

测定游离胆固醇的“二酶试剂”质量问题的探讨

杭州药厂 诸 岭 严建伟

提 要 通过实验证实,由球孢子链霉菌(streptomyces globisporus)菌体中提取的胆固醇氧化酶制品中,含有少量的胆固醇酯酶。它的存在,不影响总胆固醇的测定。但对游离胆固醇的测定,会发生干扰。通过改进工艺,使除去胆固醇酯酶的胆固醇氧化酶,能成功地用于游离胆固醇,脂蛋白-x(Lp-x)及卵磷脂:胆固醇酰基转移酶(LCAT)的测定。

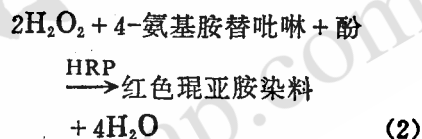
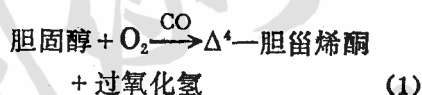
关键词: 胆固醇氧化酶 胆固醇酯酶 游离胆固醇

血清游离胆固醇(FC),脂蛋白-x(Lp-x),及卵磷脂:胆固醇酰基转移酶(LCAT)的测定,对临床的动脉硬化,胆道梗阻,肾病,糖尿病,原因不明的高脂血症及肝硬化,肝胆系统疾病的诊断有重要意义。

Lp-x及LCAT的测定值,都可通过酶法测定游离胆固醇的方法而获得^[1,2,3]。由于血清标本中成份复杂。因此,采用酶学方法测定,要求酶的纯度高,不含干扰测定的杂酶,才能保证测定结果的正确可靠。用老工艺从胆固醇氧化酶(CO)制备测定血清游离胆固醇的“二酶试剂”。发现在测定游离胆固醇时,显色不稳定。通过改进胆固醇氧化酶的纯化工艺,建立质量检测手段。所制备的“二酶试剂”达到了临床检验的要求。

原 理

胆固醇氧化酶能催化底物胆固醇发生氧化反应,生成 Δ^4 -胆甾烯酮。反应中消耗氧,同时产生过氧化氢。采用Trinder氏反应法^[4,5]在辣根过氧化物酶(HRP)的催化下与酚,4-氨基胺替吡啶反应,生成红色羧亚胺染料。在500 nm波长处测定其红色化合物的光密度,便可计算出游离胆固醇的含量。其反应式如下:



材料与方法

一、材料

1. “二酶试剂”的制备

(1) 胆固醇氧化酶供试品A的制备:

按上海医工院吴多汉等^[6]生产总胆固醇酶联试剂的方法,制备胆固醇氧化酶。

(2) 胆固醇氧化酶供试品B的制备:

按胆固醇氧化酶供试品A的方法提取胆固醇氧化酶。改进纯化工艺,制备胆固醇氧化酶供试品B。

(3) 辣根过氧化物酶的制备

按潘家秀的方法^[7]提取辣根过氧化物酶,经改进制得RZ值为2.5~3.0的辣根过氧化物酶冻干品。

(4) “二酶试剂”的制备

按酶活力计算,将胆固醇氧化酶和辣根过氧化物酶加入内含保护剂和曲拉通(Triton x-100)的0.1 mol/L, pH 6.7 磷酸缓冲

液中。安瓿封装。分别制备A，B两种“二酶试剂”供试品。

2. 酶反应基础试剂配制

胆酸钠	129 mg
4-氨基胺替吡啶	16 mg
苯酚	132 mg
聚乙二醇—6000	102 mg

以上试剂溶于0.1 mol/L, pH6.7磷酸缓冲液100 ml中。

3. 应用液的制备:

临使用时取30 ml基础试剂加1 ml“二酶试剂”混和即得。

二、方法

1. 线性范围与相关性的测定

精确称取分析纯胆固醇。用异丙醇配制成6 mg/ml, 并用异丙醇稀释成5, 4, 3, 2, 1, 0.5, 0.25 mg/ml。制备成胆固醇标准溶液。

分别用A, B两种“二酶试剂”制成的应用液各取3 ml加50 μl胆固醇标准液, 每种浓度各做三管, 于37℃水浴保温15分钟后, 于500 nm波长处比色。比较两种“二酶试剂”的测定结果。

