



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 94100515.1

[45] 授权公告日 2003 年 9 月 3 日

[11] 授权公告号 CN 1120370C

[22] 申请日 1994.1.20 [21] 申请号 94100515.1

[30] 优先权

[32] 1993. 1. 21 [33] JP [31] 026159/1993

[71] 专利权人 和光纯药工业株式会社

地址 日本大阪府

[72] 发明人 土谷正和 原田和明

审查员 王 奕

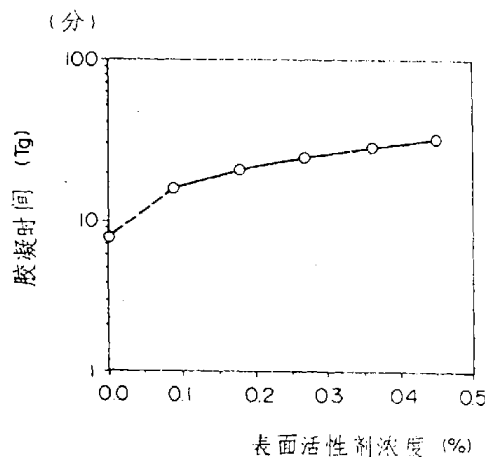
[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所
代理人 张元忠

权利要求书 3 页 说明书 29 页 附图 4 页

[54] 发明名称 一种测定样品中存在的内毒素类似物的方法及其试剂盒

[57] 摘要

将一种能与内毒素(ET)结合而抑制 ET 活性的肽衍生物或蛋白质及至少一种表面活性剂与含 ET 的样品接触,可以抑制 ET 的活性,即使在这样处理过的样品中存在有 ET 活性的 ET 类似物时,也可以测定它而不受 ET 的影响。



1. 一种测定样品中存在的内毒素类似物的方法，这种内毒素类似物具有与鲎血细胞溶解产物反应而引起酶活化反应或胶凝反应的性质，该方法包括

i)使选自多粘菌素、连利素、多佛母素或抗脂多粘因子且其浓度为 0.00001-0.1w/v%的抑制内毒素肽和一种表面活性剂与样品接触，所述表面活性剂为非离子表面活性剂，阴离子表面活性剂或两性表面活性剂，浓度为 0.005-5w/v%。

ii)用上述 i)步骤处理过的样品与鲎血细胞溶解产物反应，

iii)a)用测量仪器或目测，测定由以上反应引起的酶活化反应所活化的酶的活性，或

b)用测量仪器或目测，测定由以上反应引起的胶凝反应造成的反应溶液浊度变化或胶凝的程度。

2. 权利要求 1 的方法，其中抑制内毒素肽为多粘菌素 A, B, C, D, E, K, M 或 P。

3. 权利要求 1 的方法，其中抑制内毒素肽为多粘菌素 B。

4. 权利要求 1 的方法，其中表面活性剂为选自聚氧乙烯烷基醚、聚氧乙烯烷基苯基醚、聚氧乙烯烷基酯、甲基葡糖酰胺衍生物、烷基糖衍生物、聚氧乙烯对叔辛基苯基醚或聚氧乙烯高级醇醚的非离子表面活性剂；选自十二烷基硫酸钠、十二烷基苯磺酸、脱氧胆酸、胆酸、三(羟甲基)氨基甲烷十二烷基硫酸盐或脱氧胆酸钠的阴离子表面活性剂；或选自 3-[(3-胆酰胺酰胺丙基)

二甲基铵基〕-1-丙烷磺酸盐、3-〔(3-胆酰胺酰胺丙基)二甲基铵基〕2-羟基-1-丙烷磺酸盐或十二烷基二甲基氧化胺的两性表面活性剂。

5. 权利要求1的方法，其中表面活性剂为聚氧乙烯对-叔辛基苯基醚，脱氧胆酸钠，聚氧乙烯高级醇醚或十二烷基二甲基氧化胺。

6. 权利要求1的方法，其中内毒素类似物为(1→3)-β-D-葡聚糖和/或其衍生物。

7. 一种测定样品中存在的内毒素类似物的试剂盒，其中包括一种选自多粘菌素、连利素、多佛母素或抗脂多粘因子且其浓度为0.00001-0.1w/v%抑制内毒素肽，一种表面活性剂和鲎血细胞溶解产物，所述表面活性剂为非离子表面活性剂，阴离子表面活性剂或两性表面活性剂，浓度为0.005-5w/v%。

8. 权利要求7的试剂盒，其中抑制内毒素肽为多粘菌素A，B，C，D，E，K，M或P。

9. 权利要求7的试剂盒，其中抑制内毒素肽为多粘菌素B。

10. 权利要求7的试剂盒，其中表面活性剂为选自聚氧乙烷基醚、聚氧乙烷基苯基醚、聚氧乙烷基酯、甲基葡糖酰胺衍生物、烷基糖衍生物、聚氧乙烯对叔辛基苯基醚或聚氧乙烯高级醇醚的非离子表面活性剂；选自十二烷基硫酸钠、十二烷基苯磺酸、脱氧胆酸、胆酸、三(羟甲基)氨基甲烷十二烷基硫酸盐或脱氧胆酸钠的阴离子表面活性剂；或选自3-〔(3-胆酰胺酰胺丙基)二甲基铵基〕-1-丙烷磺酸盐、3-〔(3-胆酰胺酰胺丙基)二甲基铵基〕2-羟基-1-丙烷磺酸盐或十二烷基二甲基氧

化胺的两性表面活性剂。

11. 权利要求 7 的试剂盒, 表面活性剂为聚氧乙烯对-叔辛基苯基醚, 脱氧胆酸钠, 聚氧乙烯高级醇醚或十二烷基二甲基氧化胺。

12. 权利要求 7 的试剂盒, 其中内毒素类似物质为(1→3)- β -D 葡聚糖和/或其衍生物。

一种测定样品中存在的内毒素类似物的方法及其试剂盒

本发明涉及一种方法，用来选择性地抑制内毒素（以后简称为“E T”）的某些性质，例如与鲎血细胞溶解产物（以后简称为“A L溶液”）反应引起该溶液中含有的酶（如蛋白酶）发生活化反应（以后简称为“酶活化反应”）或胶凝反应的性质；本发明还涉及一种方法，用来测量在用上述抑制方法处理的样品中含有的具有E T活性的物质（以后简称为“对A L溶液有活性的物质”）中至少一种非E T物质（这种非E T物质以后简称为“E T类似物”）。

E T是存在于革兰氏阴性菌细胞壁中的脂多糖（L P S），已知是有力的热原质。因此，检测非肠道药物和类似物质中的E T很重要，在美国药典和日本药典中公开了内毒素的试验方法。E T被认为是革兰氏阴性菌感染中休克的主要原因。在临床诊断中，采用例如测定血浆中内毒素的方法来诊断革兰氏阴性菌感染、判断革兰氏阴性菌感染的治疗效果和预后、以及用于内毒素休克的早期诊断。A L溶液具有被E T活化从而导致酶（如蛋白酶）的活化反应或胶凝反应的性质。在医学科学、药学和微生物学等领域广泛采用利用这一性质或利用胶凝反应的简单而低廉的检测E T的方法，例如所谓的鲎试验法，包括用比色法测定酶（例如蛋白酶）的活化度的方法（在本发明中，“鲎试验法”包括上述的这些方法）。

但是, 萤试验中用的试剂的缺点是它们也与E T类似物反应, 例如与(1→3)-β-D-葡聚糖和/或其衍生物(以后简称为“βG”)反应[Kakinuma等, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 101, 434-439(1981), 和Morita等, *FEBS Lett.*, 129, 318-321(1981)], 结果在待测样品中与E T一起存在的βG会造成测定值的正误差。

