬氨酸蛋白酶(XIII 型)(30mg/mL, 0.6 单位/mg); b. 胃蛋白酶(1mg/mL, 2900 单位/mg); 和 c. 牛血清白蛋白(BSA)(2mg/mL 水溶液)(均购自 Sigma Chemical co.)
3. 愈创木脂浸渍过的纸片, 即可购得的 Hemocult® 薄片
4. 缓冲液和溶液
 - a. 含 0.02%(v/v 过氧化氢的 200mM 磷酸缓冲液溶液, pH7.0
 - b. 100mM 乙酸缓冲液, pH4.0

B. 步骤

将 40mg(湿重)的[琼脂糖-酪蛋白-HRPO](或以的 kappa 酪蛋白)共轭物悬浮于 75 μ L pH4.0 的乙酸缓冲液中, 并加入 25 μ L 的测试液, 该悬浮液在室温下孵育 15 分钟, 然后离心分离固体共轭物。在一张愈创木脂薄片上加 5 μ L 的上清液, 再加 5 μ l 过氧化氢溶液。

比色值	说 明
0	无可见的蓝色形成
+/-	可能有蓝色
0.25	可目测的微弱蓝色
0.5	明显的蓝色
1.0	深蓝色
2.0	测试系统中可能得到的最深的蓝色

C. 结果

在愈伤木脂浸润片上加有含由 Aspergillus saitoi 分泌的天冬氨酸蛋白酶或胃蛋白酶的上清液的区域呈深蓝色。在加有只含 BSA

(2mg/mL)的上清液或缓冲液的区域,只可看见极淡的颜色。

酶 源	比色值
天冬氨酸蛋白酶	2.0
胃蛋白酶	2.0
牛血清白蛋白	+/-
缓冲液	+/-

D. 说明

活性的Aspergillus saitoi 天冬氨酸蛋白酶和猪胃蛋白酶水解了琼脂糖结合的酪蛋白或卡巴-酪蛋白,将可溶的活性 HRPO 释放了出来。通过离心将琼脂糖结合的 HRPO 沉淀出来,仅将藉酶溶化的 HRPO 留在了溶液中。可溶的 HRPO 催化了过氧化氢对愈创木脂的氧化,产生了蓝颜色。因此,在涂有愈创木脂的片层上呈现蓝颜色,为检测天冬氨酸蛋白酶和胃蛋白酶提供了一个方便的方法。

BSA 和缓冲液都不具有天冬氨酸蛋白酶活性。因此琼脂糖结合的酪蛋白或卡巴酪蛋白不会被水解,也没有可溶的活性 HRPO 从载体上释放出来。通过离心将琼脂糖结合的 HRPO 沉淀出来,但在溶液中并未留下藉天冬氨酸蛋白酶溶化的 HRPO。过氧化氢对愈创木脂的氧化作用未获得催化,结果只呈现勉强看得出的蓝色。

实验 V

本实验是涉及 HRPO 通过胃蛋白酶和Asperillus saitoi 天冬氨酸蛋白酶的作用从[几丁质-卡巴-酪蛋白-HRPO]中的释放。

A. 材料:(溴化氰活化的几丁质)(HRPO 酰肼偶合法)

1. 令溴化氰活化的几丁质(A)与卡巴-酪蛋白-HRPO(酰肼法)(B 和 C)进行反应。

2. 试验溶液:

a. 市售的 Aspergillus saitoi 天冬氨酸蛋白酶(30mg/mL, 0.6 单位/mg);

b. 胃蛋白酶(1mg/mL, 2900 单位/mg);

c. 牛血清白蛋白(BSA)(2mg/mL, 水中)(均购自 Sigma Chemical Co.)

3. 市售 Hemocult® 片形式的愈创木脂浸渍纸(自 Smith Kline Diagnostics)

4. 缓冲液与溶液

a. 含 0.02%(v/v)过氧化氢的 200mM 磷酸盐缓冲液, pH7.0

b. 100mM 醋酸盐缓冲液, pH4.0

B. 步骤

将 40mg(湿重)[几丁质-卡巴-酪蛋白-HRPO]共轭物悬浮在 75 微升 pH 为 4.0 的醋酸盐缓冲液中, 加入 25 微升试验溶液。将此悬浮液在室温下孵育 15 分钟, 然后离心除去固相共轭物。称取 5 微升上清液, 滴加到愈创木脂试片上, 接着滴加 5 微升过氧化氢溶液。

比色值	说 明
0	看不出有蓝色生成
+/-	似有极淡的蓝色
0.25	可见极淡的蓝色
0.5	明显蓝色
1.0	深蓝色
1.5	试验体系中最深的蓝色

C. 结果

仅在愈创木脂试片上滴加了含 Aspergillus saitoi 天冬氨酸蛋白酶或胃蛋白酶的上清液样品中,呈现了深蓝色。而滴加了 BSA(2.0mg/mL)或缓冲液作试液的上清液样品的区域,则只勉强看出极淡的蓝色。

酶 源	比色值
天冬氨酸蛋白酶	2.0
胃蛋白酶	2.0
牛血清白蛋白	+/-
缓冲液	+/-

D. 说明

活性的 Aspergillus saitoi 天冬氨酸蛋白酶和猪胃蛋白酶水解了 Sigmacell® 20 结合的血红蛋白或肌红蛋白,将可溶的活性 HRPO 释放了出来。通过离心将 Sigmacell® 20 结合的 HRPO 沉淀出来,仅将藉酶溶化的 HRPO 留在了溶液中。可溶的 HRPO 催化了过氧化氢对愈创木脂的氧化,产生了蓝颜色。因此,在涂有愈创木脂的片层上呈现蓝颜色,为检测天冬氨酸蛋白酶和胃蛋白酶提供了一个方便的方法。

BSA 和缓冲液都不具有天冬氨酸蛋白酶活性。因此 Sigmacell® 20 结合的血红蛋白或肌红蛋白不会被水解,也没有可溶的活性 HRPO 从载体上释放出来。通过离心将 Sigmacell® 20 结合的 HRPO 沉淀出来,但在溶液中并未留下藉天冬氨酸蛋白酶溶化的 HRPO。过氧化氢对愈创木脂的氧化作用未获得催化,结果只呈现勉强看得出的蓝色。

实验 V I

本实验是涉及 HRPO 通过胃蛋白酶和 Asperillus saitoi 天冬氨酸蛋白酶的作用从 [Sigmacell® 20 血红蛋白-HRPO] 或从 [Sigmacell® 20-肌红蛋白-HRPO] 中的释放。

A. 材料:(溴化氰活化的 Sigmacell® 20)(HRPO 酰肼偶合法)

1. 溴化氰活化的 Sigmacell® 20(制备法 A)先用共价结合的血红蛋白或肌红蛋白(制备法 E)进行衍化,然后用 HRPO 醛(制备法 D-F)作了标记。此共轭物在使用前用 100mM 硼氢化氰钠在室温处理过夜,然后用 0.5M NaCl 水洗。

2. 试验溶液:

a. 市售的 Aspergillus saitoi 天冬氨酸蛋白酶(30mg/mL, 0.6 单位/mg);

b. 胃蛋白酶(1mg/mL, 2900 单位/mg);

c. 牛血清白蛋白(BSA)(2mg/mL, 水中)(均购自 Sigma Chemical Co.)