2. 血清游离胆固醇测定

分别用A, B两种“二酶试剂”制成的应用液3 ml, 加血清100 μl。于37℃水浴中分别保温10, 15, 20, 25, 30分钟后于500 nm波长处比色。测得光密度, 计算胆固醇含量。并分别用两种“二酶试剂”在岛津UV-240分光光度计上, 进行酶反应动力学试验。

3. 胆固醇氧化酶中杂酶的定性

分别用氨基酸, 葡萄糖, 胆碱, 胆固醇酯为底物。用A, B两种“二酶试剂”进行测定, 观察其显色情况。并对以胆固醇酯为底物的反应, 进行了酶反应动力学试验。

4. 胆固醇酯酶的活力测定

按Allen法测定^[3]。酶活力单位定义: 在37℃条件下, 每分钟催化1 μmol胆固醇

酯水解所需的酶量为1个活力单位。

结果与讨论

一、两种“二酶试剂”测定游离胆固醇的线性范围与相关性

按方法1测定各种浓度胆固醇标准溶液。以胆固醇浓度为横坐标, 光密度为纵坐标作图。结果游离胆固醇含量在25~600 mg/dl范围内, 两种“二酶试剂”所测得结果一致, 线性良好, 见图1。两种结果相比较, 相关良好, 见图2。说明两种“二酶试剂”在测定分析纯级的游离胆固醇时, 结果基本一致。

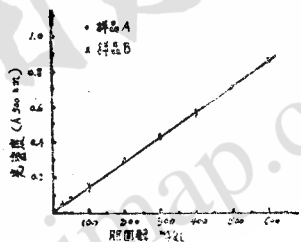


图1 两种二酶试剂测定游离胆固醇的线性范围
 $n=24 \quad r=0.996 \quad y=1.008X-0.006$

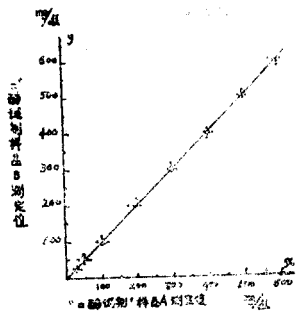


图2 “二酶试剂”样品A与样品B测定游离胆固醇的相关与回归线

二、血清游离胆固醇的测定

用两种“二酶试剂”分别测定同一份血清的游离胆固醇。其结果见下表。

“二酶试剂”	胆固醇 mg/dl	保 温 时 间					总胆 固醇
	10分	15分	20分	25分	30分		
A	44.8	50.8	54.0	57.5	61.05	162	
B	44.2	44.3	44.2	44.2	44.2	162	

图3是用两种“二酶试剂”在岛津UV-240紫外分光光度计上测定血清游离胆固醇的酶反应曲线。

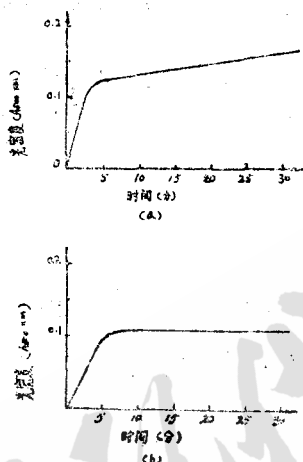


图3 两种“二酶试剂”测定血清游离胆固醇的酶反应动力学试验

(a) “二酶试剂”A的结果 (b) “二酶试剂”B的结果

以上二项实验结果表明，用胆固醇氧化酶A制成的“二酶试剂”在测定血清样品时，随着保温时间的延长光密度值会增加。因此得到的游离胆固醇的值也随保温时间的延长而增加。原因是胆固醇氧化酶A中有杂酶存在，使血清中其他成分起反应。从而干扰测定。按照氧化酶系统的测定原理推测其杂酶的种类有二种可能。一是氧化酶系统的酶，如葡萄糖氧化酶，氨基酸氧化酶，胆碱氧化酶等。这些酶可氧化血清中自己对应的底物，反应中产生过氧化氢可由测定原理中反应式(2)继续进行而显色。另一种推测是胆固醇酯酶。它可催化血清中胆固醇酯的水解而产生游离胆固醇。从而使测定原理中反应式(1)(2)继续进行。这二种可能性的存在，