虽然βG's 是造成E T测定中正误差的干扰物质, 但是利用A L溶液检测βG可以用来诊断由真菌引起的传染性疾病, 因为它们是属于诸如酵母和霉菌之类真菌的细胞壁的组分。因此研究了测定βG的方法。但是, 因为可用于萤试验的市售试剂必然会和E T反应, 所以问题在于当用这些试剂测定βG时, 样品中的E T会影响测定值。

为了解决上述问题, 曾报导过用各种色谱法处理A L溶液(日本公开特许(JP-A)59-27828、JP-A H4-138193和JP-A H4-76459)以除去其中存在的一种因子的方法, 该因子能与E T反应, 引起酶(如蛋白酶)的活化反应或胶凝反应(以后简称为“E T敏感因子”); 向A L溶液中加入对E T有亲合性的肽以抑制E T敏感因子的方法(JP-A H2-207098); 以及向A L溶液中加入对抗E T敏感因子的抗体以抑制E T敏感因子的方法(JA-A H4-52558)。但是, 所有这些方法的缺点在于, 因为其中包括处理A L溶液本身, 所以很有可能在处理期间A L溶液会被通常环境中广泛存在的E T或βG污染。另外, 这些方法需要灭菌设备和复杂的灭菌操作以避免污染, 而且对E T有亲合性的肽和对抗E T敏感因子的抗体很难得到并且价格昂贵。根据这些及其它事实, 显然这些方法存在很多经济和技术问题。

曾经报导过一种对样品进行热处理的方法(JP-A H2-141666), 以便不用处理 A L 溶液而是处理待测样品使 E T 失活。这一方法没有上述方法的缺点, 但是它的问题是为了使 E T 充分失活需要很长的处理时间。因此, 不能说是一个理想的方法。

本发明是在考虑了这些情况后产生的, 其目的在于提供一种可以用易得的试剂和简单的操作进行的选择性抑制 E T 活性的方法: 利用这种抑制方法测定样品中至少一种 E T 类似物的方法; 以及用于这种测量的试剂。

本发明提供了一种抑制 E T 活性的方法, 包括使含 E T 的样品与一种肽衍生物或蛋白质和至少一种表面活性剂相接触, 上述肽衍生物或蛋白质具有和 E T 结合从而抑制 E T 活性的性能(以后简称为“抑制 E T 肽”)。

本发明还提供了一种测量样品中存在的至少一种 E T 类似物的方法, 其中包括将用上述抑制方法处理过的样品与 A L 溶液反应, 测定由上述反应引起的酶活化反应所活化的酶的活性, 或者用测量仪器或肉眼测定由于上述反应引起的胶凝反应造成的反应溶液的浊度变化或胶凝的程度。

此外, 本发明提供了用于抑制 E T 活性的预处理溶液, 它是含有抑制 E T 肽和至少一种表面活性剂的水溶液, 不与 A L 溶液反应, 而且既不抑制也不增强 A L 溶液与 E T 类似物的反应。

再者, 本发明提供了用来测定至少一种 E T 类似物的试剂, 它含有一种抑制 E T 肽、至少一种表面活性剂和 A L 溶液。

图 1 表示了实施例 1 中得到的表面活性剂浓度对血浆中内毒素(以后简称为“E T”)(大肠埃希杆菌 055 : B5 LPS) 测定的影

响。

图2表示了实施例2中得到的多粘菌素B(以后简称为“PxB”)的浓度对血浆中ET(大肠埃希杆菌055:B5 LPS)测定的影响。

图3表示实施例4中得到的表面活性剂浓度对血浆中ET(大肠埃希杆菌0128:B12 LPS)测定的影响。

图4表示在实施例4中得到的PxB浓度对血浆中ET(大肠埃希杆菌0128:B12 LPS)测定的影响。

图5表示在实施例4中得到的在表面活性剂存在下PxB浓度对血浆中ET(大肠埃希杆菌0128:B12 LPS)测定的影响。

图6表示在实施例9中得到的在PxB存在下表面活性剂浓度对 β -葡聚糖测定的影响。

图7表示在实施例10中得到的PxB浓度对于在含ET(大肠埃希杆菌055:B5 LPS)水溶液中ET浓度测定的影响。

在为了寻找一种使用AL溶液特异测定AL溶液活性物质(例如ET、 β G等)的方法所作的认真的研究中,本发明人发现,在样品或在测定AL溶液活性物质时得到的反应溶液中表面活性剂和抑制ET肽的同时存在,只抑制样品或反应溶液中含有的ET的活性,这就使ET类似物(例如 β G)的特异检测成为可能,从而完成了本发明。

详细地说,多粘菌素和类似物质所代表的抑制ET肽和表面活性剂具有抑制ET活性的性能已是众所周知。但是,若只用表面活性剂或抑制ET肽来完全抑制ET的活性,必须使用大量的表面活性剂或抑制ET肽。因此,在用鲎试验来测定只用表面活性剂或抑制ET肽处理过的样品中的ET类似物时,存在着诸如AL溶液中酶的活化被

抑制的影响等问题，从而得不到准确的结果。但是，本发明人发现，同时使用表面活性剂和抑制E T肽，即使它们的加入量不影响试验，也可以完全抑制样品中的E T活性，从而完成了本发明。

本发明中使用的表面活性剂并无严格要求，只要它既不抑制也不增强E T类似物对A L溶液的活化反应（酶活化反应、胶凝反应等），并且在反应期间不造成非特异混浊的外观。

表面活性剂的具体实例包括非离子表面活性剂，例如聚氧乙烯烷基醚（如，聚氧乙烯十六醚、聚氧乙烯十二醚等）、聚氧乙烯烷基苯基醚（如，聚氧乙烯辛基苯基醚，聚氧乙烯壬基苯基醚等）、聚氧乙烯烷基酯（如，聚氧乙烯失水山梨醇单油酸酯、聚氧乙烯失水山梨醇单棕榈酸酯、聚氧乙烯失水山梨醇单硬脂酸酯、聚氧乙烯失水山梨醇三油酸酯等）、甲基葡糖酰胺衍生物（如辛酰-N-甲基葡糖酰胺、壬酰-N-甲基葡糖酰胺、癸酰-N-甲基葡糖酰胺等）、烷基糖衍生物（例如正辛基-β-D-葡糖苷等）等；阴离子表面活性剂，例如十二烷基硫酸钠（SDS）、十二烷基苯磺酸、脱氧胆酸、胆酸、三（羟甲基）氨基甲烷十二烷基硫酸盐（Tris DS）等；阳离子表面活性剂，例如烷基胺盐（如十八烷基胺乙酸盐、十四烷基胺乙酸盐、十八烷酰胺乙酸盐、十二烷基胺乙酸盐、十二烷基二乙醇胺乙酸盐等）、季铵盐（如，氯化十八烷基三甲铵、氯化十二烷基三甲铵、氯化十六烷基三甲铵、溴化十六烷基三甲铵、烯丙基三甲基铵甲基硫酸盐、氯化苄基铵、氯化十四烷基二甲基苄基胺、氯化十八烷基二甲基苄基铵、氯化十二烷基二甲基苄基铵等）、烷基吡啶盐（氯化十二烷基吡啶、氯化十八烷酰胺甲基吡啶等）等；两性表面活性剂，例如3-〔（3-胆酰胺酰胺丙基）二甲基铵基〕-1-丙烷磺酸盐、3-〔（3-

胆酰胺酰胺丙基)二甲基铵基)2-羟基-1-丙烷磺酸盐等;以及天然的表面活性剂,例如皂素(由大豆衍生得到)、毛地黄皂苷等。考虑到在反应期间对酶体系和类似体系的影响,优选非离子型表面活性剂或两性表面活性剂。上面示例说明的表面活性剂可以单独使用,也可以两个或多个适当地组合使用。

虽然它们的使用浓度会因种类和要处理的样品而变,但是可以选择浓度而没有特别的限制,只要在此浓度下E T的活性可以在抑制E T肽存在下被充分抑制,而且E T类似物(例如B G)对A L溶液的反应活性既不增强也不抑制。更具体地说,在含E T样品中或该样品与A L溶液的反应溶液中的表面活性剂浓度通常宜选择在0.005-5 W/V%,优选0.05-2.5 W/V%,更优选0.1-1 W/V%。

