



[12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 94117898.6

[51]Int.Cl⁶

G01N 33 / 579

[43]公开日 1996年7月17日

[22]申请日 94.9.30

[30]优先权

[32]93.9.30 [33]JP[31]265479 / 93

[71]申请人 生化学工业株式会社

地址 日本东京都

[72]发明人 田村弘志 小田俊男 田中重则

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 杨丽琴

C12Q 1 / 37

权利要求书 2 页 说明书 28 页 附图页数 2 页

[54]发明名称 用于内毒素特异性鉴别的试剂

[57]摘要

经单独利用 C 因子系统反应可特异性鉴别内毒素 (Et) 而不受包含在鲎变形细胞溶解物试剂中的 G 因子的影响。

本发明提供：(1) 用于 Et 特异性鉴别的含有鲎变形细胞溶解物试剂和烷基葡糖苷的试剂；(2) 一种使用鲎变形细胞溶解物试剂特异性鉴别样品中 Et 的方法，其中将烷基葡糖苷加入到鲎变形细胞溶解物试剂和 / 或样品中；以及 (3) 一种 G 因子激活抑制组合物，其中含有作为能够抑制由 (1→3) -β-D-葡聚糖引起的鲎变形细胞中 G 因子激活作用的活性成分的烷基葡糖苷。

权 利 要 求 书

1. 一种用于内毒素特异性鉴别的试剂，含有鲎变形细胞溶解物试剂和烷基葡糖苷。
2. 按照权利要求1的用于内毒素特异性鉴别的试剂，其中包含能抑制存在于所说鲎变形细胞溶解物试剂中G因子激活作用的有效量的烷基葡糖苷。
3. 按照权利要求1的用于内毒素特异性鉴别的试剂，其中包含在烷基葡糖苷中的烷基具有1到30个碳原子。
4. 按照权利要求1的用于内毒素特异性鉴别的试剂，其中所说的烷基葡糖苷是烷基- β -D-葡糖苷或烷基-S- β -D-葡糖苷。
5. 按照权利要求1的用于内毒素特异性鉴别的试剂，其中所说的烷基葡糖苷选自n-辛基- β -D-葡糖苷、n-庚基- β -D-葡糖苷、n-癸基- β -D-葡糖苷、n-辛基- β -D-硫代葡糖苷和n-庚基- β -D-硫代葡糖苷。
6. 一种使用鲎变形细胞溶解物试剂特异性鉴别样品中内毒素的方法，其中，将烷基葡糖苷加入到鲎变形细胞溶解物试剂和/或样品中。
7. 按照权利要求6的特异性鉴别内毒素的方法，其中烷基葡糖苷以抑制存在于鲎变形细胞溶解物试剂中的G因子激活作用的有效量加入。
8. 一种用于内毒素特异性鉴别的试剂盒，其中包括鲎变形细胞溶解物试剂和含有烷基葡糖苷的试剂。

9. 按照权利要求8的试剂盒, 其中所说的含有烷基葡糖苷的试剂还含有缓冲剂。

10. 按照权利要求8的试剂盒, 其中还包括含有凝固酶底物的试剂。

11. 按照权利要求10的试剂盒, 其中所说的底物是凝集原或合成肽底物。

12. 一种G因子激活抑制剂组合物, 其中含有作为能抑制由(1→3)-β-D-葡聚糖引起的存在于鲎变形细胞中的G因子激活作用的活性成分的烷基葡糖苷和无内毒素的水或缓冲剂。

13. 一种抑制存在于鲎变形细胞溶解物试剂中的G因子激活作用的方法, 包括将烷基葡糖苷加入到鲎变形细胞溶解物试剂中。

14. 烷基葡糖苷在用鲎变形细胞溶解物试剂特异性鉴别内毒素中的用途。

说明书

用于内毒素特异性鉴别的试剂

本发明涉及使用了鲎变形细胞溶解物试剂的用于内毒素特异性鉴别的试剂、鉴别内毒素的方法、用于该鉴别方法的试剂盒、G因子激活作用抑制剂组合物。

业已知道使用鲎变形细胞溶解物(下文中有时简称为溶解物)鉴别内毒素(下文中有时简称为Et)的方法。这一鉴别方法一般称作“鲎试验”，参与这一鉴别的溶解物的反应称作“鲎反应”。由于检测灵敏度高，这一方法已经常用于各领域包括药物或水的热原检测和临床诊断中。该方法基于有痕量Et存在下溶解物的凝固。最近的生命化学研究证明这一反应包括了几个凝固因子的逐步激活[J. Protein Chem., 5, 255-268(1986)]。

使用从 *Tachypleus tridentatus* 获得的溶解物的反应可结合附图1来说明。当Et加入到溶解物中时，存在在溶解物中的C因子(一种Et敏感因子，分子量为123,000)被激活。然后，如此形成的激活的C因子限制性水解B因子(分子量为64,000)的特异位点从而形成激活的B因子。激活的B因子激活前凝固酶(proclotting enzyme)(分子量为54,000)使其转化为凝固酶。该凝固酶在以二硫化物键交联的环的特异位点(即，Arg¹⁸-Thr¹⁹和Arg⁴⁶-Gly⁴⁷)限制性水解凝集原(促凝剂蛋白，分子量为19,723)。这样，由H-Thr¹⁹...Arg⁴⁶-OH(含有28个氨基酸残基)所代表的C

肽游离出来，残余部分转化成凝固素胶。这样，萤反应由一系列反应组成，该反应也称作串联(cascade)反应(这一由Et 引发的串联反应此后称作C因子系统反应)。

另一方面，业已阐明，该溶解物质反应不仅针对Et，也针对样品中的(1→3)-β-D-葡聚糖(此后有时简称作β-葡聚糖)。就是说，示于附图1的G因子(一种β-葡聚糖敏感因子)被激活，由此形成的激活的G因子激活前凝固酶成凝固酶，从而形成凝固素胶。

(这一由β-葡聚糖引发的串联反应此后称作G因子系统反应)。

上述串联反应中形成的凝固酶将分别加到该反应系统里以释放对硝基苯胺的合成底物中的酰胺键进行水解。所述合成底物例如，1-丁氧羰基-亮氨酸-甘氨酸-精氨酸-对硝基苯胺(Boc-Leu-Gly-Arg-pNA)，Boe-Val-Leu-Gly-Arg-pNA (SEQ ID NO:1)、苄氧羰基-亮氨酸-甘氨酸-精氨酸-对硝基苯胺(Z-Leu-Gly-Arg-pNA)、Boc-Ile-Glu-Gly-Arg-pNA (SEQ ID NO:2)，Boc-Val-Ser-Gly-Arg-pNA (SEQ ID NO:3) 或Boc-Ser-Gly-Arg-pNA。因而，Et或β-葡聚糖可通过测定有色物质(对硝基苯胺)的吸光度来定量。

