

• 临床研究 •

α-L-岩藻糖苷酶水解 XPT-F、PNP-F 的酶学性质比较研究*

章玉胜, 贾江花, 汪屹, 张帅, 张永

(美康生物科技股份有限公司研发中心, 浙江宁波 315104)

摘要: 目的 比较 α -L-岩藻糖苷酶(AFU)水解 XPT-F、PNP-F 的酶学性质。方法 分别以 XPT-F、PNP-F 作为底物, 对 AFU 催化水解反应的酶学性质(最适 pH、最适温度、 K_m 值、离子浓度)进行研究。结果 AFU 水解 XPT-F、PNP-F 的最适 pH 分别为 5.0、4.4; 最适温度分别为 40、45 °C; K_m 值分别为 (0.15 ± 0.012) 、 (0.29 ± 0.015) mmol/L; 离子浓度为 100 mmol/L 时, K^+ 、 Na^+ 对 XPT-F、PNP-F 水解均无影响, 而 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 对 XPT-F 无影响, 对 PNP-F 有一定促进作用。结论 AFU 催化 XPT-F 水解具有 pH 适应范围广、催化 K_m 值小、受离子浓度干扰小等特点, XPT-F 可作为人血清中该酶测定的底物进一步研究。

关键词: α -岩藻糖苷酶; XPT-F; PNP-F; 酶学性质

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.09.029

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)09-1235-02

α -L-岩藻糖苷酶(AFU)是一种溶酶体酸性水解酶, 在人脑、肺、肾等组织, 以及血清、唾液、尿液等体液中广泛存在, 主要参与人体内含岩藻糖的糖蛋白、糖脂等生物大分子的水解代谢^[1-2]。文献报道, AFU 的升高与原发性肝癌有相关性, 可为该发生的肿瘤标志物, 可与甲胎蛋白联合检测提高肝癌的诊断, 而且 AFU 的活性在肝炎、肝硬化、结肠癌、胃癌、卵巢肿瘤等方面也具有诊断价值, 所以测定血清中 AFU 含量具有重要的临床意义^[3-5]。

AFU 临床检测中主要采用 PNP-F、CNP-F、4-MU-F 作为底物, AFU 催化其水解分别形成 PNP、CNP 和 4-MU, 在 405 nm 波长下监测产物的生成速率, 计算 AFU 的活性, 但该法检测灵敏度和精密度一般, 抗干扰能力差^[6-8]。开发新的 AFU 酶活检测底物, 提高 AFU 检测准确度, 具有重要的意义。本文就 AFU 测定新型底物 XPT-F 水解反应的酶学性质进行了研究, 并与已有底物 PNP-F 作比较, 为 XPT-F 进一步用于 AFU 临床检测提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料 AFU 购自 sigma 公司, 酶活 ≥ 2 U/mg; XPT-F 由宁波大学提供, 纯度达 95% 以上; 其他试剂均为分析纯, 购自国药集团有限责任公司。

1.2 方法

1.2.1 最适 pH 测定 分别用 pH3.5~6.2 的缓冲液溶解 XPT-F 和 PNP-F, 配成浓度为 2 mmol/L 的底物溶液。将 AFU 用双蒸水溶解为 0.01 U/L 的酶溶液, 1 mL 底物溶液中加入 100 μ L 酶液, 37 °C 反应 10 min, 在 450 nm 下检测产物 XPT 或 PNP 的吸光度, 以最大吸光度为 100% 计, 计算不同 pH 下相对酶活。

1.2.2 最适温度测定 用上述最适 pH 缓冲液分别溶解底物, 分别在 30~65 °C 不同温度下反应 10 min, 计算不同温度下相对酶活。

1.2.3 K_m 值测定 分别将底物配成 0.01~1 mmol/L 浓度梯度, 加入酶液在 37 °C 反应 10 min, 以底物浓度为 X 轴, 吸光度为 Y 轴, 用 Origin8.0 软件进行米氏方程耦合, 求出 K_m 值。

1.2.4 离子浓度测定 在底物溶液中加入 20~100 mmol/L 的 KCl、NaCl、MgCl₂、CaCl₂, 测定酶活, 以不含金属离子的为 100% 计, 计算金属离子对其酶活影响。

2 结果

2.1 最适 pH 测定结果 在不同 pH 下, AFU 催化 XPT-F 和

PNP-F 水解反应的相对酶活见图 1。AFU 催化 XPT-F 最适 pH 为 5.0, 其中在 pH4.1~6.2 范围内, 酶活均达到 80% 以上; 催化 PNP-F 最适 pH 为 4.4, 在 pH4.1~5.0 范围内, 酶活可达到 80% 以上。

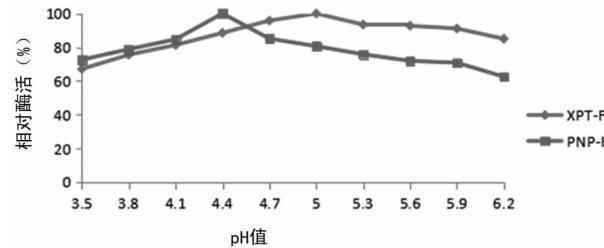


图 1 不同 pH 下 AFU 催化 XPT-F 和 PNP-F 水解反应相对酶活

2.2 最适温度测定结果 分别在 pH5.0、pH4.4 下测定 XPT-F 和 PNP-F 最佳反应温度。在不同温度下, AFU 催化 XPT-F 和 PNP-F 水解反应的相对酶活见图 2。AFU 催化 XPT-F 最适温度为 40 °C; 催化 PNP-F 最适温度为 45 °C, 但在 50~65 °C 范围内, 两者相对酶活差别不大。

