

海藻糖对医用诊断工具酶活性保护作用研究

黄成垠 安国瑞 王庆敏 戴秀玉 周 坚

(河北省沧州市中心医院检验科 沧州 061001) (中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘要 研究了干燥条件下海藻糖对胆固醇氧化酶、胆固醇脂酶和过氧化物酶的活性保护作用,并对影响酶活性保存的其它因素进行了试验。加海藻糖干燥的以上三种诊断酶分别在 70, 55 和 37℃ 温度下放置 40d, 150d 和 210d 后再次测定酶活,结果表明这三种酶的活性均保持在 90% 以上,而未加海藻糖保护的对照,活性降至 20% 以下。除海藻糖浓度外,缓冲系统中的介质、离子强度、pH 是影响酶活的关键因素。

关键词 海藻糖保护,胆固醇氧化酶,胆固醇脂酶,过氧化物酶

海藻糖 (Trehalose, $C_{12}H_{22}O_{11}$) 是由两分子葡萄糖以 $\alpha, \alpha 1 \rightarrow 1$ 键接的非还原性双糖。研究表明,生物体能在酷热、干旱、高渗和重金属离子等不良环境中生存与体内合成高浓度海藻糖密切相关^[1,2]。新近研究证明外加的海藻糖也能对生命活性物质的保存起重要作用^[3]。其保护机制一般认为是在蛋白质、核酸等生命物质干燥时,海藻糖生成类似于维持生命所必须的水结构,代替水分子而发挥作用^[4]。海藻糖这一独特的性质可望用于干燥冷冻食品、药品、酶的稳定剂、化妆品的保湿剂等多种用途。

酶试剂的使用大大简化了对疾病诊断的手续,但由于诊断工具酶极易降解失活,这不仅贻误对患者疾病的诊断而且带来很大的经济损失。本研究为解决这一矛盾,试验了海藻糖对测定血清胆固醇的三种诊断工具酶在高温干燥条件下的保活作用,对用于保护的缓冲系统,包括海藻糖浓度、缓冲介质、离子强度、pH 等因素进行了摸索和研究。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器

海藻糖由中国科学院微生物研究所制备;胆固醇氧化酶、胆固醇脂酶、胆固醇油酸脂酶购自 Sigma 公司;辣根过氧化物酶,上海丽珠东风生化技术公司产品;胆固醇购自上海生化试剂公司;三羟甲基氨基甲烷 (Tris),北京化学试剂公

司进口分装;其它试剂均为国产分析纯。Vitalab Macro 型生化分析仪,Merck 公司制造。

1.2 酶样的制备和处理

在含 0.25mol/L 海藻糖和不含海藻糖的 3ml pH7.0 的 0.15mol/L Tris - HCl 缓冲液中分别加入胆固醇氧化酶 80u,胆固醇脂酶 160u,辣根过氧化物酶 250u,混匀,各取 300 μ l 分装于棕色实验小瓶,进行室温自然干燥处理。干燥的样品密封后分别置于 37, 55 和 70℃ 三种不同温度,保存一定天数后,以 300 μ l 蒸馏水复溶样品,测定酶活。

1.3 酶活测定

1.3.1 胆固醇氧化酶 (CHOD)、胆固醇脂酶 (CHE) 酶活测定:改良的 Richmand 氏法^[5]。

1.3.2 辣根过氧化物酶 (POD) 酶活测定:按 Worth'ngton 氏法^[6],经改进后适于仪器的自动分析,具体操作:取 1.4ml 4-氨基安替比林-苯酚溶液于 1.5ml H_2O_2 溶液混合后加 0.1ml 待测酶液 (酶液稀释 50 倍),立即混匀后,在 Vitalab Macro 型生化分析仪上进行测定。分析参数:延滞时间 120s,测定时间 150s,吸入酶量 800 μ l,非线性 (NL) 设置 5%,反应温度 37℃,波长 510nm, F 值 4559,酶活力单位以 u/L 表示。