如上的讨论，溶解物通常含有既参与C因子系统反应，又参与G因子系统反应的组分。当使用这一溶解物鉴别该样品中的Et时，恐怕会进行由可能包含在该样品中的β-葡聚糖引发的G因子系统反应并产生错误的结果。

由此，业已证明，萤试验是一种不是对Et特异的鉴别方法，因而，人们一直尝试着建立用于Et特异性鉴别的方法。

例如，已知当具有一定数量的键合在其中的(1→3)-β-D-葡聚糖苷结构单元的聚葡糖苷(polyglycoside)加入到溶解物，或将能

固定聚葡萄糖苷的不溶载体或不溶于水的聚葡萄糖苷与该溶解物接触时，因子G的激活作用被抑制，而因子c系统反应不受抑制，由此可特异性鉴别内毒素(US专利 5,155,032、5,179,006和 5,047,353; JP-A-2-216462、JP-A-221863和WO92/06381，其中使用的“JP-A”一词意指“未经审查出版的日本专利申请”)。

然而，这些方法需要复杂的操作步骤，包括部分分解和/或碎化(1→3)-β-D-葡聚糖，收集抑制G因子激活作用的组分，并进一步除去内毒素。

已知的将用来进行Et特异性鉴别的样品的预处理方法包括：1) 包含用n-烷基葡萄糖苷和硝酸处理全血的方法(US专利 5,286,625)；2) 包含用a) n-烷基葡萄糖苷、b) 具有咪唑基基团或氨基基团的化合物、c) 碱土金属盐和碱金属氢氧化物的混合溶液处理血浆或血清的方法(EP-A-0513 361)；3) 包含将样品与含有n-烷基葡萄糖苷、hexadimethrine化合物、碱金属氢氧化物和碱土金属卤化物的预处理组合物混合并加热所形成的混合物的方法(EP-A-0,569,033)以及4) 包含用n-辛基-β-D-葡萄糖苷水溶液稀释样品并在60-100°C下加热该混合物3-20分钟的方法(EP-B-0552965)。

这些方法涉及预处理样品以有效抽提其中Et用于Et鉴别，但上述参考文献没有说明抑制存在于溶解物中的G因子的激活作用的功能和效果。

另外，已知在Et鉴别中使用了一种含有溶解物和非离子表面活性剂(吐温-80[®]和吐温-20[®])的缓冲分散体的试剂(U.S.专利 4,322,217)。

然而，当用试剂鉴别样品中的Et时，样品中夹杂的β-葡聚糖

导致进行G因子系统反应，因此，不能获得正确的结果。

本发明的目的之一是使用鲎变形细胞溶解物试剂方便地和特异地鉴别样品中的Et，其中C因子系统反应单独进行而不受溶解物中存在的G因子(β -葡聚糖敏感因子)的影响。

为了达到以上提到的目标，本发明者测试了选择性抑制G因子系统反应，即在该溶解物中由 β -葡聚糖引起的G因子激活作用和/或激活的G因子的活性并不抑制C因子系统反应的物质。结果是成功地发现，当将烷基葡糖苷(alkylglucoside)加入到溶解物中时，由 β -葡聚糖引起的G因子系统反应能被强烈抑制，而由Et引起的C因子系统反应不被明显抑制。

还发现，以上提到的目的能容易地达到，具体地说是使用适量的能容易得到的作为非离子表面活性剂的烷基- β -D-葡糖苷。

相应地，本发明提供：(1)，用于内毒素特异鉴别的含有鲎变形细胞溶解物试剂和烷基葡糖苷的试剂；(2)，如上(1)所描述的用于内毒素特异鉴别的试剂，其中所说的烷基葡糖苷是烷基-0- β -D-葡糖苷或烷基-S- β -D-葡糖苷；以及(3)，G因子激活抑制剂组合物，其中含有作为能够抑制由(1 \rightarrow 3)- β -D-葡聚糖引起的鲎变形细胞中G因子的激活作用的活性成分的烷基葡糖苷。

本发明还提供了用于Et特异性鉴别的试剂盒，其中含有作为组分试剂的鲎变形细胞溶解物试剂和烷基葡糖苷。

另外，本发明提供了使用鲎变形细胞溶解物试剂进行样品中Et特异性鉴别的方法，该方法包括将烷基葡糖苷加到鲎变形细胞溶解物试剂和/或样品中。

此外，本发明提供了抑制G因子激活作用的方法，该方法包括

将烷基葡糖苷加入到含有可被 β -葡聚糖激活的G因子的鲎变形细胞溶解物试剂中。

附图1是用来说明鲎反应机理的图示。

附图2是实施例1-2)的结果,它显示出在加入不同量的n-辛基- β -D-葡糖苷(-○-:未加, -△-: 0.4mg; -□-: 0.8mg; 和-●-: 1.6mg)的情况下由标绘吸光度对内毒素浓度制得的校准曲线。

用于本发明的烷基葡糖苷并没有特别限制,只要含有通过糖苷键连接有烷基的葡萄糖并且具有抑制G因子激活作用的功能。虽然 α -葡糖苷或 β -葡糖苷在此都可应用,但后者优于前者。并且,不仅其中烷基经氧原子连接到葡萄糖上的普通葡糖苷(即O-葡糖苷)在此可使用,而且其中烷基经硫原子连接到葡萄糖上的硫代葡糖苷(即S-葡糖苷)在此也可使用。还有其中烷基经例如硒(Se)或碲(Te)连接到葡萄糖上的那些葡糖苷也可使用。对连接到葡萄糖上的烷基中的碳原子数目并没有特别限制,只要烷基葡糖苷在水中是可溶的或可分散的。一般,碳原子数目的优选范围是从1到30,更优选的是从6到12。本发明的烷基葡糖苷还包含寡葡糖苷或聚葡糖苷,其中,其它糖进一步结合到葡萄糖上,只要其还原末端是烷基葡糖苷。这些寡葡糖苷或聚葡糖苷的例子包括具有一定数目的相互键合的(1 \rightarrow 3)- β -D-葡糖苷结构单元的聚葡糖苷,它被称作G因子激活作用抑制剂(WO90/02951)。具体地说,优选的是n-辛基- β -D-葡糖苷、n-庚基- β -D-葡糖苷、n-十二烷基- β -D-葡糖苷、n-辛基- β -D-硫代葡萄糖苷和n-庚基- β -D-硫代葡萄糖苷。因为它们容易获得。