3. 市售 Hemocult® 片形式的愈创木脂浸渍纸(自 Smith Kline Diagnostics)

4. 缓冲液与溶液

a. 含 0.02%(v/v)过氧化氢的 200mM 磷酸盐缓冲液, pH7.0

b. 100mM 醋酸盐缓冲液, pH4.0

B. 步骤

将 40mg(湿重)[Sigmacell® 20-血红蛋白-HRPO](或肌红蛋白对应物)共轭物悬浮在 75 微升 pH 为 4.0 的醋酸盐缓冲液中,加入 25 微升试验溶液。将此悬浮液在室温下孵育 15 分钟,然后离心除去固相共轭物。称取 5 微升上清液,滴加到愈创木脂试片上,接着滴加 5 微升过氧化氢溶液。

比色值	说 明
0	看不出有蓝色生成
+/-	似有极淡的蓝色
0.25	可见极淡的蓝色
0.5	明显蓝色
1.0	深蓝色
1.5	试验体系中最深的蓝色

C. 结果

仅在愈创木脂试片上滴加了含 Aspergillus saitoi 天冬氨酸蛋白酶或胃蛋白酶的上清液样品的, 呈现了深蓝色。而滴加了 BSA (2.0mg/mL) 或缓冲液作试液的上清液样品的区域, 则只见到极淡的颜色。

酶 源	比色值
天冬氨酸蛋白酶	2.0
胃蛋白酶	2.0
牛血清白蛋白	+/-
缓冲液	+/-

D. 说明

活性的 Aspergillus saitoi 天冬氨酸蛋白酶和猪胃蛋白酶水解了 Sigmacell® 20 结合的血红蛋白或肌红蛋白, 将可溶的活性 HRPO 释放了出来。通过离心将 Sigmacell® 20 结合的 HRPO 沉淀出来, 仅将

藉酶溶化的 HRPO 留在了溶液中。可溶的 HRPO 催化了过氧化氢对愈创木脂的氧化,产生了蓝颜色。因此,在涂有愈创木脂的片层上呈现蓝颜色为检测天冬氨酸蛋白酶和胃蛋白酶提供了一个方便的方法。

BSA 和缓冲剂都不具有天冬氨酸蛋白酶活性。因此 Sigmacell® 20 结合的血红蛋白或肌红蛋白不会被水解,也没有可溶的活性 HRPO 从载体上释放出来。通过离心将 Sigmacell® 20 结合的 HRPO 沉淀出来,但在溶液中并未留下藉天冬氨酸蛋白酶溶化的 HRPO。过氧化氢对愈创木脂的氧化作用未获得催化,结果只呈现勉强看得出的蓝色。

实验 VII

本实验是 HRPO 通过胃蛋白酶和 Asperillus saitoi 天冬氨酸蛋白酶的作用从[Sigmacell® 20-卡巴-酪蛋白-HRPO]中的释放的一个例子。

A. 材料:(溴化氰活化的 Sigmacell® 20)(HRPO 酰肼偶合法)

1. 令溴化氰活化的 Sigmacell® 20(制备法 A)与卡巴-酪蛋白-HRPO(酰肼法)(制备法 B 和 C)进行反应。

2. 试验溶液:

a. 市售的 Aspergillus saitoi 天冬氨酸蛋白酶(30mg/mL, 0.6 单位/mg);

b. 胃蛋白酶(1mg/mL, 2900 单位/mg);

c. 牛血清白蛋白(BSA)(2mg/mL, 水中)(均购自 Sigma Chemical Co.)

3. 市售 Hemocult® 片形式的愈创木脂浸渍纸(自 Smith Kline Diagnostics)

4. 缓冲液与溶液

a. 含 0.02%(v/v)过氧化氢的 200mM 磷酸盐缓冲液, pH7.0

b. 100mM 醋酸盐缓冲液, pH4.0

B. 步骤

将 40mg(湿重)[Sigmacell® 20-卡巴-酪蛋白-HRPO]共轭物悬浮在 75 微升 pH 为 4.0 的醋酸盐缓冲液中,加入 25 微升试验溶液。将此悬浮液在室温下孵育 15 分钟,然后离心除去固相共轭物。称取 5 微升上清液,滴加到愈创木脂试片上,接着滴加 5 微升过氧化氢溶液。

比色值	说 明
0	看不出有蓝色生成
+/-	似有极淡的蓝色
0.25	可见极淡的蓝色
0.5	明显蓝色
1.0	深蓝色
1.5	试验体系中最深的蓝色

C. 结果

仅在愈创木脂试片上滴加了含 *Aspergillus saitoi* 天冬氨酸蛋白酶或胃蛋白酶的上清液样品中,呈现了深蓝色。而滴加了 BSA(2.0mg/mL)或缓冲液作试液的上清液样品的区域,则只见到极淡的颜色。

酶 源	比色值
天冬氨酸蛋白酶	2.0
胃蛋白酶	2.0
牛血清白蛋白	+/-
缓冲液	+/-

D. 说明

活性的 Aspergillus saitoi 天冬氨酸蛋白酶和猪胃蛋白酶水解了 Sigmacell® 20 结合的卡巴-酪蛋白,将可溶的活性 HRPO 释放了出来。通过离心将 Sigmacell® 20 结合的 HRPO 沉淀出来,仅将藉酶溶化的 HRPO 留在了溶液中。可溶的 HRPO 催化了过氧化氢对愈创木脂的氧化,产生了蓝颜色。因此,在涂有愈创木脂的片上呈现蓝颜色,为检测天冬氨酸蛋白酶和胃蛋白酶提供了一个方便的方法。

BSA 和缓冲液都不具有天冬氨酸蛋白酶活性。因此 Sigmacell® 20 结合的卡巴-酪蛋白不会被水解,也没有可溶的活性 HRPO 从载体上释放出来。通过离心将琼脂糖结合的 HRPO 沉淀出来,但在溶液中并未留下藉天冬氨酸蛋白酶溶化的 HRPO。过氧化氢对愈创木脂的氧化作用未获得催化,结果只呈现勉强看得出的蓝色。

实验 VIII

本实验是 HRPO 通过胃蛋白酶和 Asperillus saitoi 天冬氨酸蛋白酶的作用从[Sigmacell® 20 卡巴-酪蛋白-HRPO](酰肼法)中的释放或从 Sigmacell® 20-血红/肌红蛋白-HRPO](醛法)中释放的一个例子。

A. 材料:(溴化氰活化的 Sigmacell® 20)

1. 溴化氰活化的 Sigmacell® 20(制备法 A)用卡巴-酪蛋白与

HRPO(酰肼法)(制备法 B)进行衍化,然后用血红蛋白或肌红蛋白(制备法 E)进行衍化,再与 HRPO 醛(制备法 D)偶合。

2. 试验溶液:

- a. 市售的 Aspergillus saitoi 天冬氨酸蛋白酶(30mg/mL, 0.6 单位/mg);
- b. 胃蛋白酶(1mg/mL, 2900 单位/mg);
- c. 牛血清白蛋白(BSA)(2mg/mL, 水中)(均购自 Sigma Chemical Co.)

