

诺卡氏菌 2031 胆固醇氧化酶的制备及其性能

范孝用 石菲菲 梁佩兰 王 杰 胡常英 魏亚新

(河北省科学院微生物研究所,保定)

李 培 英

(北京医院老年医学研究所,北京)

刘志恒 张亚美 阮继生

(中国科学院微生物研究所,北京)

胆固醇的检验在临床上十分重要,因为高胆固醇水平,是发生动脉硬化和心肌梗塞的危险因素之一^[1]。

临床化学分析方法根据其准确程度可分三级,即决定性的方法,参考方法和常规方法。胆固醇氧化酶(COD)酶法分析开辟了测定方法的新途径。它既简便又准确,用于常规工作打破了数十年来必须采用强酸试剂的局面,而且也有可能成为参考方法^[2]。

在国外,从 1973 年开始就制备出 COD,并用于胆固醇测定,目前已广泛用于临床检验^[2]。近年来,国内已有一些科研单位先后起步,但至今还没有正式生产这一产品。我们在 1981 年进行此项工作的准备,从 1982 年以来在菌种筛选、摇瓶发酵条件和 12 升罐扩大发酵以及纯化、浓缩和应用方面做了些工作。

胆固醇氧化酶产生菌 2031 系我们收集筛选而得,该菌种经摇瓶发酵试验和 12L 玻璃罐扩大发酵证明,诺卡氏菌 2031 是一种菌体易收集、产酶性能稳定、适合工业生产的胆固醇氧化酶产生菌。制得的胆固醇氧化酶活力在 5u/ml 以上。专用保护剂对酶活力测定和使用均无影响。此酶的批间质量测定结果一致,放在 4℃ 冰箱半年以上活力基本不变,在酶活力和过氧化氢酶含量方面与日本 Toyobo 的相似,在测定游离胆固醇方面与西德 Boehringer 和日本的 Toyobo 的一致,可用于临床生化测定游离胆固醇等项目。

材 料 与 方 法

(一) 菌种

从 100 多支原始菌种筛选出一株胆固醇氧化

酶活力较高的诺卡氏菌,编号 2031。

(二) 发酵设备

BF-12-1 型玻璃发酵罐容积 12L, 压力范围 0—2.5kg/cm², 三组六平叶搅拌器变速搅拌 100—600rpm, 气流量范围 100—1000L/h。

(三) 酶活力测定

测定胆固醇氧化酶活力共用三种方法,测定 Δ^4 -胆甾烯酮法^[4], 酚-安替比林法和钛-二甲酚橙显色法^[2,4]。测定酶活力所用的仪器为 SPECORD 紫外光、可见分光光度计 (Carlzeiss JENA) 和 721 型分光光度计。过氧化氢酶测定用容量法(碘量法)^[5]和紫外分光光度法^[6]。

(四) 比活力测定

用测吸光度差 ΔA 的方法测定^[7]。吸光度差 $\Delta A = A_{215} - A_{225}$,

A_{215} 和 A_{225} 分别为蛋白质溶液在 215nm 和 225nm 下测得的吸光度。

从吸光度差 ΔA 与蛋白质浓度标准曲线即可求浓度。

(五) 菌体收集

用匈牙利水冷式高速离心机 3500rpm30' 或东德 K₂₄ 高速冷冻离心机 5000rpm30' 均可,离心取其沉淀。

(六) 提纯

从菌体得到的粗酶液经液相色谱法纯化并浓缩可得到精品。其监测仪器使用 GZS-01 型紫外吸收分析仪(北京分析仪器厂)。

本文于 1985 年 3 月 30 日收到。

张树政、李健斋教授和阎逊初教授在酶的制备、应用和菌种分类方面给予热情指导和帮助,在此一并致谢。

表 1 不同培养基浓度与酶活力的关系试验(摇瓶)