用于本发明的鲎变形细胞溶解物试剂(此后有时简称作溶解物

试剂)的例子包括:用常规方法[参考例如, J. Biochem., 80, 1011-1021 (1976)]从马蹄形蟹(horseshoe crab)例如 Limulus polyphemus Tachypleus tridentatus, Tachypleus gigas 和 Carcinoscorpius rotundicauda 的血液制备的血细胞提取物。如果需要,可向这些提取物中加入二价金属盐,例如,碱土金属(如镁、钙、锶)的氢卤酸盐(如氯化物)或硫酸盐;凝固酶底物,例如,合成底物(如上提及的Boe-Leu-Gly-Arg-pNA);以及pH调节剂,例如一种缓冲溶液,Tris-HCl缓冲液。此外,商业上可购得的溶解物试剂也可在此使用。这种溶解物试剂可以是以液体、粉末或固体的形式。

为了达到本发明的目的,可以使用:(A)包括在鉴定中使用其中加有烷基葡糖苷以钝化参与G因子系统反应的组分的溶解物试剂(此后有时称作“含烷基葡糖苷溶解物试剂”)的方法:(B)包括将烷基葡糖苷加入到样品中,用普通溶解物试剂鉴别这一含烷基葡糖苷的样品,以钝化溶解物试剂中参与G因子系统反应的组分的方法;或者将(A)与(B)结合的方法,即烷基葡糖苷加到溶解物试剂和样品两者中。

尽管完全钝化溶解试剂中G因子系统反应所需烷基葡糖苷的量依赖于溶解物试剂的类型,本领域技术人员容易用例如下面的方法确定适合的用量。

在冰冷条件下,烷基葡糖苷(无Et)以不同量加入到一定量的溶解物试剂中。然后在常规鉴定的条件下加入足够激活溶解物试剂的一定量的 β -葡聚糖(无Et),接着,使用溶解物试剂在鉴定中通常使用的条件下反应。这样,在上述提到的条件下确定能够完

全抑制由 β -葡聚糖引起的溶解物试剂的激活作用的烷基葡糖苷的量。

基于由此测得的所需烷基葡糖苷的量，确定达到C因子系统反应活性并给出适合样品中Et 浓度的鉴定灵敏度的烷基葡糖苷的量是可能的。依据溶解物试剂的不同，烷基葡糖苷的用量通常为0.05至10%W/V。

下列方法(1)到(9)给出了为鉴别Et 将烷基葡糖苷与溶解物试剂和/或样品接触的实例。

(1)包括在抽提过程中将烷基葡糖苷加入到鲎变形细胞中以得到含烷基葡糖苷溶解物试剂的方法。

(2)包含将烷基葡糖苷加入到提取的溶解物试剂中以得到含烷基葡糖苷的溶解物试剂的方法。

(3)包括将冻干溶解物试剂溶解在含烷基葡糖苷的溶液中以给出含烷基葡糖苷的溶解物试剂的方法。

(4)包括将冻干溶解物试剂溶解在合适的溶剂中，将烷基葡糖苷加入到所形成的溶液中以给出含烷基葡糖苷的溶解物试剂的方法。

(5)包括在合适的溶液中溶解用在抽提过程中将烷基葡糖苷加入到鲎变形细胞中的办法制备的溶解物试剂或用冻干已加入所需量的烷基葡糖苷的溶解物试剂的方法制备的溶解物试剂以给出含有烷基葡糖苷的溶解物试剂的方法。

(6)包括将含有溶解物试剂和合成底物的冻干产物溶解在含有烷基葡糖苷的溶液中，或者将它们溶解在合适的溶液中后，将烷基葡糖苷加入到所形成的溶液中的方法。

(7)包括将所需量的烷基葡糖苷加入到溶解物试剂和合成底物的混合物中，冻干该混合物得到溶解物试剂，将该试剂溶解在合适的溶液中的方法。

(8)包括将所需量的烷基葡糖苷加入到样品中的方法。

(9)包括将样品加入到溶解物试剂中，然后立即向其中加入烷基葡糖苷的方法。

在按照本发明的鉴别Et的方法中，烷基葡糖苷可以任意方式使用。只要溶解物试剂中的C因子系统反应能给出适合鉴定目的灵敏度和在合适的鉴定范围内以使得能定量或定性测定Et。

在上述方法(3)、(4)、(5)、(6)和(7)中用来溶解冻干制品的溶液是合适的缓冲液，该缓冲液能稳定地保持与C因子系统反应有关的溶解物试剂中的组分和保持因子C与内毒素反应的最佳pH范围(pH7.0到8.5)。溶液的例子包括水和能保持上述pH范围的缓冲溶液，该缓冲溶液中含有缓冲剂例如三(羟甲基)氨基甲烷、三(羟甲基)氨基甲烷马来酸(盐)、1,4-哌嗪二乙烷磺酸盐、吗啉代丙烷磺酸盐、N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙烷磺酸盐、三乙醇胺、咪唑和三(羟甲基)咪唑。上述方法(3)和(6)中使用的含烷基葡糖苷的溶液用将所需量的烷基葡糖苷加入到上述溶液中的方法制备。

为了用本发明的鉴定试剂鉴定Et，由附图1所示的串联反应形成的凝固酶的活性可用已知方法测定。

为了测定凝固酶的酰胺酶活性，上述提及的具有生色残基的合成肽底物或者那些具有类似氨基酸序列但C-末端氨基酸的羧基不是被上面提及的生色残基取代而是被已知的荧光残基、发光残基或铵经酰胺键取代的底物可用作底物。酰胺酶活性可由测定经

凝固酶作用在合成底物上形成的反应产物来测定。如下面更详细的叙述，将上述提及的合成肽底物加入到含有本发明的鉴定试剂和Et的反应系统中，反应(串联反应随后，如果需要，将形成的产物转化成例如其它有色物质)形成的有色物质、荧光物质、发光物质或氨用例如分光光度计、荧光光度计、化学发光仪或氨检测电极测定(参考JP-A-62-148860)。

为了测定凝固酶的蛋白酶活性，可用合适的仪器(例如，浊度计或粘度计)或肉眼判断来测定胶凝作用，即经凝固酶作用于在本发明的鉴定试剂中含有的或分别加入的凝集原(底物)引起的凝固素胶的形成作用。