3. 市售 Hemocult® 片形式的愈创木脂浸渍纸(自 Smith Kline Diagnostics)

4. 缓冲液与溶液

- a. 含 0.02%(v/v)过氧化氢的 200mM 磷酸盐缓冲液, pH7.0
- b. 100mM 醋酸盐缓冲液, pH4.0

B. 步骤

将 40mg(湿重)[Sigmacell® 20-卡巴-酪蛋白-HRPO]共轭物悬浮在 75 微升 pH 为 4.0 的醋酸盐缓冲液中,加入 25 微升试验溶液。将此悬浮液在室温下孵育 15 分钟,然后离心除去固相共轭物。称取 5 微升上清液,滴加到愈创木脂试片上,接着滴加 5 微升过氧化氢溶液。

比色值	说 明
0	看不出有蓝色生成
+/-	似有极淡的蓝色
0.25	可见极淡的蓝色
0.5	明显蓝色
1.0	深蓝色
1.5	试验体系中最深的蓝色

C. 结果

仅在愈创木脂试片上滴加了含 *Aspergillus saitoi* 天冬氨酸蛋白酶或胃蛋白酶的上清液样品中,呈现了深蓝色。而滴加了 BSA(2.0mg/mL)或缓冲液作试液的上清液样品的区域,则只见到极淡的颜色。

酶 源	比色值
天冬氨酸蛋白酶	2.0
胃蛋白酶	2.0
牛血清白蛋白	+/-
缓冲液	+/-

D. 说明

活性的 *Aspergillus saitoi* 天冬氨酸蛋白酶和猪胃蛋白酶水解了 Sigmacell® 20 结合的卡巴-酪蛋白,将可溶的活性 HRPO 释放了出来。通过离心将琼脂糖结合的 HRPO 沉淀出来,仅将藉酶溶化的

HRPO 留在了溶液中。可溶的 HRPO 催化了过氧化氢对愈创木脂的氧化,产生了蓝颜色。因此,在涂有愈创木脂的片上呈现蓝颜色为检测天冬氨酸蛋白酶和胃蛋白酶提供了一个方便的方法。

BSA 和缓冲剂都不具有天冬氨酸蛋白酶活性。因此 Sigmacell® 20 结合的酪蛋白或卡巴酪蛋白不会被水解,也没有可溶的活性 HRPO 从载体上释放出来。通过离心将琼脂糖结合的 HRPO 沉淀出来,但在溶液中并未留下藉天冬氨酸蛋白酶溶化的 HRPO。过氧化氢对愈创木脂的氧化作用未获得催化,结果只呈现勉强看得出的蓝色。

实验 IX

本实验是 HRPO 通过天冬氨酸蛋白酶的作用从[Sigmacell® 20-血红/肌红蛋白-HRPO]释放到 Candida albicans 孵育物中的一个例子。

A. 材料:(醛活化的 Sigmacell® 20,(HRPO 醛偶合法)

1. 醛活化的 Sigmacell® 20(制备法 G)先用共价结合的血红蛋白或肌红蛋白(制备法 H)进行衍化,然后用 HRPO 醛(制备法 D 和 F)进行标记。

2. 产生 Candida albicans (ATCC 28366)孵育物的天冬氨酸蛋白酶则按 Journal of General Microbiology, (1983)129:431-438 所述在液体孵育物中扩增并生长。

3. 涂以愈创木脂(试剂 S)的试片

4. 缓冲液与溶液

a. 20mM 过氧化氢

b. 500mM MES 缓冲液,pH6.0

B. 步骤

将 10mg(湿重)[Sigmacell® 20-蛋白质-HRPO]共轭物悬浮在 30 微升含分泌的天冬氨酸蛋白酶的 Candida albicans 孵育物中或 30

微升曾煮沸过 20 分钟使天冬氨酸蛋白酶失活的同样 *Candida albicans* 孵育物中。将混合物在室温转动 10 分钟,然后离心将固体共轭物和 *Candida albicans* 细胞沉淀出来。

将 80 微升上清液与 10 微升过氧化氢溶液和 10 微升 MES 缓冲液进行混合。将每种溶液 20 微升加到愈创木脂试片的表面,检视其产生蓝色的情况。

比色值	说 明
0	看不出有蓝色生成
+/-	似有极淡的蓝色
0.25	可见极淡的蓝色
0.5	明显蓝色
1.0	深蓝色
1.5	强度介于 1.0 和 2.0 之间的蓝色
2.0	试验体系中最深的蓝色

C. 结果

仅在愈创木脂试片上滴加了经琼脂糖-蛋白质-HRPO 处理的 *Candida albicans* 的区域呈现深蓝色。而滴加了经煮沸过的琼脂糖-蛋白质-HRPO 处理的孵育物的区域未见到颜色。

酶 源	比色值
<i>Candida Albicans</i> 孵育物	1.5
经煮沸过的孵育物	0

D. 说明

由 Candida albicans 孵育物分泌进入生长孵育基的天冬氨酸蛋白酶使 Sigmacell® 20 结合的蛋白质产生了水解,将可溶的活性 HRPO 释放了出来。通过离心将琼脂结合的 HRPO 沉淀出来,仅将藉天冬氨酸蛋白酶溶化的 HRPO 留在了溶液中。可溶的 HRPO 催化了过氧化氢对愈创木脂的氧化,产生了蓝颜色。因此在涂有愈创木脂的片上呈现蓝颜色,为检测天冬氨酸蛋白酶提供了一个方便的方法。

将孵育物煮沸对由 Candida albicans 细胞分泌进入生长孵育基的天冬氨酸蛋白酶产生了失活作用。因此 Sigmacell® 20 结合的蛋白质不产生水解,因此由载体中并不释放出可溶的活性 HRPO。通过离心使 Sigmacell® 20 结合的 HRPO 沉淀,但在溶液中并未留下经天冬氨酸蛋白酶溶化的 HRPO。过氧化氢对愈创木脂的氧化作用未获得催化,结果只呈现勉强看得见的蓝色。HRPO 从载体的释放并非仅仅是 HRPO 通过存在于生长-孵育基中的盐类或其它组分进行非专性释放的结果。

实验 X

这个实验是 HRPO 通过胃蛋白酶和 Aspergillus saitoi 天冬氨酸蛋白酶的作用从[聚合二醛-卡巴-酪蛋白-HRPO]中释放的一个例子。

A. 材料:(聚合二醛)(HRPO 酰肼偶合法)

1. 令市售自 Sigma Chemical Co. 的聚合二醛与卡巴-酪蛋白-HRPO(酰肼法)(制备法 B 和 L)进行反应。

2. 试验溶液:

a. 市售的 Aspergillus saitoi 天冬氨酸蛋白酶(30mg/mL, 0.6 单位/mg);

b. 胃蛋白酶(1mg/mL, 2900 单位/mg);

c. 牛血清白蛋白(BSA)(2mg/mL,水中)(均购自 Sigma Chemical Co.)