1.4 酶活保持率计算

河北省科委资助项目

1996-11-12 收稿

加或不加海藻糖处理后测定的酶活单位
新鲜制备酶液测定的酶活单位 $\times 100\%$

2 结果和讨论

2.1 海藻糖对酶在干贮中酶活的稳定作用

将 CHOD, CHE 和 POD 三种诊断工具酶, 在加有海藻糖和不加海藻糖的 Tris - HCl 缓冲液中干燥, 分别置 70、55 和 37℃ 存放 40d、150d 和 210d 后, 测定这三种酶的酶活。由表 1 可见, 加海藻糖保护的酶样在 37℃ 存放 210d、55℃ 存放 150d、70℃ 高温存放 40d 后其活性仍可保持在 90% 以上; 未加海藻糖的酶样, 其活性保持率均在 20% 以下。加海藻糖保护的酶活是未加保护的 4.5 倍, 三种诊断工具酶之间无明显区别。说明海藻糖对干燥过程中酶活保护作用明显且适用于多种诊断工具酶。

表1 3种酶在海藻糖溶液中干燥后的稳定性

温度 (℃)	时间 (d)	酶活性保存率(%)					
		海藻糖干燥酶样			未加海藻糖干燥酶样		
		CHOD	CEH	POD	CHOD	CEH	POD
70	40	94.7	91.0	100	8.4	10.9	16.4
55	150	93.4	92.6	98.8	10.1	13.9	20.0
37	210	92.5	94.8	96.2	8.9	13.5	18.0

2.2 缓冲介质对酶干燥稳定性的影响

对常用的 6 种缓冲液系统, 包括 NaH_2PO_4 - NaOH 缓冲液、 Na_2HPO_4 - KH_2PO_4 缓冲液、磷酸盐缓冲生理盐水 (PBS)、Tris - HCl 缓冲液、咪唑 - HCl 缓冲液和 Na_2HPO_4 - 柠檬酸缓冲液等进行了试验和比较。将三种酶分别加入含一定量海藻糖的这 6 种缓冲液, 干燥处理, 复溶后测定酶活。

从表 2 可以看出 Tris - HCl 缓冲液对 CHOD 和 CEH 保护效果最好, 而 Na_2HPO_4 - 柠檬酸缓冲液则对 POD 酶活保护效果最好。

2.3 pH 对酶干燥稳定性的影响

以不同 pH 值 0.20mol/L 的海藻糖 Tris - HCl 缓冲液制备混合酶液, 室温干燥后复溶, 测定酶活, 结果见图 1。CHOD 酶和 CHE 酶在 pH7.0 缓冲液中活性保持率最高, 而 POD 酶则适合在 pH6.8 缓冲液中保存, pH7.0 时略低。从图

表2 3种酶在含海藻糖的缓冲介质中干燥-复溶后的活性

缓冲介质	活性保持率(%)		
	CEH	CHOD	POD
Na_2HPO_4 - KH_2PO_4	27.9	75.0	41.1
NaH_2PO_4 - NaOH	30.1	97.8	60.4
PBS	62.2	100.0	79.1
咪唑 - HCl	98.7	59.5	61.0
Na_2HPO_4 - 柠檬酸	86.1	56.5	100.0
Tris - HCl	100.0	100.0	51.0

可见三种酶在 pH7.0 和 pH7.6 的酶活可相差 50% 以上, 缓冲液的 pH 值对酶干燥稳定性影响很大。

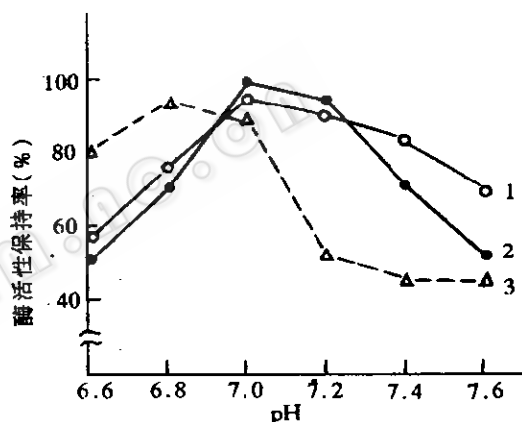


图1 pH对酶干燥稳定性的影响

1. CHOD, 2. CHE, 3. POD

2.4 离子强度对酶干燥稳定性的影响

配制系列不同摩尔 pH7.0 的海藻糖 Tris - HCl 缓冲液制备混合酶液, 干燥处理后复溶, 测酶活, 低离子强度对 POD 酶影响最大, 0.15mol/L 为该酶的最适离子强度, 0.20mol/L 时酶活略有下降; 而 CHOD 酶和 CHE 酶在 0.20mol/L 离子强度缓冲液中表现最高活性 (图2)。