就本发明的实施来说，上述提及串联反应能被二价金属盐更有效地激活。这种二价金属盐的例子包括碱土金属如镁、钙和锶的氢卤酸盐(如氯化物等)或硫酸盐。

上面提及的金属盐可在反应步骤中分别加入到本发明的试剂中。然而，通常优选地是将上面提及的二价金属盐加到溶解物试剂中，该溶解物试剂接着经不用加热的干燥处理(如，冷干)来固化。用于测定上述提及的酰胺酶活性的试剂优选地不仅含有二价金属盐，而且含有上面提及的合成肽底物。这一试剂可经干燥处理。二价金属盐和合成肽底物在反应混合物中的用量分别为0.1到200m M和0.1到2m M。

按照本发明的内毒素鉴定可以用含有上述描述的试剂的试剂盒容易地和快速地进行。本发明的试剂盒含有溶解物试剂和含烷基葡糖苷的试剂。含有烷基葡糖苷的试剂不仅可进一步含有水而且可进一步含有以上描述的缓冲剂。所述试剂盒特定的例子包括：

(1) 冻干的溶解物试剂和用于溶解该溶解物试剂的溶液；(2) 冻干的烷基葡糖苷和用于溶解该烷基葡糖苷的溶液；(3) 冻干的标准内毒素和用于溶解该内毒素的溶液；(4) 用于合成有色底物方法中的试剂，包括作空白试验的蒸馏水。

按照本发明的用于进行Et鉴定的样品基本上没有限制，只要其需要鉴定其中含有的Et或者需要检测其中Et的存在。样品的例子包括用于医学领域的生物样品、药物和水。

按照本发明的G因子激活作用抑制剂组合物含有作为能抑制由(1→3)- β -D-葡聚糖引起的鲎变形细胞中G因子活化作用的活性成分的烷基葡糖苷，和水或无Et的缓冲剂。

本发明具有经济上的优点，用于Et特异性鉴定的试剂可由简单地将溶解物试剂与烷基葡糖苷组合容易地制得。此外，本发明在检测怀疑为传染性疾病或脓毒症的临床样品和并不完全已知的Et的出现上非常有用。因而，本发明具有能准确诊断由革兰氏阴性菌引起的传染性疾病(内毒素血症)的优点。

为了进一步更详细地说明本发明，给出下列实施例，但不能理解为限制本发明。

实施例1

将n-辛基- β -D-葡糖苷(吡喃型葡糖苷)加入到溶解物试剂中

1) 将1.0升 *T. tridentatus* 血液(hemolymph)一份在4 °C, 1,500rpm下离心10分钟，向约21g所得沉淀(变形细胞)中加入 210ml 的0.02M Tris-HCl缓冲溶液(pH8.0)。混合物用均化器(Polytron

R PT10[®], Kinematica 制造产品的商品名)均匀磨碎, 抽提并在冷却, 10,000XG下离心30分钟, 由此获得190ml上清液(溶解物试剂)。

向0.04ml这一溶解物试剂中加入分别含有0.1到1.6mg 的非离子表面活性剂n-辛基- β -D-葡萄糖苷和0.02ml 4.0mM Boc-Leu-Gly-Arg-pNA的0.04ml的0.5M Tris-HCl/0.4M硫酸镁缓冲溶液(pH8.0)。这样获得了含有溶解物试剂的n-辛基- β -D-葡萄糖苷(本发明产物)。

向0.04ml的另一溶解物试剂中加入不含n-辛基- β -D-葡萄糖苷但含有0.02ml的4.0mM Boc-Leu-Gly-Arg-pNA的0.04ml的0.5M Tris-HCl/0.4M硫酸镁缓冲溶液(pH8.0)。每份0.1ml蒸馏水(此后简称作DW用作空白)和用以下方法制得的 β -葡聚糖(500ng/ml)分别加入到这些溶解物试剂中作为样品。如此获得的每一混合物在37°C下培养30分钟。然后, 如此获得的对硝基苯胺用连续加入每份0.5ml的0.04%硝酸钠(0.48M盐酸溶液)、0.3%氨基磺酸铵和0.07%N-1-萘基乙二胺二氢氯化物的方法进行重氮偶合。在545nm测定混合物的吸光度, 样品的吸光度与空白的差值以反应活性示于表1中(在以下的实施例和表中, Δ 意指样品的吸光度与空白的差值)。

表 1

n-辛基-β-D-葡萄糖苷 (mg)	反应活性(ΔA545nm/30分钟)
0	>1.5
0.1	0.503
0.2	0.148
0.4	0.000
0.8	0.000
1.6	0.000

如表1所清楚显示的, 通过向0.04ml溶解物试剂中加入0.4mg或更多的n-辛基-β-D-葡萄糖苷可完全抑制由β-葡聚糖引起的溶解物试剂中的G因子激活作用。

2) 向0.04ml溶解物试剂中加入分别含有0.4到1.6mg的n-辛基-β-D-葡萄糖苷(如上述1)所表明的其能完全抑制由β-葡聚糖引起的溶解物试剂中的G因子系统反应)和0.02ml 4.0m M的Boc-Leu-Gly-Arg-pNA的0.04ml 0.5M Tris-Hcl/0.4M硫酸镁缓冲溶液(pH8.0), 由此获得含有n-辛基-β-D-葡萄糖苷的溶解物试剂。向另一0.04ml的溶解物试剂中加入不含有n-辛基-β-D-葡萄糖苷但含有0.02ml

4.0mM Bec-Leu-Gly-Ary-pNA的0.04ml 0.5M Tris-HCl/0.4M 硫酸镁缓冲溶液(pH8.0)。每份0.1ml DW(空白), 来源于大肠杆菌0111:B₄株(Westphal 型, 从Sigma购得, 6.25, 12.5, 25.0, 50.0 pg/ml)的Et分别加入到这些溶解物试剂中作为样品。然后这些混合物以与1)相同的方式培养从而制备Et校准曲线。附图2 显示了其结果。如附图2清楚所示的, 对Et的反应性随加入的n-辛基-β-D-葡糖苷(附图2中称作O.G.)量的增加而降低。基于这些校准曲线, 能给出溶解物试剂中C因子系统反应活性以达到相应于样品中Et浓度的灵敏度的n-辛基-β-D-葡糖苷的量可任意选择。