3. 市售 Hemocult® 片形式的愈创木脂浸渍纸(自 Smith Kline Diagnostics)

4. 缓冲液与溶液

a. 含 0.02%(v/v)过氧化氢的 200mM 磷酸盐缓冲液,pH7.0

b. 100mM 醋酸盐缓冲液,pH4.0

B. 步骤

将 40mg(湿重)[聚合二醛-卡巴-酪蛋白-HRPO]共轭物悬浮在 75 微升 pH 为 4.0 的醋酸盐缓冲液中,加入 25 微升试验溶液。将此悬浮液在室温下孵育 15 分钟,然后离心除去固相共轭物。称取 5 微升上清液,滴加到愈创木脂试片上,接着滴加 5 微升过氧化氢溶液。

比色值	说 明
0	看不出有蓝色生成
+/-	似有极淡的蓝色
0.25	可见极淡的蓝色
0.5	明显蓝色
1.0	深蓝色
1.5	强度在 1.0 至 2.0 之间的蓝色
2.0	试验体系中最深的蓝色

C. 结果

仅在愈创木脂试片上滴加了含 Aspergillus saitoi 天冬氨酸蛋白酶或胃蛋白酶的上清液样品中,呈现了深蓝色。而滴加了 BSA(2.

0mg/mL)或缓冲液作试液的上清液样品的区域,则只见到极淡的颜色。

酶 源	比色值
天冬氨酸蛋白酶	2.0
胃蛋白酶	2.0
牛血清白蛋白	+/-
缓冲液	+/-

D. 说明

活性的 Aspergillus saitoi 天冬氨酸蛋白酶和猪胃蛋白酶水解了聚合二醛结合的卡巴-酪蛋白,将可溶的活性 HRPO 释放了出来。通过离心将聚合二醛的 HRPO 沉淀出来,仅将藉酶溶化的 HRPO 留在了溶液中。可溶的 HRPO 催化了过氧化氢对愈创木脂的氧化,产生了蓝颜色。因此,在涂有愈创木脂的片层上呈现蓝颜色,为检测天冬氨酸蛋白酶和胃蛋白酶提供了一个方便的方法。

BSA 和缓冲液都不具有天冬氨酸蛋白酶活性。因此聚合二醛结合的卡巴酪蛋白不会被水解,也就没有可溶的活性 HRPO 从载体上释放出来。通过离心将聚合二醛结合的 HRPO 沉淀出来,但在溶液中并未留下藉天冬氨酸蛋白酶溶化的 HRPO。过氧化氢对愈创木脂的氧化作用未获得催化,结果只呈现勉强看得出的蓝色。

实验 XI

本实验涉及 HRPO 通过来自 Candida albicans 的天冬氨酸蛋白酶的作用从[聚合二醛-肌红蛋白-HRPO]的释放。

A. 材料:(聚合二醛)(HRPO 醛偶合法)

1. 令市售自 Sigma Chemical Co. 的聚合二醛与肌红蛋白(制备

法 N)起反应,然后与 HRPO 醛(制备法 N)反应。

2. 产生 Candida albicans (ATCC 28366) 孵育物的天冬氨酸蛋白酶则按 Journal of General Microbiology, (1983)129;431-438 所述在液体孵育物中扩增并生长。

3. 涂以愈创木脂(试剂 S)的试片

4. 缓冲液与溶液

a. 20mM 过氧化氢

b. 500mM MES 缓冲液, pH6.0

B. 步骤

将 10mg(湿重)[聚合二醛-肌红蛋白-HRPO]共轭物悬浮在 30 微升含分泌的天冬氨酸蛋白酶的 Candida albicans 孵育物中或 30 微升曾煮沸过 20 分钟使天冬氨酸蛋白酶失活的同样 Candida albicans 孵育物中。将混合物在室温转动 10 分钟,然后离心将固体共轭物和 Candida albicans 细胞沉淀出来。

将 80 微升上清液与 10 微升过氧化氢溶液和 10 微升 MES 缓冲液进行混合。将每种溶液 20 微升加到愈创木脂试片的表面,检视其产生蓝色的情况。

比色值	说 明
0	看不出有蓝色生成
+/-	似有极淡的蓝色
0.25	可见极淡的蓝色
0.5	明显蓝色
1.0	深蓝色
1.5	强度介于 1.0 和 2.0 之间的蓝色
2.0	试验体系中最深的蓝色

C. 结果

仅在愈创木脂试片上滴加了经聚合二醛-肌红蛋白处理的 *Candida albicans* 的区域呈现深蓝色。而滴加了经煮沸过的 HRPO 处理的孵育物的区域未见到颜色。

酶 源	比色值
<i>Candida Albicans</i> 孵育物	1.5
经煮沸过的孵育物	0

D. 说明

由 *Candida albicans* 孵育物分泌进入生长孵育基的天冬氨酸蛋白酶使聚合二醛-肌红蛋白产生了水解,将可溶的活性 HRPO 释放了出来。通过离心将聚合二醛结合的 HRPO 沉淀出来,仅将藉天冬氨酸蛋白酶溶化的 HRPO 留在了溶液中。可溶的 HRPO 催化了过氧化氢对愈创木脂的氧化,产生了蓝颜色。因此在涂有愈创木脂的片上呈现蓝颜色,为检测天冬氨酸蛋白酶提供了一个方便的方法。

将孵育物煮沸对由 *candida albicans* 细胞分泌进入生长孵育基的天冬氨酸蛋白酶产生了失活作用。因此聚合二醛结合的肌红蛋白不产生水解,因此由载体中并不释放出可溶的活性 HRPO。通过离心使聚合二醛结合的 HRPO 沉淀,但在溶液中并未留下经天冬氨酸蛋白酶溶化的 HRPO。过氧化氢对愈创木脂的氧化作用未获得催化,结果只呈现勉强看得见的蓝色。HRPO 从载体的释放并非仅仅是 HRPO 通过存在于生长介质中的盐类或其它组分进行非专性释放的结果。

实验 XII

这个实验涉及 HRPO 通过阴道液样品的作用从[琼脂糖 6 MB-

卡巴-酪蛋白-HRPO]中的释放。阴道液的样品有：

1. 正常阴道液
 2. 添加了白色念珠菌孵育物的正常阴道液
 3. 取自被临床诊断患有外阴阴道念珠菌病妇女的阴道液
- A. 材料(市售的溴化氰活化的琼脂糖 6MB)(HRPO 酰肼偶合法)