本发明中使用的抑制E T的肽没有严格要求,只要它是一种肽衍生物(或蛋白质),具有与E T结合以抑制E T活性的性质。这种抑制E T肽最好具有强碱性以及/或有疏水部分。优选的抑制E T肽的实例是由杆菌多粘菌素或类似物质制得的多粘菌素,以及由A L溶液衍生得到的连利素(tachypleisin)、多佛母素(polyphemusin)、抗LPS因子等。因为tachypleisin、polyphemusin、抗LPS因子等常常难以得到而且价格昂贵,所以使用多粘菌素在经济上合算。使用何种多粘菌素没有特别限制,多粘菌素A、B、C、D、E、K、M、P等均可以单独的纯组分、两种或多种的混合物、或是它们中任何一个的盐的形式使用。从市场易得性考虑,优选使用多粘菌素B的硫酸盐。

虽然抑制E T肽的使用浓度随抑制E T肽的种类和要处理的样品而变,但是可以选择浓度而没有特别的限制,只要在该浓度下E T的活性可以在表面活性剂存在下被充分抑制,而且E T类似物(如B G)

与A L溶液的反应活性既不增强也不降低。更具体地说,在含E T的样品或该样品与A L溶液的反应溶液中的抑制E T肽的浓度通常宜选择在0.00001 - 0.1 W/V%的的范围内,优选0.0001 - 0.05 W/V%,更优选0.001 - 0.01 W/V%。

本发明的抑制方法实施如下。

“接触”一词意味着通过加入、稀释、搅拌、混合、振荡等方法使抑制内毒素的肽和表面活性剂与含E T的样品接触。例如,上面列举的表面活性剂和抑制E T肽在含E T的样品中或在该样品与A L溶液反应时浓度处在上述范围内已经足够。不用说,在测定用本发明的抑制方法处理过的样品中的E T类似物时,表面活性剂和抑制E T肽在该样品与A L溶液反应时的浓度可以低于上述范围。

当本发明的抑制方法用于抑制可以加热的样品中的E T活性时,可以通过将热处理和抑制方法一起使用更有效地抑制E T活性。特别是当用萤试验法测定在含抑制因子或类似物的样品(例如血浆或血清)中的E T类似物时,最好是使用热处理与抑制方法相结合进行预处理,以除掉抑制因子或类似物的影响。热处理可以在表面活性剂和抑制E T肽加入之前或之后进行,但最好是在加入之后进行,因为这样通常会产生更大的效果。虽然并不严格,但是热处理的加热温度一般为60 - 220℃,优选约70 - 100℃。虽然并不严格,但是加热时间一般为3 - 60分钟,优选约5 - 15分钟。任何加热方法均可采用,只要它可以将样品在上述加热条件下加热。优选的加热方法的实例是在恒温箱和高压釜中加热。

为了将表面活性剂和抑制E T肽放入含E T的样品中或者在该样品与A L溶液反应时放入,可以采用任何方法,只要它能将表面活性

剂和抑制E T肽加到样品或A L溶液中，从而在E T引发A L溶液活化之前将它们的浓度调节到上述范围。以下的方法可以作为示例说明。

1) 用一个含适当数量表面活性剂和抑制E T肽的溶液(或分别含适当数量表面活性剂和适当数量抑制E T肽的两个溶液)将含E T的样品适当稀释，该溶液不活化A L溶液，而且既不抑制也不增强A L溶液与E T类似物的反应。

2) 在测定E T类似物时，将适当数量的表面活性剂和抑制E T肽预先掺加到A L溶液中，将这样处理过的A L溶液与待测样品适当地混合。

当采用上述的方法1)时，对样品的稀释度无严格要求，但是当样品是血浆或类似物质时，在某些情形下会产生以下问题。当稀释度太低时，由于加热期间血浆蛋白的变性而在稀释的血浆中造成粘度上升或形成沉淀。当稀释度太高时，正确检测E T变得不可能。因此，在样品是血浆或类似物质时，稀释度常为5 - 20倍，优选约8到约12倍。

配制上面列举的表面活性剂和抑制E T肽的混合水溶液或它们各自的水溶液作为在上述方法1)中使用的溶液，即，含表面活性剂和抑制E T肽的溶液或是分别含它们的溶液，使它们具有合适的浓度，而且最好是在确定了这些水溶液不活化A L溶液和既不增强也不抑制试验中的反应之后再使用。含表面活性剂和抑制E T肽的溶液或分别含它们的溶液可以在121℃下蒸压加热20分钟以便灭菌。溶液中表面活性剂的浓度并不严格，只要用溶液稀释待测样品得到的稀释液中表面活性剂的最终浓度处在上述范围，自容易操作的角度考虑，该浓度通常为0.01 - 10 W/V%、优选0.1 - 5 W/V%、更优选

0.2 - 2 W/V %。溶液中抑制E T肽的浓度也并不严格，只要用溶液稀释待测样品所得的稀释液中抑制E T肽的最终浓度处在上述范围，自容易操作的角度考虑，此浓度通常为0.00002 - 0.2 W/V %，优选0.0002 - 0.1 W/V %，更优选0.002 - 0.02 W/V %。

在上述方法2)中使用的含预定数量表面活性剂和抑制E T肽的A L溶液当然可以是曾经冷冻干燥过，以试剂形式贮存，重新溶解在不含A L溶液活性物质的水中(例如注射用蒸馏水)，然后使用。

因为本发明的抑制方法通过同时使用少量的表面活性剂和抑制E T肽可以完全抑制样品中的E T活性，所以此方法非常经济合算。用本发明抑制方法处理过的样品中的表面活性剂和抑制E T肽的含量低，因此可以用来作为用鲎试验测定E T类似物的样品，而不必担心表面活性剂和抑制E T肽对鲎试验的影响。

根据E T的种类(来源)，只使用低浓度的抑制E T肽本身就可以充分抑制其E T活性。这种抑制是可能的，例如在由大肠埃希杆菌0127 : B8衍生的E T的情形。但是，在必须抑制E T的活性以便测定样品中的E T类似物而又不清楚样品中含有何种E T时，当然最好是采用本发明的抑制方法。

本发明的抑制E T活性的方法可以在例如以下场合中使用。

在用鲎试验测定样品中E T类似物(例如 β -葡聚糖，更确切地是(1 \rightarrow 3)- β -D-葡聚糖)的数量时，可以使用这种抑制E T活性的方法来抑制样品中存在的内毒素对测定结果的影响。

另外，在利用向样品中加入A L溶液以使A L溶液活化、接着加入合成底物以测定样品中的内毒素或内毒素类似物时，可以使用这种抑制E T活性的方法消除所用试剂(例如带有内毒素的合成底物)的

污染。

再者，在使用培养的细胞等物质的实验中，当培养的细胞易受内毒素影响时，可以使用ET活性抑制法消除所用的带内毒素的试剂的污染。

为了测定在用本发明的抑制方法处理的样品中的ET类似物，用使用AL溶液的常规方法足以进行测定，例如所谓的鲎试验，即，采用专用装置〔如毒素计ET-201（Wako纯粹化学公司）、毒素计MT-251（Wako纯粹化学工业公司）、LAL-5000（Cape Code联合公司（ACC）等〕的动态浊度方法；用合成底物测定由于AL溶液的活化而产生的蛋白酶活性的显色方法；或是用肉眼判断AL溶液的活化是否产生了凝乳的凝乳-凝块方法。