这些结果表明, 通过使用由加入n-辛基-β-D-葡糖苷到普通溶解物试剂中的方法制备的萤试验试剂, 样品中Et 可被特异性地鉴定而不受β-葡聚糖的影响。

制备β-葡聚糖的方法

按照PCT国际公开W090/02951所描述的方法, 将1g curdlan (从Wako Pure Chemical Industries Ltd. 可购得) 悬浮在约100ml 5mM的NaOH水溶液中, 然后在冰冷条件下, 20KHz和80W下用声处理器(Ohtake Seisaku-sho, Model 5202 PZT, Tokyo) 声处理12分钟的办法降解。如此处理过的溶液用5M NaOH水溶液调制成0.3M水溶液, 然后该溶液用凝胶渗透层析(GPC 柱: 两根 TSK 凝胶G3000PW_{XL}柱和一根G2500PW_{XL}柱, 流动相: 0.3M NaOH水溶液, 流速0.5ml/min) 分级分馏。经重复层析收集相应于分子量为 216, 000的级份从而获得GPC级份的纯化制品(β-葡聚糖制品)。

用于下面实施例的β-葡聚糖是用与以上描述的相同的方法制备的。

实施例2

在鲎变形细胞抽提过程中加入n-辛基- β -D-葡萄糖苷(吡喃葡萄糖苷)。

将1.01 T. tridentatus 血液一份在4°C, 1,500rpm下离心 10分钟。向约21g如此形成的沉淀(变形细胞)中加入210ml含有 2.0g n-辛基- β -D-葡萄糖苷的0.02M Tris-Hcl缓冲溶液(pH8.0), 然后, 混合物用Polytron R PT10^R均匀磨碎, 抽提, 并在冷却、10,000XG下离心30分钟, 由此获得190ml上清液(含有n-辛基- β -D-葡萄糖苷的溶解物试剂)。

向0.04ml一份的这一含有n-辛基- β -D葡萄糖苷的溶解物试剂(发明实施例)和另一用在以上提到的步骤中不加入n-辛基- β -D-葡萄糖苷的方法制备的另一溶解物试剂(对照实施例)中加入0.01ml 2M Tris-Hcl缓冲液(pH8.0), 0.03ml 0.4M氯化镁和0.02ml 的3.0mM Boc-Leu-Gly-Arg-pNA。另外, 0.1ml一份的DW(空白)、Et和 β -葡聚糖分别加入其中作为样品。此外, 0.05ml 一份的浓度各是上述2倍的Et和 β -葡聚糖同时加入到另一样品中。这些混合物在37°C下反应30分钟。在用0.4ml的0.8M乙酸终止反应后, 在405nm下测定每一反应混合物的吸光度, 由此测定如此形成的对硝基苯胺的量。这样, 比较反应活性。表2示出了结果。如表2所示, 使用由在从鲎血液抽提溶解物试剂过程中加入n-辛基- β -D-葡萄糖苷的方法制备的含n-辛基- β -D-葡萄糖苷的溶解物试剂, Et 可被特异性鉴定而不受 β -葡聚糖影响。换句话说, 已经证明, 在本发明的鉴定中, G因子系统反应基本上被抑制, 但C 因子系统反应不受抑制。

表 2

样品	反应活性(ΔA 405 nm/30分钟)	
	发 明	对 照
Et*	0.319	0.351
β -葡聚糖**	0.000	0.191
Et + β -葡聚糖	0.319	0.541

* Et浓度: 3.0pg/0.1ml样品

** β -葡聚糖浓度: 5.0pg/0.1ml样品

实施例3

在溶解冻干溶解物试剂步骤中加入n-辛基- β -D-硫代葡糖苷(吡喃型硫代葡糖苷)

将一小瓶“Pyrotel”(一种从L. Polyphemus中抽提的方法制备的冻干溶解物试剂, 一种用于凝胶化方法的萤试验试剂, 由CapeCod制造, 从Seikagaku Corporation 购得)溶解到5.0ml含有55mgn-辛基- β -D-硫代葡糖苷的水溶液中(发明实施例)。分别地, 另一小瓶冻干产品溶解到0.5ml不含n-辛基- β -D-硫代葡糖苷的DW中(对照实施例)。将这些溶解物试剂中每一种的一份0.1ml 吸移

到反应管中，接着，DW(空白)、Et和 β -葡聚糖各0.1ml分别加入其中作为样品，另外，其浓度均为上述两倍的Et和 β -葡聚糖各0.05ml同时加入到另一样品中。轻轻混合后，每一反应混合物置入分析舱中在37°C下使用时间-浊度计“Toxinometer ET-201”（从Wako Pure Chemical Industries, Ltd. 购买）的排斥用途检测60分钟，记录凝胶化时间(Tg)以测定本发明的鉴定试剂的反应活性。表3示出了结果。这些结果说明，经在加入样品之前，向商业上购得的冻干溶解物试剂(用于凝胶化方法的鲎试验试剂)中加入n-辛基- β -D-硫代葡糖苷，Et能被特异性鉴定而不受 β -葡聚糖的影响。

表 3

样 品	反应活性(Tg; 分钟)	
	发 明	对 照
DW(空白)	> 60	> 60
Et*	33.2	29.2
β -葡聚糖**	> 60	31.8
Et + β -葡聚糖	33.0	18.8

*Et浓度: 2.0Pg/0.1ml样品

** β -葡聚糖浓度: 40.0pg/0.1ml样品

实施例4

在溶解溶解物试剂和合成底物的冻干制品的步骤中加入n-癸基- β -D-葡萄糖苷(吡喃型葡萄糖苷)

将一小瓶“Toxicolor System LS- 200 set”(一种从 T. tridentatus 抽提和制备的溶解物试剂, 与例如, Boc-Leu-Gly-Arg-pNA的冻干制品, 用于生色合成底物方法的萤试验试剂, 从 Seikagaku Corporation 购得)溶解在2.8ml含有28mg n-癸基- β -D-葡萄糖苷的0.2M Tris-HCl缓冲溶解(pH8.0)中以给出本发明的鉴定试剂。 分别地, 另一小瓶冷干制品溶解在2.8ml不含n-癸基- β -D-葡萄糖苷的0.2M Tris-HCl缓冲溶液(pH8.0)中得到对照试剂。 向0.1ml一份的这些溶解物试剂中分别加入0.1ml一份的DW(空白), Et和 β -葡聚糖作为样品。 另外, 0.05ml一份的浓度各为上述2倍的Et和 β -葡聚糖同时加入, 作为另一样品。 这些混合物以与实施例1-1)相同的方式反应, 从而测定本发明的鉴定试剂的反应活性。 表4示出结果。

表 4

样 品	反应活性(ΔA 545 nm/30分钟)	
	发 明	对 照
Et*	0.847	0.882
β -葡聚糖**	0.000	> 1.5
Et + β -葡聚糖	0.847	> 1.5