1. 琼脂糖 6MB-卡巴-酪蛋白-HRPO 共轭物(制备法 C)

2. 取在标准 Dacron 棉拭上的阴道液样品。在使用前该样品一直是冷冻保存的。使用时,将该样品解冻,然后在一专用的试管中离心,从棉拭上提取出未稀释的阴道液。从每一棉拭获得的全部样品用于试验。根据需要,将蒸馏水加入样品,使总体积为 75 微升。

在指明的情况下,20 微升的白色念珠菌孵育物(参见如实验 I)加入到不患外阴阴道念珠菌病妇女的一些阴道液样品中。

3. 浸渍了愈创木脂的滤纸(市售的 Hemocult® 试片)
4. 缓冲液和溶液
 - a. 6mM 过氧化氢
 - b. 250mM N-甘氨酸, pH3.0

B. 步骤

将 30mg(湿重)[琼脂糖-卡巴-酪蛋白-HRPO]共轭物悬浮在 75 微升经处理或未处理过的阴道液中。悬浮液在室温孵育 15 分钟,然后离心,使固体共轭物和其它碎屑沉淀。

将 5 微升澄清的上清液滴加到愈创木脂浸渍纸上,然后再滴加 5 微升过氧化氢溶液,对该试纸检视蓝色的呈现情况。

比色值	说 明
0	看不出有蓝色生成
+/-	似有极淡的蓝色
0.25	可见极淡的蓝色
0.5	明显蓝色
1.0	深蓝色
1.5	试验体系中最深的蓝色

C. 结果

在愈创木脂浸渍纸上滴加了患有外阴阴道念珠菌病妇女的阴道液上清液的区域上,呈现了深蓝色。而在愈创木脂浸渍纸上滴加了对照妇女阴道液上清液的区域上,未呈现出颜色。而在愈创木脂浸渍纸上,滴加了曾加入白色念珠菌孵育物的孵育基的正常妇女阴道液的上清液的区域,也呈现了强的蓝色。

样品号	诊断	比色值
7757	念珠菌病	2.0
7701	念珠菌病	2.0
7749	念珠菌病	2.0
7760	念珠菌病	2.0
7753	念珠菌病	2.0
7795	念珠菌病	2.0
7779	念珠菌病	2.0
7799	念珠菌病	2.0
7768	正常	1.0
7770	正常	0.0
7744	正常	0.0
7745	正常	0.0
7750	正常	0.0
7761	正常	0.0
0001	正常	0.0
0001	正常+念珠菌孵育物	2.0
7747	正常+念珠菌孵育物	2.0
7748	正常+念珠菌孵育物	1.0
7750	正常+念珠菌孵育物	2.0
7756	正常+念珠菌孵育物	2.0

D. 说明

临床证明患有外阴阴道念珠菌病的妇女的阴道液含有天冬氨酸蛋白酶,它在 pH3.0、室温和 15 分钟的条件下令琼脂糖 6MB 束缚的卡巴-酪蛋白水解,将可溶的活性 HRPO 释放了出来。通过离心沉淀出琼脂糖 6MB 结合的 HRPO,仅将所释放的可溶的 HRPO 留在溶液中。可溶的 HRPO 催化了市售 Hemocult® 试片的氧化,产生了蓝

颜色。因此在 Hemocult® 试片上呈现蓝颜色,为检测阴道液中存在有念珠菌衍生的天冬氨酸蛋白酶,因而也就为诊断外阴阴道念珠菌病提供了一个快速方便的方法。

未患外阴阴道念珠菌病正常妇女的阴道液不含有天冬氨酸蛋白酶,不含在 pH3.0、室温和 15 分钟条件下令琼脂糖 6B 结合的卡巴-酪蛋白水解,因而不会释放可溶的活性 HRPO。将琼脂糖 6B 结合的 HRPO 离心沉淀出来时,在溶液中不留有释放的可溶的 HRPO。没有 HRPO 催化剂,市售 Hemocult® 试片的氧化不会发生,也就不会呈现出蓝色。因此在 Hemocult® 试片上不呈现蓝颜色,就为在正常妇女阴道液中检测不存在念珠菌衍生的天冬氨酸蛋白酶,也就为诊断妇女不患外阴阴道念珠菌病提供了一种快速方便的方法。

而对白色念珠菌孵育物的孵育基加入到不患外阴阴道念珠菌病正常妇女的阴道液的情况,在 pH3.0、室温和 15 分钟条件下,发生了琼脂糖 6MB 结合的卡巴-酪蛋白的水解,释放了可溶的活化 HRPO。通过离心将琼脂糖 6B 结合的 HRPO 沉淀出来,而在溶液中留有释放的可溶的 HRPO。可溶的 HRPO 催化了过氧化氢对市售 Hemocult® 试片的氧化作用,产生蓝颜色。因此在 Hemocult® 试片上呈现蓝色表明,由白色念珠菌释放进入菌种生长孵育基的天冬氨酸蛋白酶,即使加入到正常妇女阴道液中,也能快速方便地检测出来。

实验 X III

这个实验涉及 HRPO 通过下述阴道液样品的作用从[Eupergit® C-肌红蛋白-HRPO]和[Sigmacell® 20-肌红蛋白-HRPO)的释放。

1. 正常阴道液

2. 取自临床诊断患有外阴阴道念珠菌病妇女的阴道液

A. 材料:(溴化氰活化的 Sigmacell® 20-肌红蛋白-HRPO-制备法 A 与 I)和(Eupergit® C-肌红蛋白-HRPO-制备法 Q)(HRPO 醛偶合法)

1. 与肌红蛋白-HRPO 醛(制备法 Q)偶合的丙烯酸环氧乙烷细颗粒

2. 与肌红蛋白-HRPO 醛(制备法 I)偶合的 Sigmacell® 20(溴化氰活化的,制备法 A)

3. 取在标准 Dacron 棉拭上的阴道液样品。在使用前该样品一直是冷冻保存的。使用时,将该样品解冻,然后在一专用的试管中离心,棉拭上提取出来稀释的阴道液。从每一棉拭获得的全部样品用于试验。

4. 浸渍了愈创木脂的滤纸(市售的 Hemocult® 试片)

5. 缓冲液和溶液

a. 6mM 过氧化氢

b. 250mM N-甘氨酸甘氨酸,pH3.0

c. 1.0M 醋酸盐缓冲液,pH4.0

B. 步骤

将 20mg(湿重)[Eupergit® 结合的肌红蛋白-HRPO 共轭物悬浮在未冲稀的阴道液和 10 微升 1M 醋酸盐缓冲液中。悬浮液在室温孵育 10 分钟,然后离心,使固体共轭物和其它碎屑沉淀。