使得光密度值增加。最后使测定游离胆固醇值偏高。二种推测的可能性第二种最大。理由是，如果是第一种情况，那么这种胆固醇氧化酶用于总胆固醇测定时也应发生干扰。而实际上用于总胆固醇测定时不发生干扰^[9]。为了弄清杂酶，我们又做了以下试验。

三、胆固醇氧化酶中杂酶的定性

为了鉴别胆固醇氧化酶制品中杂酶的种类。我们分别用葡萄糖、氨基酸，胆碱及胆固醇酯为底物进行反应。观察在加入那一种底物时会发生显色反应，来确定是那一种杂酶。结果是只有加入胆固醇酯的反应管变红色。其他各管均不变色。说明其杂酶确实是胆固醇酯酶。

图4是以胆固醇油酸酯为底物，分别用两种胆固醇氧化酶在岛津UV-240紫外分光光度计上扫描所得到的酶反应曲线。由图4可见，在胆固醇氧化酶制品中，确实含有少量的胆固醇酯酶。而胆固醇氧化酶B中的含量要比胆固醇氧化酶A中要少得多。

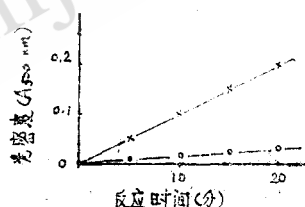


图4 以胆固醇油酸酯为底物的酶反应曲线

—x—x— 为胆固醇氧化酶A的结果
—o—o— 为胆固醇氧化酶B的结果

四、“二酶试剂”中胆固醇酯酶的活力测定

“二酶试剂”中胆固醇酯酶的活力很低，难以测准。为此我们用高浓度的胆固醇氧化酶原液为样品来测定。根据原液中胆固醇酯酶的活力，计算出“二酶试剂”中胆固醇酯酶的活力。结果是用胆固醇氧化酶A制成的“二

酶试剂”中胆固醇酯酶活力为 $\geq 0.027 \text{ u/ml}$ 。胆固醇氧化酶B制成的“二酶试剂”中胆固醇酯酶活力 $\leq 0.006 \text{ u/ml}$ 。按胆固醇氧化酶与胆固醇酯酶活性比,胆固醇酯酶活性只占胆固醇氧化酶活性的0.24%。因此用胆固醇氧化酶B制成的“二酶试剂”经王凤林等在实验室与临床应用时,获得满意结果^[10,11]。

主要参考文献

- [1] Nagasaki T. et al: Clinica Chimica Acta 75, 371, 1977
- [2] Diepliner H. et al: Clinica Chimica Acta 106, 319, 1980
- [3] 蒋完成等: 上海第一医学院学报 1985; 12(2): 155.
- [4] Zlalkis A. et al: J Lab Clin Med 1953, 41: 486.
- [5] Zak B: Amer J Clin Path 1957; 27, 583.
- [6] 吴多汉等: 生化药物杂志 (3), 1984.
- [7] 潘家秀等: 生物化学与生物物理学进展 1980; 35 (5): 51.
- [8] Allain CC et al: Clin Chem 1974; 20(4), 470.
- [9] 韩琴琴等: 上海第一医学院学报 1984; 11(3), 181.
- [10] 王凤林等: 解放军医学杂志 1987; (1), 60.
- [11] 王凤林等: 解放军医学杂志 1985; (5), 382.

Research on the Quatity of “Double Enzyme Reagent” for Determination of Free Cholesterol

Zhu Ling Yan Gian-Wei

(Hangzhou Pharmaceutical Factory, Zhejiang)

Abstract

The test results confimed that Cholesterol oxidase from streptomyces globisporus contains a little Cholesterol ester hydrolase. The existence of Cholesterol ester hydrolase did not affect the determination of total cholester, but could affect the determination of free cholesterol. The Cholestrol oxidase removing cholesterol ester hydrolase could be successfully used for the determination of free choleterol, lipoprotein-x and LCAT.

Key words: Cholesterol oxidase, Cholesterol ester hydrolase, free Cholesterol