* Et浓度: 5.0pg/0.1ml样品

** β -葡聚糖浓度: 50.0ng/0.1ml样品

这些结果表明, 通过将n-癸基- β -D-葡糖苷加入到商业上购得的用于生色合成底物方法的萤试验试剂的冻干制剂中, Et 能特异性地被鉴别而不受 β -葡聚糖的影响。

实施例5

在抽提过程中将n-辛基- β -D-葡糖苷加入到萤变形细胞中所制备的冻干溶解物试剂的应用。

类似上述实施例2, 2.0ml含有n-辛基- β -D-葡糖苷溶解物试剂(已由在抽提过程中加入n-辛基- β -D-葡糖苷制备)和0.4ml 0.4M氯化镁混合在一起并冻干, 以给出按照本发明的用于Et 特异性鉴

别的试剂。类似地，2.0ml不含有n-辛基-β-D-葡萄糖苷的溶解物试剂(已用与实施例1-1)相同的方法制备)和0.4ml0.4M氯化镁混合在一起并冻干，从而得到对照鉴别试剂。这些冻干产物的每一种均溶解在2.0mlDW中。向0.1ml形成的溶液中分别加入0.1ml一份的DW(空白)、0.1mlEt和β-葡聚糖作为样品，轻轻混合后，使每一反应混合物在37°C下静置60分钟。然后来回翻转，用肉眼判断凝胶的形成，由此测定本发明的鉴别试剂的反应活性。表5示出了结果，其中“+”意指形成凝胶，而“-”意指未形成凝胶。

表 5

样 品	反应活性	
	发 明	对 照
DW(空白)	-	-
Et*	+	+
β-葡聚糖**	-	+

*Et浓度：4.0pg/0.1ml样品

**β-葡聚糖浓度：40.0ng/0.1ml样品

这些结果表明, 通过冻干含n-辛基- β -D-葡萄糖苷的溶解物试剂(已由在抽提过程中加入n-辛基- β -D-葡萄糖苷制备), Et 可被特异性鉴别而不受 β -葡聚糖影响。

实施例6

使用由将溶解物试剂、合成底物和n-辛基- β -D-葡萄糖苷混合, 接着冻干的方法制备的用于Et特异性鉴别的试剂。

将2.0ml在上述实施例1-1)中获得的不含n-辛基- β -D-葡萄糖苷的溶解物试剂, 0.9ml 3.4mM 的有色合成底物(Boc-Leu-Gly-Arg-pNA)。1.0ml 0.8M硫酸镁和0.5ml含25mg n-辛基- β -D 葡萄糖苷的水溶液混合后, 将混合物冻干, 以得到本发明的用于Et 特异性鉴别的试剂。再一次重复上面所述的步骤, 只是用0.5ml DW代替n-辛基- β -D-葡萄糖苷的水溶液, 从而得到对照鉴别试剂。这些冻干产物的每一种都溶解在5.0ml 0.2M Tris-HCl 缓冲溶液(pH8.0)中。向0.1ml一份的这些溶液中分别加入0.1ml一份的DW(空白)、Et和 β -葡聚糖作为样品, 此外0.05ml 一份的浓度各为上述浓度2倍的Et和 β -葡聚糖同时加入其作为另一份样品, 这些混合物以与实施例1-1)相同的方式反应, 以测定本发明的鉴别试剂的反应活性。

表6示出了结果。

表 6

样 品	反应活性($\Delta A_{545nm}/30$ 分钟)	
	发 明	对 照
Et*	0.663	0.702
β -葡聚糖**	0.000	> 1.5
Et + β -葡聚糖	0.663	> 1.5

* Et浓度: 4.0pg/0.1ml样品

** β -葡聚糖浓度: 40.0ng/0.1ml样品

这些结果表明, 通过将溶解物试剂, 合成底物和n-辛基- β -D-葡糖苷混合, 接着冻干, Et能被特异性鉴别而不受 β -葡聚糖的影响。

实施例7

在鉴别前将n-辛基- β -D-葡糖苷加入到样品中

作为样品, 制备DW(空白), Et和 β -葡聚糖各0.05ml一份和等体积的Et与 β -葡聚糖(各自浓度为以上浓度的2倍)混合物。向这些样品的每一个中加入0.05ml含1.2mg n-辛基- β -D-葡糖苷的水

溶液。在接着加入0.1ml的溶解在2.8ml 0.2 M Tris-HCl缓冲液 (pH8.0) 中的“Toxicolor System LS-200 Set”后, 所得混合物以与上述实施例1-1) 相同的方式反应。再次重复上述操作, 只是以DW代替n-辛基-β-D-葡萄糖苷水溶液, 以比较反应活性。表7 示出了结果。

表 7

样 品	反应活性 (ΔA 545nm/30分钟)	
	发 明	对 照
Et*	0.874	0.902
β-葡聚糖**	0.000	> 1.5
Et + β-葡聚糖	0.875	> 1.5

* Et浓度: 5.0pg/0.05ml 样品

** β-葡聚糖浓度: 30.0ng/0.05ml 样品

这些结果表明, 通过在鉴别前将n-辛基-β-D-葡萄糖苷加入到样品中, Et可被特异性鉴别而不受β-葡聚糖影响。

实施例8

样品加入到溶解物试剂后紧接着加入n-辛基-β-葡萄糖苷

一小瓶“Pyrotel”溶解在5.0ml DW中，在冰冷条件下将这样获得的溶液的0.1ml吸移到试管中。然后，各0.05ml一份的DW(空白)、Et和 β -葡聚糖分别加入其中作为样品，此后立即向每一支试管中加入0.05ml含有1.3mg n-辛基- β -D-葡糖苷的水溶液。轻轻混合并使其在37°C静置60分钟后，用与实施例5相同的方式判断凝胶的形成。再次重复上述步骤，只是以相同量的DW代替n-辛基- β -D-葡糖苷水溶液，以便由此比较反应活性。表8示出了结果。

表 8

样 品	反应活性	
	发 明	对 照
DW	-	-
Et*	+	+
β -葡聚糖**	-	+

* Et浓度：2.0pg/0.05ml样品

** β -葡聚糖浓度：20.0ng/0.05ml样品

这些结果表明，通过在将样品加入到溶解物试剂中后立即向其中加入n-辛基- β -D-葡糖苷，Et能被特异性鉴定而不受 β -葡聚糖影响。

→ 实施例9

从怀疑有脓毒症并发症的病人收集到的富血小板血浆按US 专利4, 495, 294描述的方法用高氯酸处理, 并中和以作为样品。按照本发明用与实施例2相同的方法鉴别其0.1ml一份中的Et。另外, 样品也按常规方法培养以检测微生物感染。结果证实, 大肠杆菌菌落的数目与定量测得的Et的反应活性相一致。