取 5 微升澄清的上清液滴加到愈创木脂浸渍纸上,然后再滴加 5 微升过氧化氢溶液,对该试纸检视蓝色的呈现情况。

将 20mg(湿重)Sigmacell® 20 结合的肌红蛋白-HRPO 共轭物悬浮在未稀释的阴道液和 10 微升 250mM 醋酸盐缓冲液中,在室温孵育 15 分钟,然后离心,使固体共轭物和其它碎屑沉淀。

取 5 微升澄清的上清液滴加到愈创木脂浸渍纸上,然后再滴加 5 微升过氧化氢溶液,对该试纸检视蓝色的呈现情况。

比色值	说 明
0	看不出有蓝色生成
+/-	似有极淡的蓝色
0.25	可见极淡的蓝色
0.5	明显蓝色
1.0	深蓝色
2.0	试验体系中最暗的蓝色

C. 结果

在愈创木脂浸渍纸上滴加了患有外阴阴道念珠菌病妇女的阴道液上清液的区域,呈现了浮蓝色,而滴加了对照妇女阴道液上清液的区域未呈现出颜色。

样品号	诊断	底物	比色值
7832	念珠菌病	Sigmacell®	2.0
7824	念珠菌病	Sigmacell®	2.0
7844	念珠菌病	Sigmacell®	2.0
7848	念珠菌病	Sigmacell®	2.0
7820	对照	Sigmacell®	0.0
7821	对照	Sigmacell®	0.0
7826	对照	Sigmacell®	0.0
7831	对照	Sigmacell®	0.0
7891	念珠菌病	EUPERGIT® C	2.0
7921	念珠菌病	EUPERGIT® C	2.0
7914	对照	EUPERGIT® C	+/-
7915	对照	EUPERGIT® C	0.0

D. 说明

临床证明患有念珠菌病的妇女的阴道液中的活性天冬氨酸蛋白酶,令 Sigmacell® 20 结合的和 Eupergit® I 束缚的蛋白质都发生了水解,将可溶的活性 HRPO 释放了出来。通过离心沉淀出聚合物结合的 HRPO,仅将藉天冬氨酸蛋白酶溶化的 HRPO 留在溶液中。可溶的 HRPO 催化了过氧化氢对愈创木脂的氧化,产生了蓝颜色。因此在愈创木脂浸渍纸上蓝色的呈现为检测阴道液中活性天冬氨酸蛋白酶,也因而为诊断外阴阴道念珠菌病提供了一个方便有效的方法。

对照妇女即未患念珠菌病妇女的阴道液中,没有活性天冬氨酸蛋白酶。因而对照妇女的阴道液样品未能水解聚合物结合的蛋白质,也未能将可溶的活性 HRPO 从这两种载体释放出来。将聚合物束缚的 HRPO 离心沉淀出来时,并无藉天冬氨酸蛋白酶溶化的 HRPO 留在溶液中。来自对照样品的上清液,由于不含 HRPO,就不能催化过氧化氢对愈创木脂的氧化,也就不能产生蓝颜色。因此在愈创木脂浸渍纸上不呈现蓝颜色,就为鉴别那些受外阴阴道白念珠菌感染的妇女提供了方便的方法。

实验 X IV

本实验涉及几种微生物蛋白酶在 [Sigmacell®-肌红蛋白-HRPO] 上水解活性的差异。

A. 材料

1. [Sigmacell®-肌红蛋白-HRPO](制备法 E 和 F)
2. 产生白色念珠菌(ATCC 28366)的天冬氨酸蛋白酶孵育液
3. Trichomonas Vaginalis(ATCC 3001)孵育液
4. Mobiluncus Curtissn 细胞在盐溶液中的悬浮液(ATCC 35241)
5. 缓冲液和溶液

- a. 0.02%过氧化氢溶液
- b. 300mM 磷酸钾缓冲液, pH7.5
- c. 100mM 醋酸钠缓冲液, pH4.0
6. 愈创木脂浸渍纸(市售 Hemocult® 试片)

B. 步骤

将 20mg 的底物[Sigmacell®-肌红蛋白-HRPO]悬浮在 75 微升的适当缓冲液(见下表)中,接着加入 25 微升细胞孵育物/悬浮液。反应孵育 10~30 分钟,然后将样品离心除去固相的结合底物和细胞碎屑。将 5 微升反应上清液滴加在愈创木脂试片上,再加 5 微升过氧化氢溶液显色。反应条件与显示情况列于后面的表中。

比色值	说 明
0	看不出有蓝色生成
+/-	似有极淡的蓝色
0.25	可见极淡的蓝色
0.5	明显蓝色
1.0	深蓝色
2.0	试验体系中最深的蓝色

C. 结果

从与缓冲液在 pH4.0 或 7.5 孵育 30 分钟的试管中称取的反应上清液滴加到愈创木脂试片上,并加了过氧化氢后,并无颜色呈现。对于经过煮沸的 *Candida albicans* 孵育液(pH4.0 与 7.5)、*Trichomonas vaginalis* 培养液(pH4.0 与 7.5)和 *Mobiluncus curtissi* 孵育液(pH4.0 与 7.5)获得类似结果,即也未呈现颜色。*Candia albicans* 孵育液在 pH4.0 孵育 10 分钟,产生了很强的蓝色,但在 pH7.5

即使孵育 30 分钟,也不产生蓝色。Trichomonas vaginalis 孵育液在 pH7.5 孵育 30 分钟,产生了很强的蓝色,但在 pH4.0 维持 30 分钟,只产生了勉强可见的颜色。Mobiluncus curtisii 孵育液则在 pH4.0 或 7.5 孵育 3 分钟,都未产生蓝色。

酶源细胞孵育液	孵育过程中的 pH	孵育时间	比色值
<u>Candida albicans</u>	4.0	10min	2.0
<u>Candida albicans</u>	7.5	30min	0.0
煮沸过的 <u>Candida albicans</u>	4.0	30min	0.0
煮沸过的 <u>Candida albicans</u>	7.5	30min	0.0
<u>Mobiluncus curtisii</u>	4.0	30min	0.0
<u>Mobiluncus curtisii</u>	7.5	30min	0.0
煮沸过的 <u>Mobiluncus curtisii</u>	4.0	30min	0.0
煮沸过的 <u>Mobiluncus curtisii</u>	7.5	30min	0.0
<u>Trichomonas vaginalis</u>	4.0	30min	0.25
<u>Trichomonas vaginalis</u>	7.5	30min	2.0
煮沸过的 <u>T. vaginalis</u>	4.0	30min	0.0
煮沸过的 <u>T. vaginalis</u>	7.5	30min	0.0
缓冲液	4.0	30min	0.0
缓冲液	7.5	30min	0.0