根据本发明的ET类似物并无严格要求，只要它与ET不同，并且和AL溶液反应从而导致酶活化反应或凝乳反应。ET类似物的典型实例是 $(1 \rightarrow 3) - \beta - D -$ 葡聚糖及其衍生物，任何多糖均可作为 $(1 \rightarrow 3) - \beta - D -$ 葡聚糖及其衍生物的实例，没有特别的限制，只要它含有 $(1 \rightarrow 3) - \beta - D -$ 葡萄糖苷键。优选的 $(1 \rightarrow 3) - \beta - D -$ 葡聚糖的实例是得自例如各种细菌（如产碱杆菌属、土壤杆菌属等）、酵母（如酵母属、念珠菌属、隐球菌属、毛孢子菌属、红酵母属等）、霉菌（如曲霉属、毛霉菌属、青霉属、毛癣菌属、孢子丝菌属、瓶霉属等）、放线菌（放线菌属、诺卡氏菌属等）和蘑菇（如丝膜香菇、裂褶菌、采绒革盖菌等）的细胞壁或其它组分的天然多糖，天然多糖的具体实例有凝乳多糖（Curdian）、茯苓多糖、硬多糖（Sclerotan）、香菇糖、裂褶菌素、云芝多糖等；藻类的贮存多糖，例如褐藻、眼虫藻、硅藻等，贮存多糖的具体实例是昆布多糖、

裸藻多糖等。(1→3)-β-D-葡聚糖衍生物的优选实例是按照常规方法向天然多糖或贮存多糖中引入至少一个基团后得到的多糖衍生物,所述的基团选自磺酸基、羧甲基、羧乙基、甲基、羟乙基、羟丙基、磺丙基等,所述的常规方法可以是例如下述文献中提到的任何方法: Munio Kotake "Daiyuki-Kagaku" Vol. 19, 第七施, Asakura Shoten, 1967年5月10日, 70-101页; A. E. Clarke等, *Phytochemistry*, Vol. 1, 175-188页(1967); 和 Sasaki等, *Europ. J. Cancer*, 15, 211-215(1967)。

对于可用于本发明中的AL溶液并无严格要求,只要它能用于通常的ET测定。它们可以是由AL溶液的冷冻干燥产品配制的AL溶液,这些产品可以由以下公司购得: Cape Cod联合公司(ACC)、HAEMACHEM公司、Biowhittaker公司、Endosafe公司、Teikoku激素制造公司和Seikagaku Kogyo公司。此外,任何AL溶液均可作为实例,没有特定的限制,只要它们是由属于鲎属、Tachyplesus属或蝎蟹(Carcinoscorpius)属的鲎血细胞制得的,并且与一种AL溶液活性物质反应以进行酶(蛋白酶或类似物)活化或胶凝反应。

下面参照实施例进一步详细说明本发明,这些实施例仅供示例说明用,而不是作为限制。

实施例1

[试剂]

• ET溶液

称量10mg大肠埃希杆菌(E. Coli) 055 : B5 LPS(可自

Difco 实验室得到), 溶解在 10 ml 注射用蒸馏水中制得 1 mg/ml 的溶液作为起始溶液, 用注射用蒸馏水适当稀释起始溶液, 得到使用的溶液。

· AL 溶液

将由属于萤属的萤衍生得到的 AL 溶液冷冻干燥产品(以后将此冷冻干燥产物简称为“LAL”; 可自 Wako 纯粹化学工业公司得到; 溶解在 2 ml 中)溶解在供 LAL 再组的缓冲液中(HS)(Wako 纯粹化学工业公司制造), 用这样得到的 LAS 溶液作为 AL 溶液。

· 表面活性剂水溶液

用注射用的蒸馏水将聚氧乙烯乙二醇对叔辛基苯基醚(一种非离子表面活性剂, Wako 纯粹化学工业公司制造)稀释成 1.0 W/V%, 将所得的稀释液在 121℃ 下蒸压 20 分钟以得到起始溶液。用注射用蒸馏水适当稀释起始溶液, 在确定它不会活化 AL 溶液而且既不抑制也不增强用萤试验测定 βG 的反应之后, 用此溶液作为表面活性剂水溶液。

多粘菌素 B (以后简称“PxB”)水溶液

用注射用蒸馏水将 PxB 硫酸盐(Wako 纯粹化学工业公司制造)稀释成 1.0 W/V%, 所得的稀释液在 121℃ 下蒸压 20 分钟以得到起始溶液。用注射用蒸馏水(或上面配制的 0.2 W/V% 表面活性剂水溶液)将起始溶液适当稀释, 在确定它们不会活化 AL 溶液和既不抑制也不增强用萤试验测定 βG 的反应之后, 用此溶液作为 PxB 水溶液。

[步骤]

向 2.0 ml 正常人的肝素化血浆中加入 20 μl 预定浓度的 ET

溶液，分别用 $900 \mu\text{l}$ 注射用蒸馏水、预定浓度的各个 PxB 水溶液、或预定浓度的各表面活性剂水溶液将上面形成的 $100 \mu\text{l}$ 掺 ET 的血浆稀释 10 倍（即 $1/10$ ）。将这样得到的各稀释液在 80°C 下热处理 5 分钟，然后立即用水冷却（ET、PxB 和表面活性剂的最终浓度分别为 2 纳克/毫升、 $0.0018 - 0.009 \text{ W/V}\%$ 和 $0.09 - 0.45 \text{ W/V}\%$ ）。使用“毒素计 MT-251”这种设备（Wako 纯粹化学工业公司制造）和常规方法对这样得到的稀释血浆中的 ET 浓度测定如下。

将 0.1 ml 上述的稀释血浆加到 0.1 ml LAL 溶液中，搅拌，随后在保持温度为 37°C 的同时，测定所得混合物的透光率减少 5% 所需的时间（以后简称为“ T_g ”）。利用表示 ET 浓度和 T_g 之间关系的校正曲线由这样得到的 T_g 值确定稀释血浆中的 ET 浓度，校正曲线事先按照与上述相同的方式测定得到，但是使用不同浓度的 ET 溶液作为样品。

〔结果〕

图 1 和 2 表示所得的结果。图 1 表示由用各表面活性剂溶液稀释的血浆得到的结果，用稀释并且加热过的血浆的胶凝时间（ T_g ）作为纵轴、各个表面活性剂浓度（在热处理时）作为横轴作图得到。图 2 表示由用各 PxB 溶液稀释的血浆得到的结果，用稀释并且加热过的血浆的胶凝时间（ T_g ）作为纵轴、各个 PxB 浓度（在热处理时）作为横轴作图得到。在图 2 中， $-\Delta-$ 表示只用含 PxB 的水溶液所得的结果， $-\square-$ 表示使用含 PxB 和 $0.2 \text{ W/V}\%$ 表面活性剂（聚氧乙烯乙二醇对叔辛基苯基醚）的水溶液得到的结果（在然处理时表面活性剂浓度为 $0.18 \text{ W/V}\%$ ）。在图 2 中， (\square) 表示 T_g 为 90 分钟或

更长，换言之，来检测出ET。

由图1的结果显然可见，由用注射用蒸馏水稀释的血浆得到的T_g值为7.8分，而自用0.1-0.5%的各表面活性剂溶液（热处理时表面活性剂浓度为0.09-0.45%）稀释的血浆得到的T_g值长至16.3-33.7分，说明ET活化AL溶液的能力（ET活性）已被破坏（T_g越小，ET活性越高）。由图2所示的结果显然可见，由用注射用蒸馏水稀释的血浆得到的T_g值为7.8分，而自用0.002-0.01 W/V%的各PxB水溶液（热处理时的PxB浓度为0.0018-0.009 W/V%）稀释的血浆得到的T_g值大到24.2-32.9分，表明ET活性被降低了。另外，由图2的结果可以看出，在用含0.002-0.01 W/V%的PxB和0.2%表面活性剂（热处理时表面活性剂和PxB的浓度分别为0.18%和0.0018-0.009 W/V%）的水溶液稀释血浆时，检测不出ET（T_g变成90分钟或更长）。