2.5 海藻糖浓度对酶干燥稳定性的影响

在上述缓冲液中加入不同量的海藻糖, 干燥处理后复溶, 测定酶活。结果表明海藻糖浓度为 0.30mol/L 时对胆固醇酯酶有抑制作用, 抑制率为 20.6%, 但对胆固醇氧化酶和过氧化物酶无影响。海藻糖浓度为 0.15~0.25mol/L 时, 三种酶

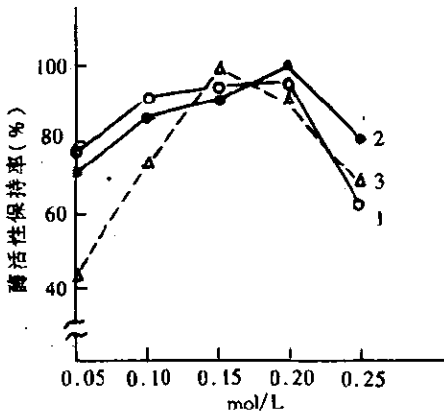


图2 离子强度对酶干燥稳定性的影响

1. CHOD, 2. CHE, 3. POD

表3 不同浓度海藻糖中干燥复溶后酶活保持率

海藻糖浓度 mol/L	酶活保持率 (%)		
	CHOD	CHE	POD
0.10	100	93.1	94.5
0.15	100	100	100
0.20	100	100	100
0.25	100	79.4	100

的活性保持率均达到100%;海藻糖为0.10mol / L

时,胆固醇酯酶、胆固醇氧化酶和过氧化物酶的活性保持率分别为93.1%、100%和94.5%(表3)。

通过上述研究,确定了保存酶活的最佳条件。不同环境因素对不同酶活保持影响较大,海藻糖在干燥条件下对酶活稳定作用明显。目前我国医用生物制剂多采用真空冷冻干燥和在低温下保存,给患者的疾病诊治带来许多不便。利用海藻糖作为诊断酶稳定剂,可置常温干燥并贮存,这不仅能简化酶试剂的制备工艺,而且给非城市地区患者的疾病诊治提供极大便利。

参 考 文 献

- [1] Thevelein J M. Microbiol Rev, 1984, 48:42~59.
- [2] 戴秀玉, 程 苹, 周 坚等. 微生物学通报, 1995, 22(2):102~103.
- [3] Colaco C, Sen S, Thangavelu M, et al. Bio / Technol, 1992, 10:1007~1011.
- [4] Roser B. J Biopharm, 1991, 5:44~53.
- [5] Lin W H. J Chinese Agr Chem Soc, 1980, 18(3):1~11.
- [6] 施特尔马赫 B. 编著, 钱 嘉译. 酶测定方法. 北京: 中国轻工业出版社, 1992, 201.

STUDY ON STABILITY OF DIAGNOSTIC TOOL ENZYMES UNDER TREHALOSE PROTECTION

Huang Chengyin An Guorui Wang Qingmin

(Laboratory of Medical Assay, Cangzhou Central Hospital, Cangzhou 061001)

Dai Xiuyu Zhou Jian

(Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract The heat stability of three tool enzymes dried in trehalose at room temperature was studied for the possibility of preperation extraordinary stable enzyme reagent kit for serum cholesterol analysis. The cholesterol oxidase, cholesterol esterase and peroxidase have been dried in trehalose containing buffer and stored at 37℃ for 210 days, 55℃ for 150 days, 70℃ for 40 days respectively. All of three enzymes activity recovered more than 90%. The trehalose protection is remarkably. In addition to concentration of trehalose, the buffer, ionic strength and pH are the main influence factors on stability of enzymes dried in trehalose.

Key words Trehalose protection, Cholesterol oxidase, Cholesterol esterase, Peroxidase