D. 说明

用 300mM 磷酸盐缓冲液(pH7.5)或 100mM 醋酸盐缓冲液

(pH4.0)在室温孵育 30 分钟时间,HRPO 并没有从固态载体上释放出来。与此类似,Candia albicans、Trichomonas vaginalis 和 Mobiluncus curtisii 经煮沸的悬浮液在室温、pH7.5 或 4.0 条件下孵育 30 分钟也不释放出 HRPO。而 Candida albicans 孵育液在 pH4.0 经孵育 10 分钟却由固态载体释放了 HRPO,但在 pH7.5 即使经 30 分钟孵育也不释放 HRPO。这与 Candida albicans 天冬氨酸蛋白酶的已被人们确认的 pH 特征,即它在低 pH 值时有活性,而在高 pH 值时活性很差乃至没有活性是相符的。反之,T. vaginalis 孵育液在 pH7.4 经 30 分钟的孵育时间会很容易地从固态载体释放 HRPO,而 pH4.0 则释放出 HRPO 的量仅勉强检测得出。这一点也与 T. vaginalis 硫醇蛋白酶的已知 pH 特征(即在高 pH 值有活性,在低 pH 值活性很差或没有活性)相符。最后,人们已知 Mobiluncus curtisii 不会分泌蛋白酶,它在 pH4.0 和 pH7.5 即使经 30 分钟孵育,也不释放 HRPO。

因此,在不同 pH 条件下进行这个试验,可以区别这三种微生物:只有 Candida albicans 经 pH4.0 和室温下 10 分钟处理会呈现颜色;只有 Trichomonas vaginalis 在 pH7.5 30 分钟处理会呈现颜色; Mobiluncus curtisii 在 pH7.5 和 4.0 30 分钟处理,都不会产生颜色。

实验 X V

本实验涉及各种蛋白酶与它们的抑制制备法在底物[Eupergit® C-肌红蛋白-HRPO]上的活性。

A. 材料

1. 粉碎的[Eupergit® C-肌红蛋白-HRPO]制备法 Q)
2. 购自 Sigma Chemical Co. 的天冬氨酸蛋白酶(X III 型,由 Aspergillus saitoi,活性 0.6 单位/mg) 40mg/ml
3. 取自牛胰的胰蛋白酶(丝氨酸蛋白酶)(活性 2900 单位/

mg),购自 U. S. Biochemicals, 2mg/ml

4. 取自番木瓜乳液的木瓜蛋白酶(硫醇蛋白酶)(活性 12 单位/mg),购自 Sigma Chemical Co., 2mg/ml

5. 产生 Candida albicans (ATCC 28366) 孵育液的天冬氨酸蛋白酶。

6. 购自 Sigma Chemical Co. 的盐酸甲苯酰赖氨酸氯甲基酮 (TLCK) 在乙醇中的 50mM 溶液

7. 购自 Sigma Chemical Co. 的取自-微生物源的 P 胃酶抑素, 2mg/ml, 在乙醇中

8. 缓冲液与溶液

a. 200mM 磷酸钾缓冲液 pH7.0

b. 100mM 磷酸钾缓冲液, pH7.4

c. 100mM 醋酸钠缓冲液, pH4.0

d. 0.02% 过氧化氢溶液

e. 无水酒精

9. 愈创木脂浸渍纸(市售 Hemocult® 试片)

B. 步骤

本试验包括两部分。第一部分是测定不同的蛋白酶在底物[Eu-pergit® C-肌红蛋白-HRPO]上的活性。在试验前,将酶与对照(经 15 分钟煮沸的酶)同 20mg 底物和缓冲液(其量见后面表)孵育 15 分钟。

在第二部分中,将这些酶与其各自的抑制法和适当的缓冲液预孵育 15 分钟,然后加入到底物中,再于室温孵育 15 分钟。

在这两部分的情况,都将反应混合物离心除去固相偶合物。将 5 微升上清液滴加到 Hemocult® 试片上,再用 5 微升过氧化氢作显色处理。

比色值	说 明
0	看不出有蓝色生成
+/-	似有极淡的蓝色
0.25	可见极淡的蓝色
0.5	明显蓝色
1.0	深蓝色
1.5	试验体系中最深的蓝色

C. 结果

1. 第一部分:从 pH4.0 或 pH7.5 仅含缓冲液的试管中取出的反应上清液,加到愈创木脂试片上并加了过氧化氢显色剂后,产生的是极淡的颜色。由含有煮沸过的胰蛋白酶(pH7.4),煮沸过的念珠菌孵育液(pH4.0)和煮沸过的木瓜蛋白酶(pH7.4)的试管取出的反应上清液,所得到的是同样的结果。而对未煮沸过的胰蛋白酶(pH7.4),未煮沸过的念珠菌孵育液(pH4.0)和未煮沸过的木瓜蛋白酶(pH7.0),则呈现强烈的蓝色。

2. 第二部分:TLCK,它是能抑制丝氨酸和硫醇型蛋白酶的一种蛋白酶抑制法,它对胰蛋白酶(一种丝氨酸蛋白酶)和木瓜蛋白酶(一种硫醇蛋白酶)的显色都起了抑制作用。而胃酶抑制素是天冬氨酸蛋白酶的一种抑制法,它就抑制了 *Candida albicans* 天冬氨酸蛋白酶的显色。

表(第一部分)

酶源(体积=25 μ l)	缓冲液(vol. =75 μ l)	比色值
胰蛋白酶	pH7.4	2.0
胰蛋白酶(煮沸过)	pH7.4	0.25
念珠菌孵育液	pH4.0	1.5
念珠菌培养液(煮沸过)	pH4.0	0.25
木瓜蛋白酶	pH7.0	1.0
木瓜蛋白酶(煮沸过)	pH7.4	0.25
	仅有缓冲液	0.25

表(第二部分)

酶	抑制物溶液	乙醇 (对照)	缓冲液 pH, 体积	比色值
胰蛋白酶	TLCK(10 μ l)		7.4, 65 μ l	1.0
胰蛋白酶	-	-	7.4, 75 μ l	2.0
木瓜蛋白酶	TLCK(25 μ l)	25 μ l	7.0, 50 μ l	0.5
木瓜蛋白酶	-		7.0, 50 μ l	1.0
天冬氨酸蛋白酶	胃酶抑素(25 μ l)		4.0, 50 μ l	0.5
天冬氨酸蛋白酶	-	25 μ l	4.0, 50 μ l	1.5

D. 说明

胰蛋白酶是一种丝氨酸蛋白酶,它在 pH7.4 水解了固相底物,释放出可溶的 HRPO,后者就催化了愈创木酯试片上的显色作用。在 pH4.0 的 *Candida albicans* 天冬氨酸蛋白酶,在 pH7.0 的木瓜蛋白酶(一种硫醇蛋白酶,也是如此,而煮沸妨碍了 HRPO 自每种酶

的释放。因此这三种不同类型的每一种,在适宜的反应条件下都能够从底物水解释放出可溶性 HRPO。缓冲剂和热的作用都不能使酶释放的可溶性 HRPO 失活,这说明 HRPO 的释放不仅仅是在菌种生长孵育基或孵育混合物中因盐类而引起的非专性的释放。