由上述结果显然可见，掺加到血浆中的大肠埃希杆菌0.55 : B5 LPS的活性由于表面活性剂和PxB的同时存在而被完全抑制。

实施例2

〔试剂〕

使用与实施例1中所述的相同的AL溶液、表面活性剂水溶液和PxB水溶液。

。ET溶液

称量10 mg大肠埃希杆菌0111 : B4 LPS（可自Difco实验室得到），溶在10 ml注射用的蒸馏水中，配成1 mg/ml溶液作为起始溶液，用注射用蒸馏水将起始溶液适当稀释，得到使用的溶液。

〔步骤〕

将预定浓度的 $12 \mu\text{l}$ ET 溶液加到 0.6 ml 正常人的肝素化血浆中，分别用 $900 \mu\text{l}$ 注射用蒸馏水、 $0.04 \text{ W/V} \%$ 表面活性剂水溶液、 $0.2 \text{ W/V} \%$ 表面活性剂水溶液或 $0.01 \text{ W/V} \%$ PxB 水溶液〔含 $0.2 \text{ W/V} \%$ 表面活性剂聚氧乙烯乙二醇对叔辛基苯基醚〕将 $100 \mu\text{l}$ 上面形成的掺 ET 血浆稀释 10 倍。将这样得到的各稀释液在 80°C 下热处理 5 分钟，然后立即用冰冷却（ET 的最终浓度为 1.96 纳克/毫升 ）。按照与实施例中的同样方式测定这样得到的稀释血浆中的 ET 浓度。

〔结果〕

所得的结果列在表 1 中。

表 1

稀释剂	Tg (分)	浓度 (10^{-2} g/ml)
注射用蒸馏水	10.0	289.1
0.04% 表面活性剂水溶液	6.3	2363.0
0.2% 表面活性剂水溶液	40.4	3.4
0.01% PxB 水溶液 (含 0.2% 表面活性剂)	> 90	-

由表 1 所示结果显然可见，由用注射用蒸馏水稀释的血浆得到的 Tg 值为 10.0 分，而自用 $0.2 \text{ W/V} \%$ 表面活性剂水溶液（热处理时的表面活性剂浓度为 $0.18 \text{ W/V} \%$ ）稀释的血浆得到的 Tg 值大到 40.4 分，表明 ET 活性被降低了。还可以看出，在用 $0.01 \text{ W/V} \%$ PxB 水溶液（含 $0.2 \text{ W/V} \%$ 表面活性剂）（热处理时 PxB 和表面活性剂的浓度分别为 $0.009 \text{ W/V} \%$ 和 $0.18 \text{ W/V} \%$ ）稀释血浆时，检

测不出E T (T g 变成90分钟或更长)。在用0.04%表面活性剂水溶液稀释血浆的情形, T g 值较用注射用蒸馏水稀释血浆的情形更小(E T 活性更高)。其原因可假定如下: 血浆中存在的能抑制E T 与A L 溶液反应的因子的影响由于表面活性剂的加入而减小了。

由上述结果显然可见, 掺加到血浆中的大肠埃希杆菌0.111 : B4 LPS 的E T 活性由于表面活性剂和PxB的同时存在而被完全抑制。

实施例3

[试剂]

使用与实施例中所述的相同的A L 溶液、表面活性剂水溶液和PxB水溶液。

· E T 溶液

称量10mg大肠埃希杆菌0127 : B8 LPS (可自Difco实验室得到), 溶在10ml注射用蒸馏水中, 配成1mg/ml溶液作为起始溶液, 用注射用蒸馏水将起始溶液适当稀释, 配制成使用的溶液。

[步骤]

将14μl预定浓度的E T 溶液加到0.7ml正常人的肝素化血浆中, 分别用900μl注射用蒸馏水、0.04W/V%表面活性剂水溶液、0.2W/V%表面活性剂水溶液、0.01W/V%PxB水溶液或含有0.2W/V%表面活性剂(聚氧乙烯乙二醇对叔辛基苯基醚) 的0.01W/V PxB水溶液将100μl这样形成的掺E T 的血浆稀释10倍。将这样得到的各稀释溶液在80℃下热处理5分钟, 然后立即用冰冷却(E T 的最终浓度为 $1.96 \times 10^{-9} \text{g/ml}$)。按照与实施例中相同的方式测定这样得到的稀释血浆中的E T 浓度。

[结果]

所得的结果列在表2中。

表2

稀释剂	Tg (分)	浓度 (10^{-12} g/ml)
注射用蒸馏水	10.6	221.2
0.04%表面活性剂水溶液	6.6	2152.0
0.2%表面活性剂水溶液	28.6	6.3
0.01% PxB 水溶液	> 90	-
0.01% PxB 水溶液 (含 0.2%表面活性剂)	> 90	-

由表2所列结果显然可见, 由用注射用蒸馏水稀释的血浆得到的Tg值为10.6分, 而由用0.2 W/V%表面活性剂水溶液(热处理时表面活性剂的浓度为0.18 W/V%)稀释的血浆得到的Tg值大到28.6分, 表明ET活性被降低了。还可以看出, 在用0.01 W/V% PxB水溶液或含0.2 W/V%表面活性剂的0.01 W/V% PxB水溶液(热处理时PxB和表面活性剂的浓度分别为0.009 W/V%和0.18 W/V%)稀释血浆时, 检测不出ET(Tg变成90分钟或更长)。在用0.04%表面活性剂水溶液稀释血浆的情形, Tg值比用注射用蒸馏水稀释血浆的情形更小(ET活性更高)。其原因假定如下: 由于表面活性剂的存在, 减小了血浆中存在的能抑制ET与AL反应的因子的影响。

由上述结果显然可见, 表面活性剂和PxB的同时存在完全抑制了掺加到血浆中的大肠埃希杆菌0.127: B8 LPS的ET活性。

实施例4

〔试剂〕

使用与实施例1中所述相同的AL溶液、表面活性剂水溶液和PxB水溶液。

· ET溶液

称量 10mg 大肠埃希杆菌0128:B12 LPS(可自Difco实验室得到),溶在 10毫升 注射用蒸馏水中,配成 $1\text{mg}/\text{ml}$ 的溶液作为起始溶液,用注射用蒸馏水将起始溶液适当稀释,配制成使用的溶液。

〔步骤〕

将 $13\text{ }\mu\text{l}$ 预定浓度的ET溶液加到 1.3 ml 正常人的肝素化血浆中,分别用 $900\text{ }\mu\text{l}$ 注射用蒸馏水、各个预定浓度的表面活性剂水溶液、各个预定浓度的PxB水溶液、或含有 $0.1\text{ W/V}\%$ 或 $0.2\text{ W/V}\%$ 表面活性剂(聚氧乙烯乙二醇对叔辛基苯基醚)的各个预定浓度的PxB溶液将 $100\text{ }\mu\text{l}$ 上面形成的掺ET的血浆稀释10倍。将这样得到的各稀释液在 $80\text{ }^\circ\text{C}$ 下热处理5分钟,然后立即用冰冷却(ET、PxB和表面活性剂的最终浓度分别是 $2\times 10^{-9}\text{ g}/\text{ml}$ 、 $0.00009-0.009\text{ W/V}\%$ 和 $0.09-0.9\text{ W/V}\%$)。按照与实施例1相同的方式测定这样得到的稀释血浆中的ET浓度。

〔结果〕

图3至5表示了所得的结果。图3表示由用各表面活性剂溶液稀释的血浆得到的结果,以稀释和加热过的血浆的胶凝时间(T_g)作为纵轴、各个表面活性剂浓度(在热处理时)作为横轴作图得到。图4代表由用各PxB溶液稀释的血浆得到的结果,以稀释和加热过的血浆的胶凝时间(T_g)作为纵轴、各个PxB浓度(在热处理时)作为