酶活测定日期	处理编号	1	2	3	4	5
	酶活 u/ml					
1984 年 4 月 18 日		0.43	0.40	0.52	0.28	0.43
1984 年 4 月 25 日		0.70	0.21	0.79	0.65	0.95
1984 年 5 月 4 日		0.40	0.41	0.38	0.44	0.41
1984 年 5 月 20 日		0.31	0.37	0.32	0.32	0.26
1984 年 6 月 1 日		0.42	0.49	0.36	0.31	0.44
1984 年 6 月 9 日		0.85	0.65	0.76	0.85	0.88
平均		0.52	0.54	0.52	0.46	0.56

表 2 诺卡氏菌 2031 12L 罐发酵过程中 pH 的变化规律

编号	时间(h)	批次	79	81	82	83	84	平均
		pH						
1	0		5.80	5.60	5.67	5.65	5.75	5.69
2	4		5.90	5.70	—	5.85	—	5.82
3	8		5.95	5.90	5.99	6.15	5.92	5.98
4	12		6.05	6.10	6.20	6.29	—	6.16
5	16		6.40	6.40	6.45	6.60	—	6.46
6	20		6.60	6.65	6.80	6.90	6.50	6.69
7	24		6.90	7.00	7.10	7.30	6.75	7.01
8	28		7.10	7.18	7.20	7.25	7.00	7.15
9	32		7.00	7.10	7.00	7.05	7.19	7.07
10	36		7.01	6.99	6.90	6.85	7.17	6.98
11	40		6.60	6.80	6.50	6.60	6.98	6.68
12	44		6.40	6.60				6.50
13	48		6.12					6.24

结果和讨论

(一) 摇瓶发酵试验

详见表 1。

诺卡氏菌 2031 菌株经过条件试验,摇瓶发酵的提取液酶活力均在 0.3u/ml 以上。平均酶活力可达到 0.46u/ml。

12L 罐发酵试验见表 2—4。

12L 罐在发酵过程中正常情况下 pH 从 5.7 左右上升到 7.2 左右,然后逐渐下降(图 1)。

有的批次如 43 和 51 批因前期短时间停电造成停风和温度不稳定,因而活力下降。

经过一段时间观察和试验认为,诺卡氏菌 2031 较易保存,菌体较易收集,发酵周期短,经过

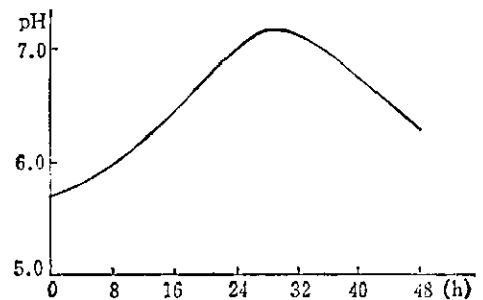


图 1 12L 罐发酵过程 pH 变化曲线

多批次摇瓶试验和小罐试验提取液平均酶活力分别在 0.46u/ml 和 0.399u/ml。

(二) 酶的使用性能

表 3 12L 罐发酵时间与酶活力的关系

发酵时间 (h)	0	32	40	48
酶活力 (u/ml)	0	0.29	0.36	0.46

表 4 连续九罐的发酵结果

批 号	发酵单位 (u/ml)
43	0.288
44	0.324
45	0.360
46	0.576
47	0.564
48	0.408
50	0.396
51	0.264
52	0.408
平 均	0.399

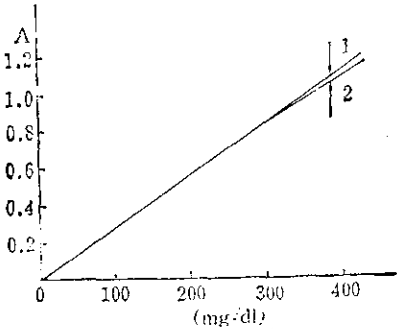


图 3 诺卡氏菌 2031COD 与日本 Toyobo 及西德 Boehringer 的 COD 比较

- 1.日本 Toyobo 和西德 Boehringer COD 反应曲线
- 2.诺卡氏菌 2031COD 反应曲线

义为每毫升酶液中所含有的单位数。按日本 Toyobo 的 COD 活力鉴定方法,以美国 Beckman DU-8 型分光光度计,按动态反应测定。结果为:诺卡氏菌 2031COD5.5u/ml、日本 Toyobo 的 COD5.7u/ml。