TLCK,它是能抑制丝氨酸和硫醇型蛋白酶的一种蛋白酶抑制备法,它对胰蛋白酶(一种丝氨酸蛋白酶)和木瓜蛋白酶(一种硫醇蛋白酶)的显色都起了抑制作用。而胃酶抑制素是天冬氨酸蛋白酶的一种抑制备法,它就抑制了 *Candida Albicans* 天冬氨酸蛋白酶的显色。因此,通过在已知的特定酶的抑制物或者特定酶类的抑制物的存在条件下进行孵育,可以达到对水解酶检测的专一性。

上面所述的是提供说明之用。对于本领域中的熟练人员是显而易见的,在这里所述的操作条件、材料、步骤、方法参数以及所用的试验装置等等,均可在不违背本发明精神和范围的条件下进行修改或替换。

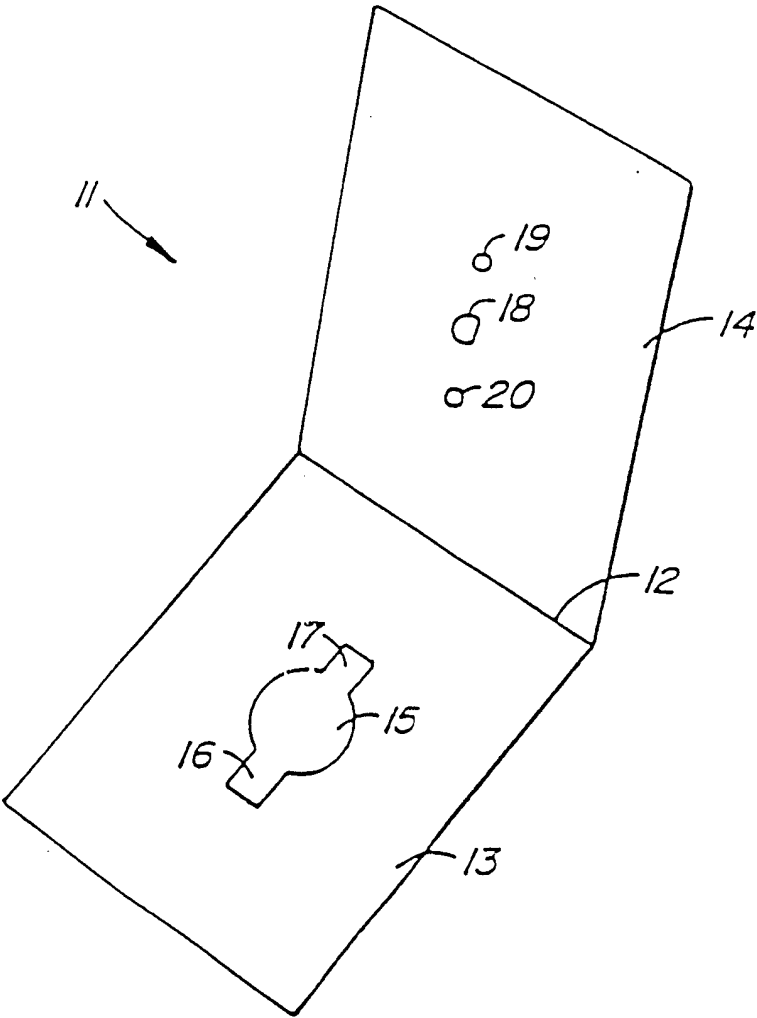


图 1

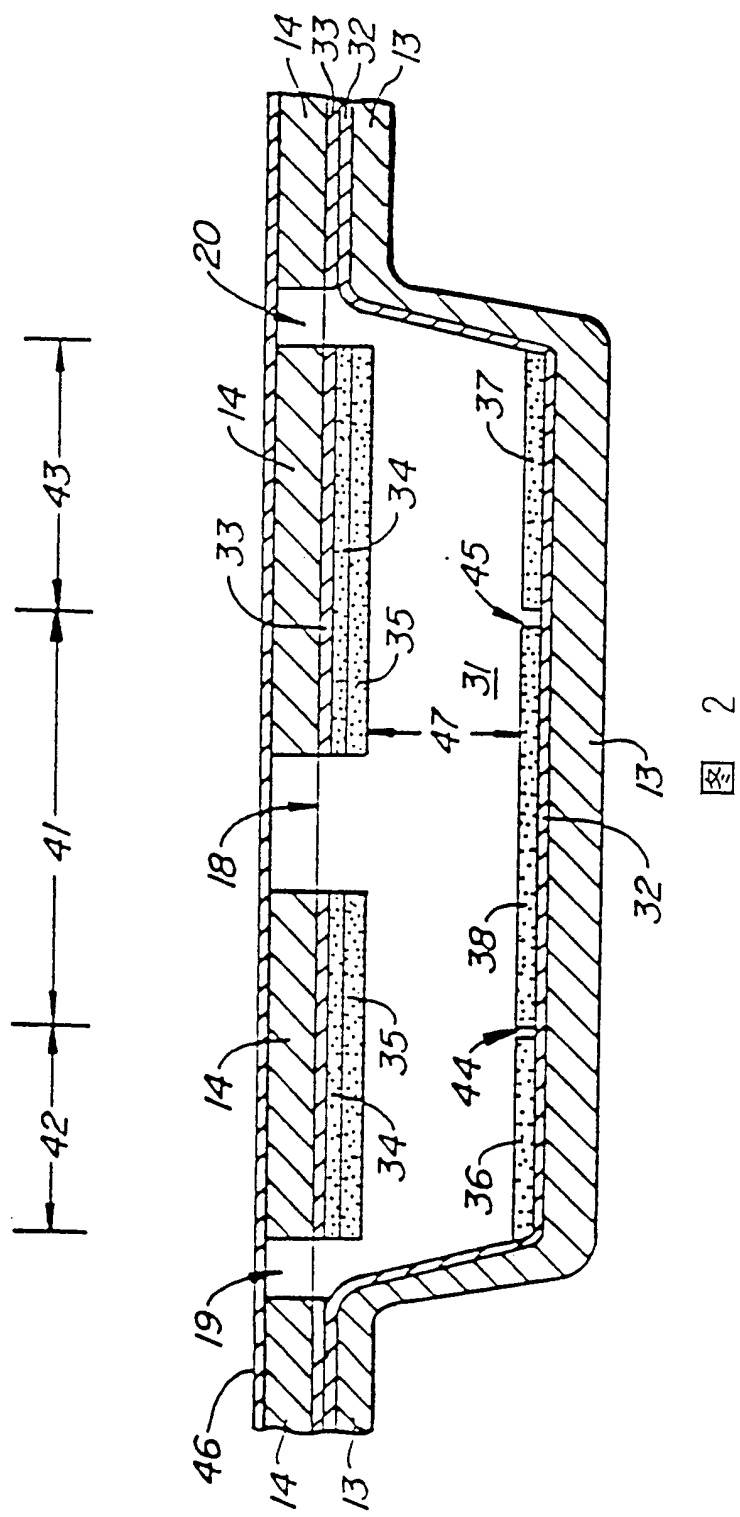


图 2