横轴作图得到。图5表示由用含表面活性剂和PxB的各水溶液得到的结果，以稀释和加热过的血浆的胶凝时间(T_g)作纵轴、以各个PxB浓度(在热处理时)作横轴作图得到。在图5中，-□-代表用含0.1 W/V%表面活性剂(热处理时的表面活性剂浓度为0.09 W/V%)的水溶液得到的结果，-X-表示用含0.2 W/V%表面活性剂(热处理时的表面活性剂浓度为0.18 W/V%)的水溶液得到的结果。图4中的(O)和图5中的(□)及(X)都表示 T_g 为90分钟或更长，换言之，检测不出ET。

由图3至图5中所示的结果显然可见，血浆中的ET活性可以由0.009 W/V% PxB的存在或表面活性剂与PxB的同时存在而被完全抑制。还可以看出，在用本发明的方法抑制ET活性时，PxB的用量可以减小(减小到只用PxB时的百分之一)，换言之，本发明的方法在经济上优于只有PxB的常规方法。

实施例5

[试剂]

使用与实施例1中所述相同的AL溶液、表面活性剂水溶液和PxB水溶液。

· ET溶液

称量10 μ g鼠伤寒沙门氏菌LPS(可自Difco实验室得到)，溶在10ml注射用蒸馏水中，配制成1 μ g/ml的溶液作为起始溶液，用注射用蒸馏水将起始溶液适当稀释，配制成使用的溶液。

[步骤]

将10 μ l预定浓度的ET溶液加到1.0毫升正常人的肝素化血浆中，分别用900 μ l注射用蒸馏水、0.2 W/V%表面活性剂水溶

液、0.01 W/V % PxB 水溶液或含 0.2 W/V % 表面活性剂(聚氧乙
烯乙二醇对叔辛基苯基醚)的 0.01 W/V % PxB 水溶液将 $100 \mu\text{l}$
这样形成的掺 ET 的血浆稀释 10 倍。将这样得到的各稀释液在 80
℃下热处理 5 分钟,然后立即用水冷却(ET 的最终浓度为 2×10^{-9}
g/ml)按照与实施例 1 中相同的方式测定这样得到的稀释血浆中
的 ET 浓度。

[结果]

所得的结果列在表 3 中。

表 3

稀释剂	Tg (分)	浓度 (10^{-12} g/ml)
注射用蒸馏水	8.2	453.6
0.2 % 表面活性剂水溶液	12.3	77.9
0.01 % PxB 水溶液	13.4	55.7
0.01 % PxB 水溶液 (含 0.2 % 表面活性剂)	> 90	-

由表 3 所列的结果显然可见,表面活性剂和 PxB 同时存在完全抑
制了掺加到血浆中的鼠伤寒沙门氏菌 LPS 的 ET 活性。

实施例 6

[试剂]

使用与实施例 1 中所述相同的 AL 溶液、表面活性剂水溶液和
PxB 水溶液。

· β -葡聚糖水溶液

称量 100 mg 羧甲基化的凝乳多糖 (Curdlan) [一种线型

(1 → 3) - β - D - 葡聚糖衍生物, Wako 纯粹化学工业公司制造), 溶在 10 毫升注射用蒸馏水中, 配制成 10 mg/ml 的溶液作为起始溶液, 用注射用蒸馏水将起始溶液适当稀释, 配制成使用的溶液。

[步骤]

用 $900 \mu\text{l}$ $0.2 \text{ W/V} \%$ 表面活性剂水溶液、 $0.01 \text{ W/V} \%$ PxB 水溶液或含 $0.2 \text{ W/V} \%$ 聚氧乙烯乙二醇对叔辛基苯基醚的 $0.01 \text{ W/V} \%$ PxB 水溶液将浓度为 $50 \times 10^{-9} \text{ g/ml}$ 的 $100 \mu\text{l}$ β - 葡聚糖溶液稀释 10 倍, 配成掺 β - 葡聚糖的溶液 (β - 葡聚糖的最终浓度为 $5 \times 10^{-9} \text{ g/ml}$)。用“毒素计 MT - 251” (Wako 纯粹化学工业公司制造) 这种设备和常规方法测定配制的各溶液中的 β - 葡聚糖浓度。在 0.1 ml LAL 溶液中加入 0.1 ml 上述各稀释溶液, 搅拌, 随后在保持温度为 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 的同时测定所形成的混合物的透光率减小 5% 所需的时间 (以后简称为“T_g”)。利用表示 β - 葡聚糖和 T_g 之间关系的校正曲线由这样得到的 T_g 值确定 β - 葡聚糖浓度, 校正曲线事先通过与上述相同的测定方式得到, 但是使用不同浓度的 β - 葡聚糖溶液作为样品。根据测定的结果计算出 β - 葡聚糖的回收率。

[结果]

所得结果示于表 4 中。

表 4

稀释剂	β - 葡聚糖回收率 (%)
0.2% 表面活性剂水溶液	100
0.01% PxB 水溶液	112
0.01% PxB 水溶液 (含 0.2% 表面活性剂)	88

由表4的结果显然可见,无论使用何种稀释溶液, β -葡聚糖的回收率都高达约90%至约110%。因此可以看出,没有一种稀释溶液抑制或者增强AL溶液与 β -葡聚糖的反应。

实施例7

[试剂]

使用与实施例1中所述的相同的AL溶液、表面活性剂水溶液和PxB水溶液。

· ET溶液

称量10mg大肠埃希杆菌026:B6 LPS(可自Difco实验室得到),溶在10ml注射用蒸馏水中配成1mg/ml的溶液作为起始溶液,用注射用蒸馏水将起始溶液适当稀释,配制成使用的溶液。

· 表面活性剂水溶液

按照与实施例1中所述的同样方式配制各种表面活性剂溶液,但是改用以下表面活性剂:脱氧胆酸钠(阴离子表面活性剂,Wako纯粹化学工业公司制造)、Emalgen 709(非离子型表面活性剂,一种聚氧乙烯高级醇醚,商品名称,Kao公司)和Amphitol 20N(两性表面活性剂,商品名称,Kao公司;主要成分:十二烷基二甲基氧化胺)。

[步骤]

将17 μ l预定浓度的ET溶液加到1.7毫升正常人的肝素化血浆中,分别用900 μ l的注射用蒸馏水、0.1W/V%脱氧胆酸钠水溶液、0.2W/V%Emalgen 709水溶液、0.4W/V% Amphitol 20N水溶液、0.01W/V%PxB水溶液、含0.01W/V%PxB的0.1W/V%脱氧胆酸钠水溶液、含0.01W/V%PxB

的 0.2 W/V % Emalgen 709 水溶液、或含 0.01 W/V % PxB 的 0.4 W/V % Amphitol 20N 水溶液将 100 μ l 上述的掺 ET 血浆稀释 10 倍。将这样得到的各稀释溶液在 80 $^{\circ}$ C 下加热 5 分钟，然后立即用冰冷却（ET 最终浓度为 4×10^{-9} g/ml）。按照与实施例 1 相同的方式测定在这样得到的稀释血浆中的 ET 浓度。

〔结果〕

得到的结果列在表 5。

表 5

稀释剂	Tg(分)	浓度 (10^{-12} g/ml)
注射用蒸馏水	9.0	1019.0
0.1 % 脱氧胆酸钠水溶液	7.5	2287.0
0.2 % Emalgen 709 水溶液	27.3	22.7
0.4 % Amphitol 20N 水溶液	52.6	4.3
0.01 % PxB 水溶液	30.8	16.2
0.1 % 脱氧胆酸钠水溶液 (含 0.01 % PxB)	> 90	-
0.2 % Emalgen 709 水溶液 (含 0.01 % PxB)	> 90	-
0.4 % Amphitol 20N 水溶液 (含 0.01 % PxB)	> 90	-