2.过氧化氢酶: 诺卡氏菌 2031COD 中过氧化氢酶的含量 $\leq 2\%$,与日本 Toyobo 的 COD 中含量相似。

3.米氏常数: 按本室设计的胆固醇测定条件下诺卡氏菌 2031 COD 的米氏常数是 2.8×10^{-4} mol/L (见图 2)。

4.酶制剂的稳定性: 诺卡氏菌 2031COD 置 4℃ 存放十个月后酶活力不变,但有少量絮状物出现,各批间 COD 测定值一致(见表 5)。

5.与西德 Boehringer 及日本 Toyobo 的 COD 比较(见图 3)

用北京医院老年医学研究所生化室设计的胆

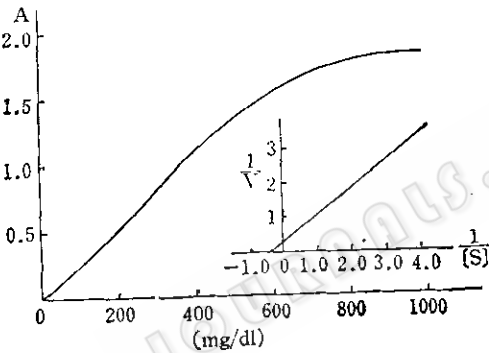


图 2 COD 反应曲线及米氏常数

胆固醇氧化酶 (COD) 是临床生化用于测定游离胆固醇的关键酶。从临床应用角度对 COD 的使用性能作了观察,并与国际上同类产品进行比较。

1.活力单位: 活力单位的定义是在 37℃, pH7.0 的条件下,1 分钟将 1uM 胆固醇转化为 Δ^4 -胆甾烯酮所需酶量为一个单位。u/ml 的意

表 5 四批 COD 测定值 (A × 100)

测定物(胆固醇)	第一 批	第二 批	第三 批	第四 批
1	6.0	5.5	5.6	5.8
2	31.3	30.9	30.9	31.2
3	57.5	56.8	56.7	57.2
4	57.3	56.8	56.7	57.4
5	85.1	84.7	84.6	85.3

固醇酶法分析,以改良的 Trinder 反应进行测定(三种酶用相同的单位数)。

三种 COD 所得的结果一致,50—400mg/dl 呈线性,当诺卡氏菌 2031 的 COD 用量增加时,线性可达 600mg/dl。

经半年试用及实验表明,诺卡氏菌 2031 的 COD 性能良好,在用于血清游离胆固醇测定时与西德 Boehringer 和日本 Toyobo 的 COD 所得结果一致,符合临床生化实际应用的要求。

参 考 文 献

[1] G. G. 吉尔鲍特(缪辉南,陈石根译): 酶法分析

手册,上海科学技术出版社, p. 215, 1983。

[2] 李健斋: 中华医学检验杂志, 5(1): 36, 1982。

[3] 上海医学化验所主编: 临床生化检验(上册), 上海科学技术出版社, p. 78, 1979。

[4] Charies, C. A. et al.: *Clin. Chem.*, 20(4): 470—475, 1974.

[5] 郑寿亭: 微生物酶及其应用, 山东人民出版社, p.186—189, 1972。

[6] 蒋传葵等: 工具酶的活力测定, 上海科学技术出版社, p. 36—38, 1982。

[7] 张龙翔等: 生化实验方法和技术, 人民教育出版社, p. 166—168, 1983。