按照实施例3到8的方法重复这一试验。结果是, 本发明的试剂和方法的作用被证实。

对照实施例

向0.04ml实施例1-1)中获得的溶解物试剂中加入含有0.5mg n-辛基- β -D-葡萄糖苷或表9列举的非离子表面活性剂的0.04ml的0.5M Tris-HCl-0.4M硫酸镁缓冲液(pH8.0)和0.02ml 4.0mM Boc-Leu-Gly-Arg-pNA。分别地, 将0.04ml 不含有非离子表面活性剂的0.5M Tris-HCl-0.4M硫酸镁缓冲液(pH8.0)和0.02mM 4.0mM Boc-Leu-Gly-Arg-pNA加入到0.04ml溶解物试剂中(对照试剂)。将各0.1ml一份的DW(空白)、大肠杆菌0111: B₄株来源的Et (25pg/ml)或 β -葡聚糖(50pg/ml)分别加入到按上述方法制备的试剂和对照试剂中作为样品, 在反应按实施例1-1)的相同方式进行后, 在545nm测定吸光度, 样品吸光度与空白值的差值表示为反应活性。含表面活性剂的试剂对Et或 β -葡聚糖的反应活性以与对照反应活性的相对活性被测定。结果示于表9中。

表 9
相对活性 (Z)

样 品	对 照	n-辛基-β-D- 葡糖苷	吐温-80	吐温-20	span-20	Briji-92	Triton X-100
Et	100	100.0	15.5	13.2	11.9	10.1	2.2
β-葡聚糖	100	0	11.2	12.0	23.4	12.4	34.2

注：n-辛基-β-D-葡糖苷可从Dojin kagaku kenkyusho获得；
吐温-80(商品名)可从Sigma Chemical Co. 获得；
吐温-20(商品名)可从Wako pure Chemical Industry. Co.,
Ltd. 获得；
Span-20(商品名)可从Sigma Chemical Co. 获得；
Briji-92(商品名)可从Sigma Chemical Co. 获得；
Triton x-100(商品名)可从Aldrich Chemical Company, Inc.
获得)。

如表9所示，与非离子表面活性剂比较，使用含有n-辛基-β-D-葡糖苷的试剂，Et能被特异性鉴别。

在本发明经详细地和以其特定的实施例描述后，很明显，本专业技术人员在不背离本发明的精神和范围的情况下可从中进行各种变化和修改。

序 列 表

(1) 一般信息

(i) 申请人: TAMURA, HIROSHI

ODA, TOSHIO

TANAKA, SHIGENORI

(ii) 发明名称: 用于内毒素特异性鉴别的试剂

(iii) 序列数: 3

(iv) 通讯地址:

(A) 收件人: SUGHRUE, MION, ZINN, MACPEAK & SEAS

(B) 街: 2100 Pennsylvania Ave.

(C) 城市: Washing ton

(D) 州: DC

(E) 国家: USA

(F) 邮区号码: 20037

(v) 计算机可读形式:

(A) 软盘类型: Floppy disk

(B) 计算机: IBM PC兼容制

(C) 操作系统: PC-DOS/MS-DOS

(D) 软件: Patent In Release # 1.0 Version # 1.25

(vi) 现在申请的资料:

(A) 申请号:

(B) 申请日:

(C) 分类号:

(vii) 原来申请的资料:

(A) 申请号: JP-5265479

(B) 申请日: 1993年9月30日

(ix) 通讯信息:

(A) 电话: (202) 293-7060

(B) 传真: (202) 293-7860

(C) 电传: 6491103

(2) SEQ ID NO: 1 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 4个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 几何结构: 线型

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ NO: 1:

Val Leu Gly Arg

1

(2) SEQ ID NO: 2 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 4个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 几何结构: 线型

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 2:

Ile Glu Gly Arg

1

(2) SEQ ID NO: 3信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 4个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 几何结构: 线型

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 3:

Val Ser Gly Arg

1

说 明 书 附 图

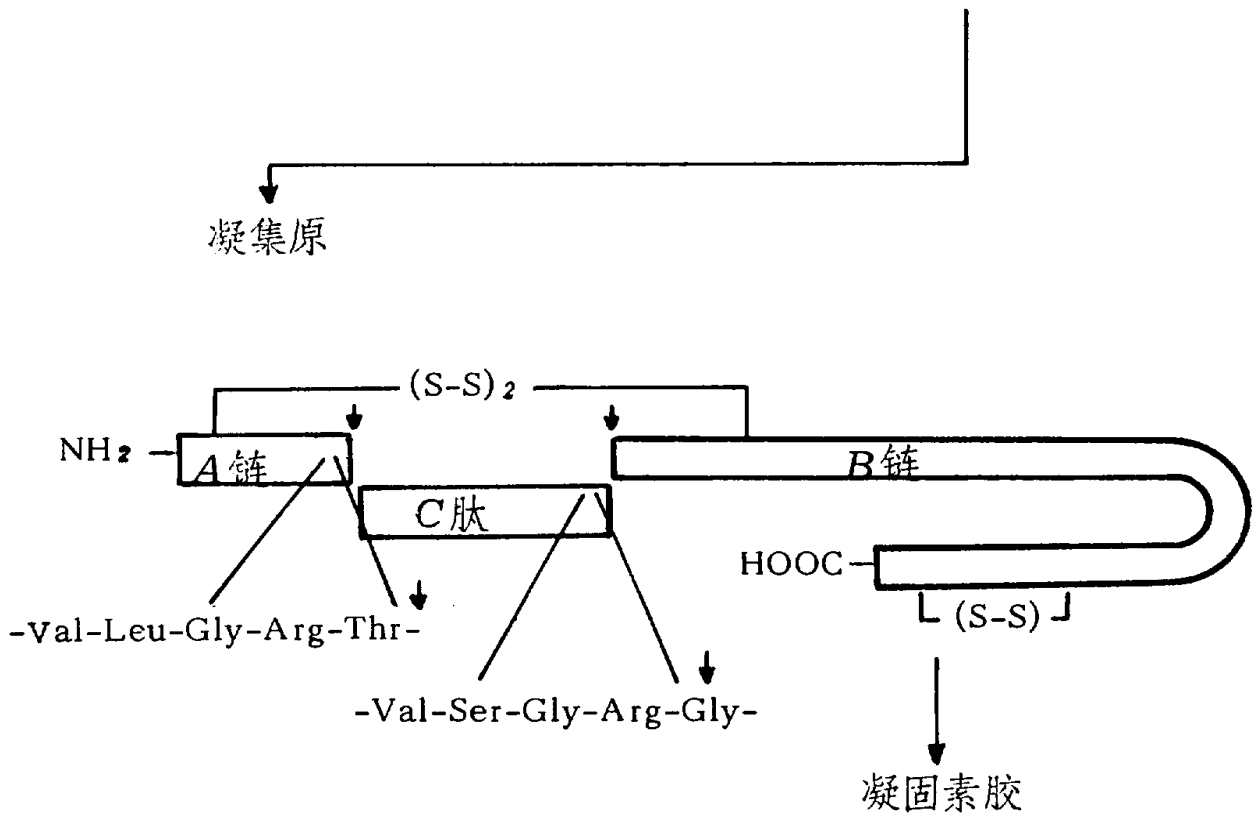
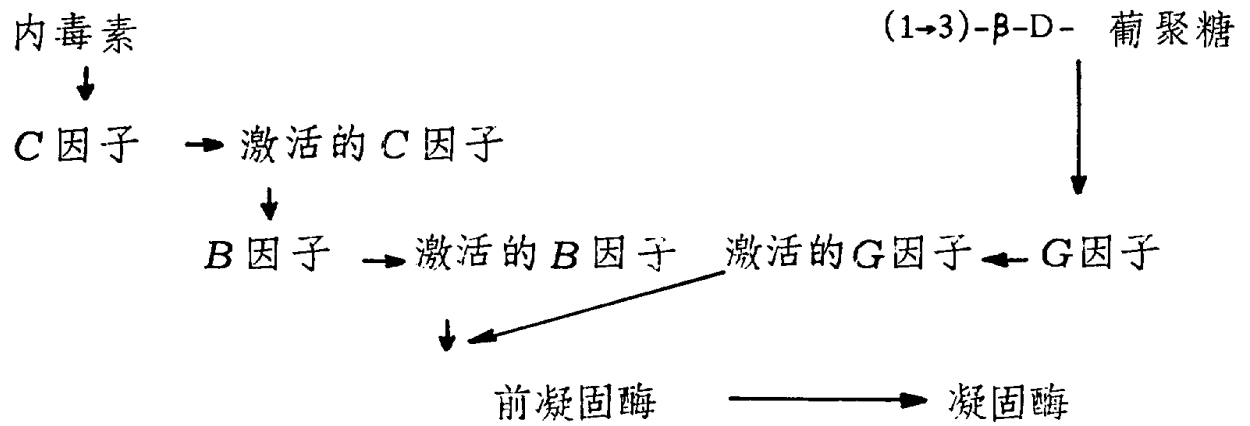


图 1

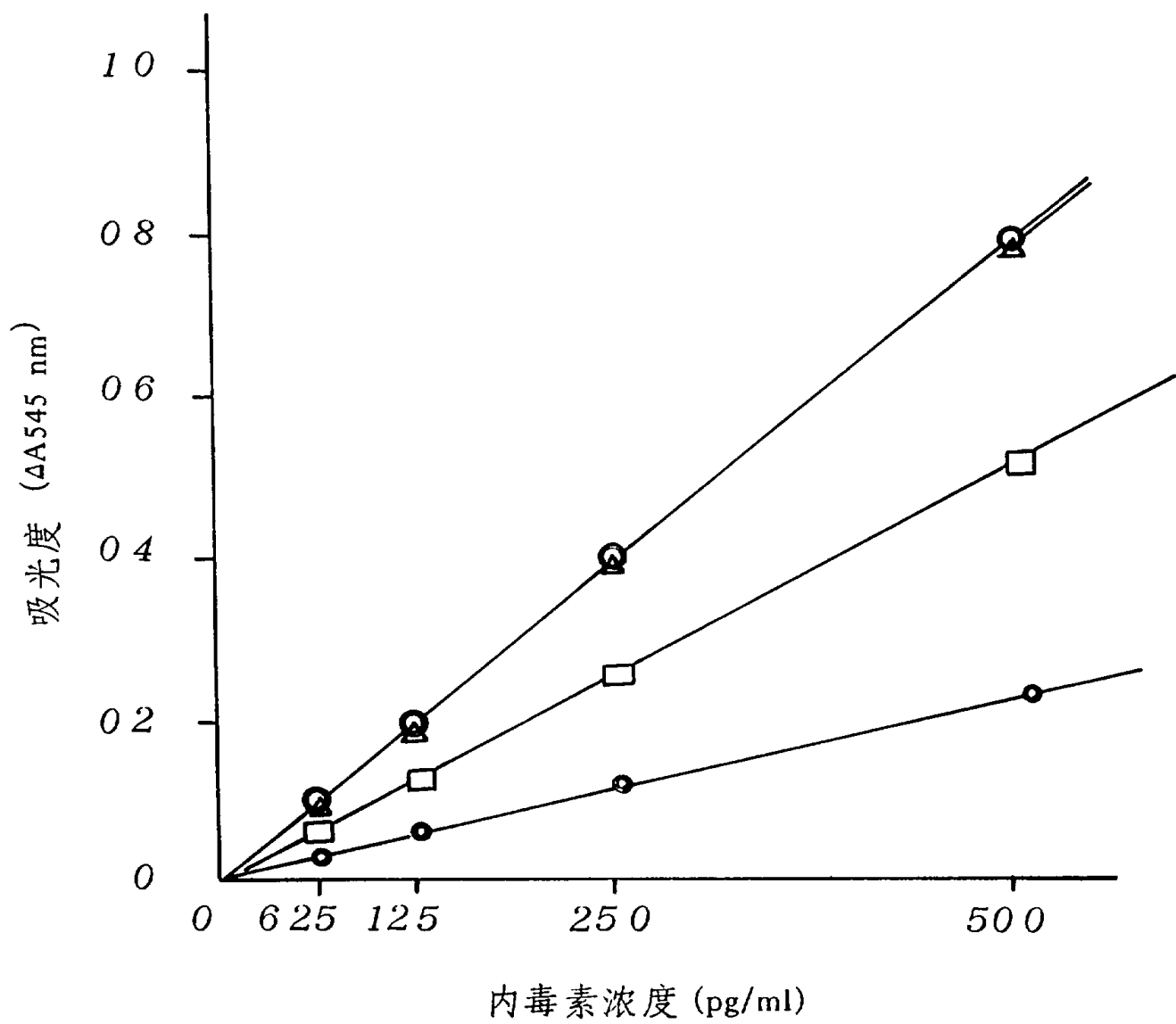


图 2