由表 5 所列结果显然可见，各表面活性剂与 PxB 的同时存在完全抑制了掺加在血浆中的大肠埃希杆菌 0.26 : B6 LPS 的 ET 活性。

实施例 8

〔试剂〕

使用与实施例1中所述的相同的AL溶液、表面活性剂水溶液和PxB水溶液。

· 表面活性剂水溶液

按照与实施例1中所述的相同方式配制各种表面活性剂溶液，但是改用以下表面活性剂：聚氧乙烯乙二醇对叔辛基苯基醚（非离子型表面活性剂，Wako纯粹化学工业公司制造）、Emalgen 709（非离子型表面活性剂，商品名称，一种聚氧乙烯高级醇醚，Kao公司制造）和Amphitol 20N（商品名称，两性表面活性剂，主要成分：十二烷基二甲基氧化胺）。

· ET溶液

称量10^{mg}伤寒沙门氏菌0901 LPS（可自Difco实验室得到），溶在10毫升注射用蒸馏水中配成1^{mg}/ml的溶液作为起始溶液，用注射用蒸馏水将起始溶液适当稀释，配成使用的溶液。

〔步骤〕

将10^μl预定浓度的ET溶液加到1.0毫升正常人的肝素化血浆中，分别用900^μl注射用蒸馏水、含0.01 W/V % PxB的0.2 W/V %聚氧乙烯乙二醇对叔辛基苯基醚溶液、含0.01 W/V % PxB的0.2 W/V % Emalgen 709水溶液、或含0.01 W/V % PxB的0.4 W/V % Amphitol 20N水溶液将100^μl上面形成的掺ET血浆稀释10倍。将这样得到的各个稀释溶液在80℃下加热5分钟，然后立即用冰冷却（ET的最后浓度为4纳克/毫升）。按实施例1中的相同方式测定在这样得到的稀释血浆中的ET浓度。

〔结果〕

所得结果示于表6中。

表6

	Tg (分)	浓度 (10^{-12}g/ml)
注射用蒸馏水	7.8	910.9
0.2% 聚氧乙烯乙二醇对叔辛基苯基醚水溶液 (含0.01% PxB)	> 90	-
0.2% Emalgen 709 水溶液 (含0.01% PxB)	> 90	-
0.4% Amphitol 20N 水溶液 (含0.01% PxB)	> 90	-

由表6所列的结果显然可见,各表面活性剂和PxB同时存在完全抑制了掺加到血浆中的伤寒沙门氏菌0910 LPS的ET活性。

实施例9

[试剂]

使用与实施例1中所述的相同的AL溶液、表面活性剂水溶液和PxB水溶液。

β -葡聚糖水溶液

称量108mg凝乳多糖(Curdian) [一种线型(1→3)- β -D-葡聚糖衍生物, Wako纯粹化学工业公司制造], 先加入10ml注射用蒸馏水然后加入800 μ l 1N NaOH使其溶解, 配成10mg/ml的溶液。用注射用蒸馏水将此溶液稀释10倍以得到起始溶液, 将起始溶液用注射用蒸馏水适当稀释, 用这样得到的溶液作

为 β -葡聚糖水溶液。

〔步骤〕

用 $900\mu\text{l}$ 含 $0.01\text{ W/V}\%$ PxB的预定浓度的各种表面活性剂水溶液将 $100\mu\text{l}$ 浓度为 $10\times 10^{-9}\text{ g/ml}$ 的 β -葡聚糖水溶液稀释10倍,配制成含有掺加的 β -葡聚糖的溶液(在掺 β -葡聚糖的溶液中, β -葡聚糖的最终浓度为 $1\times 10^{-9}\text{ g/ml}$,PxB和表面活性剂的最终浓度分别为 $0.009\text{ W/V}\%$ 和 $0.9-4.5\text{ W/V}\%$)。按照与实施例6中所述的相同方式测定自各种掺 β -葡聚糖溶液中的 β -葡聚糖回收率。

〔结果〕

所得的结果示于图6。图6是以 β -葡聚糖的回收率为纵坐标、相应的各个表面活性剂浓度(在含 $0.009\text{ W/V}\%$ PxB的掺 β -葡聚糖溶液中)为横坐标作图得到的。

由图6所示的结果显然可见,即使表面活性剂的浓度增加, β -葡聚糖的回收率仍保持恒定在约90%。由此事实可以断定,在以上的表面活性剂浓度范围内,表面活性剂(聚氧乙烯乙二醇对叔辛基苯基醚)既不抑制也不增强AL溶液与 β -葡聚糖的反应。

实施例10

〔试剂〕

使用与实施例1中相同的AL溶液、表面活性剂水溶液和PxB水溶液。

〔步骤〕

分别用 $900\mu\text{l}$ 的注射用蒸馏水、 $0.2\text{ W/V}\%$ 表面活性剂水溶液(聚氧乙烯乙二醇对叔辛基苯基醚)、各个 $0.002-0.01$

W/V % PxB水溶液或含0.002 - 0.01 W/V % PxB的各个0.2 W/V %表面活性剂(聚氧乙烯乙二醇对叔辛基苯基醚)水溶液将100 μ l 预定浓度的ET溶液稀释10倍,配制成掺ET的溶液(最终ET浓度为 2×10^{-9} g/ml,在掺ET的溶液中PxB和表面活性剂的最终浓度分别为0.0018 - 0.009 W/V %和0.18 W/V %)。按照与实施例1中相同的方式测定掺ET溶液中的ET浓度。

[结果]

所得结果示于图7。图7是以掺ET溶液的胶凝时间(Tg)作为纵坐标、相应的各掺ET溶液中的PxB浓度作为横坐标作图得到的。在图7中, - Δ - 表示由用不同浓度的PxB水溶液配制的掺ET溶液所得的结果, - \square - 代表由用含0.2 W/V %表面活性剂的PxB水溶液配制的掺ET溶液得到的结果。

由图7的结果显然可见,表面活性剂和PxB的同时存在完全抑制了在掺ET溶液中的大肠埃希杆菌055 : B5 LPS的ET活性。

实施例11

[试剂]

使用与实施例1中所述相同的AL溶液、表面活性剂水溶液和PxB水溶液,与实施例8相同的ET溶液和与实施例9相同的 β -葡聚糖溶液。

[步骤]

将10 μ l 4 g/ml的ET溶液和10 μ l的 100×10^{-9} g/ml β -葡聚糖溶液加到1.0毫升正常人的肝素化血浆中,分别用900 μ l的注射用蒸馏水、0.2 W/V %表面活性剂(聚氧乙烯乙二醇对叔辛基苯基醚)水溶液、0.01 W/V % PxB水溶液、或含0.01

W/V % PxB的0.2 W/V %表面活性剂(聚氧乙烯乙二醇对叔辛基苯基醚)水溶液将100 μ l所得的掺ET和 β -葡聚糖的血浆稀释10倍。将这样得到的各个稀释溶液在80 $^{\circ}$ C下热处理5分钟,然后立即用冰冷却(ET和 β -葡聚糖的最终浓度为 3.92×10^{-9} g/ml和 196×10^{-12} g/ml)。按照与实施例6相同的方式测定这样得到的稀释血浆中的 β -葡聚糖浓度。对于在同一血浆中加入10 μ l注射用蒸馏水和10 μ l 20×10^{-9} g/ml β -葡聚糖溶液配制而成的混合物进行与上述相同的步骤,测定混合物中的 β -葡聚糖浓度。

再根据测定结果计算 β -葡聚糖的回收率。

[结果]

所得结果列在表7中。

表7

稀释剂	β -葡聚糖的回收率(%)	
	掺ET血浆	未掺ET的血浆
注射用蒸馏水	54200	107
0.2%表面活性剂水溶液	3540	98
0.01% PxB水溶液	893	105
0.01% PxB水溶液(含0.2%表面活性剂)	117	112

由表7的结果显然可见,仅仅在测定 β -葡聚糖期间同时有表面活性剂和PxB存在时, β -葡聚糖的测定才能不受样品中存在的ET的影响(此影响造成测定值的正误差)。

由以上显然可见，本发明提供了一种有效地抑制样品中E T活性的方法。本发明的方法比常规方法能更容易和更肯定地抑制E T活性，从而有可能测定E T类似物而不受E T的影响。因此，本发明对工艺作出了重要贡献。

图 1

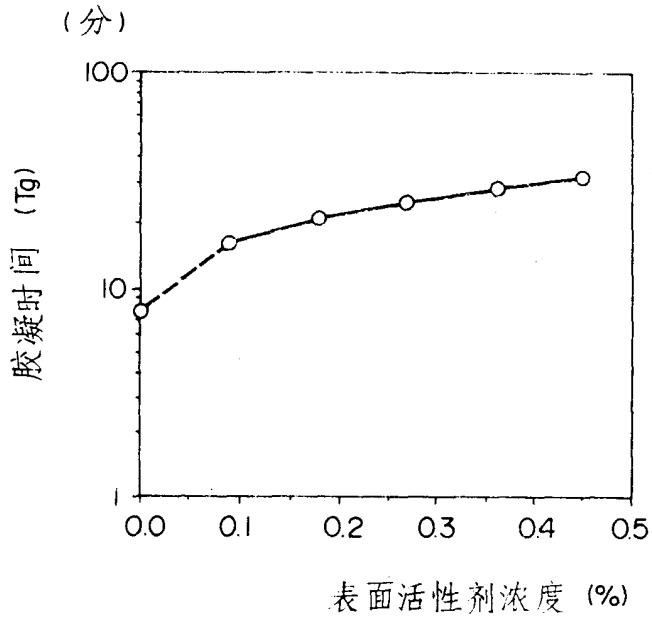


图 2

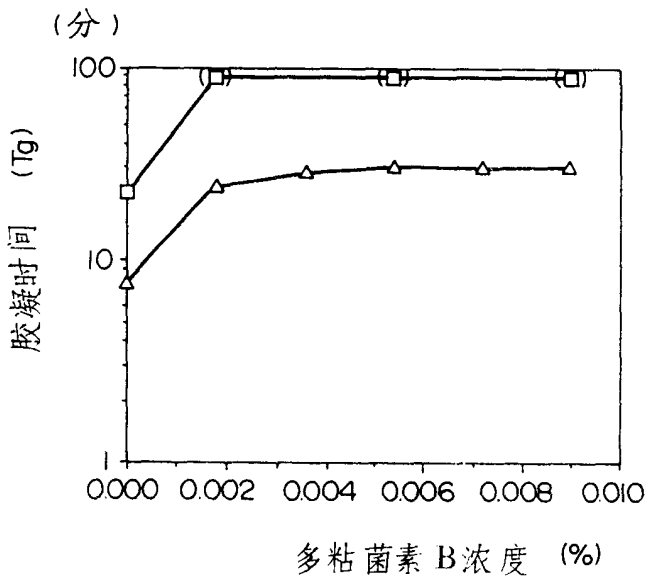


图 3

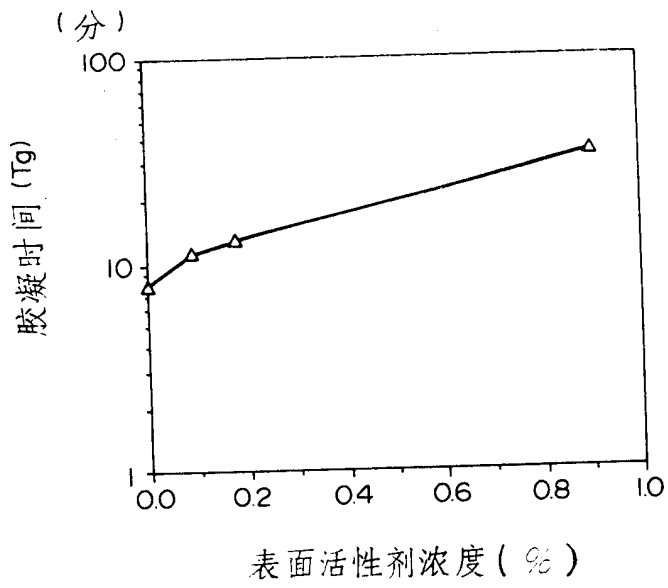


图 4

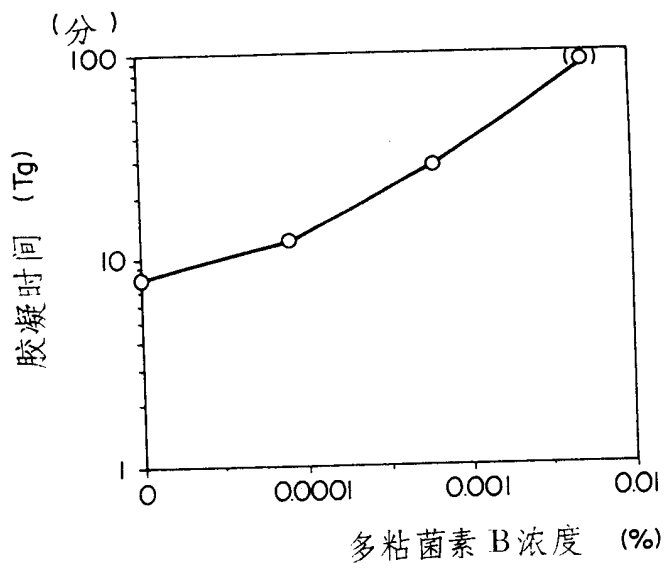


图5

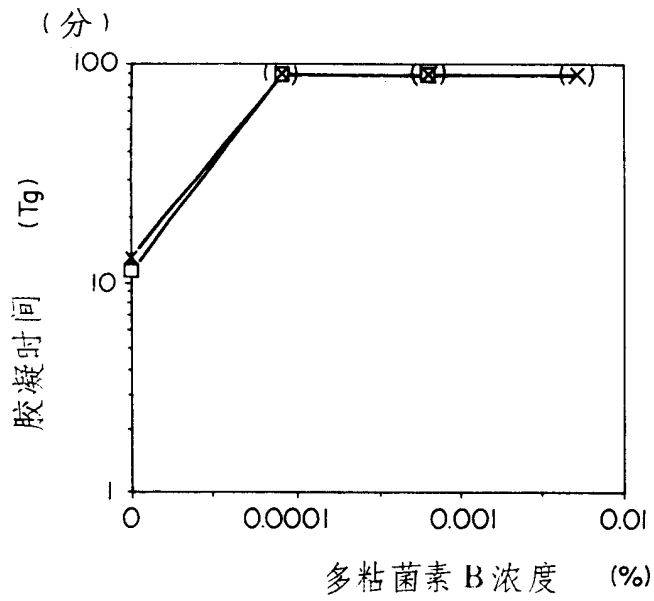


图6

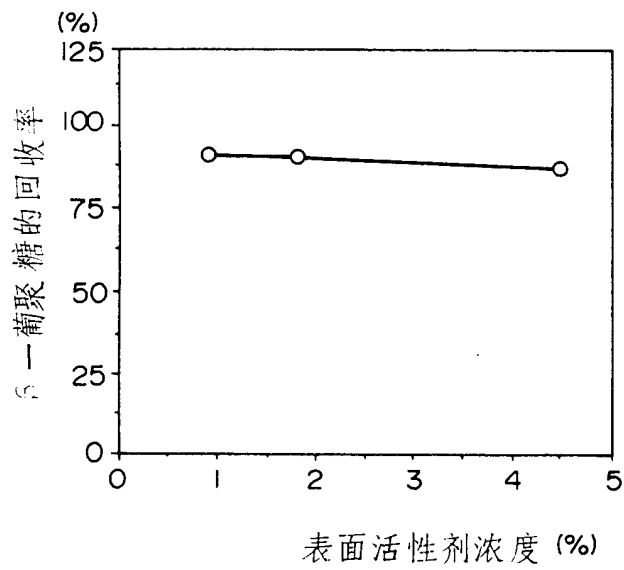


图7