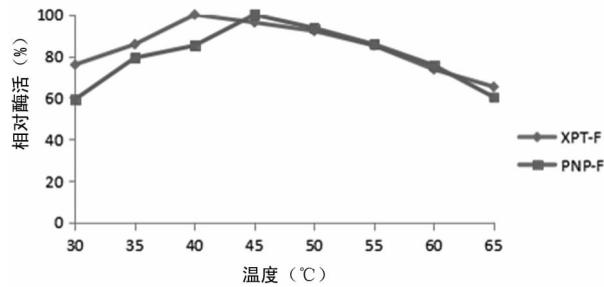


图 2 不同温度下 AFU 催化 XPT-F 和 PNP-F 水解反应相对酶活

2.3 K_m 值测定结果 分别以不同浓度 XPT-F、PNP-F 作为底物, 测定 AFU 催化其水解反应速度, 反应速度是以每分钟吸光度/(min) 表示, 结果见表 1。通过 Origin8.0 拟合米氏方程为 $V = [S] * V_{max} / ([S] + K_m)$, 得知 XPT-F 的 K_m 值为 (0.15 ± 0.012) mmol/L, 拟合系数 $r^2 = 0.991$; PNP-F 的 K_m 值为 (0.29 ± 0.015) mmol/L, 拟合系数 $r^2 = 0.989$ 。

2.4 离子浓度测定结果 在不同浓度的 KCl、NaCl、MgCl₂、

* 基金项目: 新型海洋生物基糖苷底物制备和岩藻糖苷酶试剂盒研究及产业化项目(2014-09)。

CaCl_2 下, AFU 催化 XPT-F、PNP-F 水解反应的相对酶活见图 3、4。KCl、NaCl 浓度上升到 100 mmol/L 时, AFU 催化 XPT-F 和 PNP-F 水解反应均无影响;而 MgCl_2 、 CaCl_2 浓度上升到 100 mmol/L 时, AFU 催化 XPT-F 无影响,而对 PNP-F 水解反应有一定的促进作用,相对酶活分别达到 125.9% 和 133.7%。

表 1 AFU 催化不同浓度 XPT-F 和 PNP-F 水解反应速度 (/min)

浓度 (mmol/L)	XPT-F	PNP-F
0.01	0.033 6	0.017 0
0.02	0.063 2	0.032 8
0.03	0.088 9	0.048 6
0.05	0.165	0.074 8
0.08	0.192	0.108
0.1	0.215	0.121
0.2	0.317	0.221
0.3	0.359	0.259
0.5	0.419	0.329
0.8	0.448	0.392
1	0.469	0.398

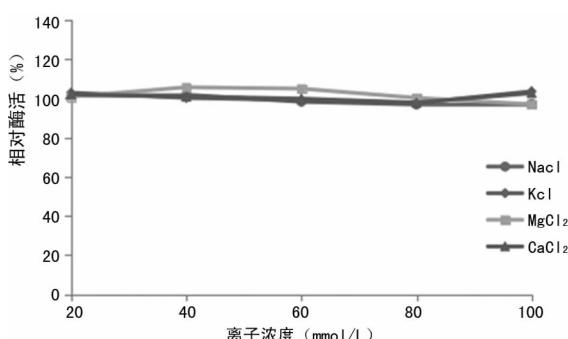


图 3 不同离子浓度下 AFU 催化 XPT-F 水解反应相对酶活

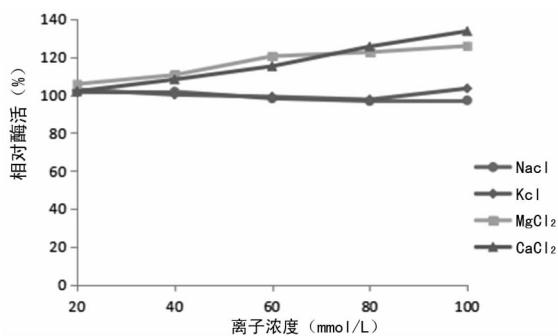


图 4 不同离子浓度下 AFU 催化 PNP-F 水解反应相对酶活

3 讨 论

AFU 活性检测在肝癌、肝炎、肝硬化等方面具有良好诊断价值,在临幊上得到广泛应用。快速、准确检测 AFU 活性,可有效地对相关疾病进行诊断。本文比较了 AFU 催化 XPT-F 和 PNP-F 分解反应的酶学性质,结果表明 AFU 催化 XPT-F 水解反应最适 pH 为 5.0,在 pH4.1~6.2 范围内,酶活均达到 80% 以上,比 PNP-F 最适 pH 偏中性,并且具有更广泛的 pH 适应性;XPT-F 水解反应最适温度为 40 °C,与全自动生化分析仪检测 37 °C 较为接近;XPT-F 水解反应 K_m 值为 (0.15 ±

0.012) mmol/L, 低于 PNP-F 水解反应 K_m 值 (0.29 ± 0.015) mmol/L, 这将减少 AFU 达到最大反应速度的底物用量;AFU 催化 XPT-F 水解反应可耐受 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 等离子影响,而 100 mmol/L 的 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 对 PNP-F 有一定的促进作用,导致 AFU 临幊检测中离子强度的干扰。

目前临幊上测定 AFU 的方法主要有荧光法和速率法。荧光法利用 AFU 水解 4-甲基伞形酮- α -岩藻糖苷释放 4-甲基伞形酮,在碱性条件下终止反应,并激发产物发生荧光用于检测,该法灵敏度高,但需要专门仪器,难以推广^[9-10]。速率法主要使用 PNP-F、CNP-F、4-MU-F 作为底物,可用于全自动生化仪连续检测,但准确度和精密度一般,受干扰影响大^[11]。XPT-F 作为新型底物,在 AFU 催化其水解反应的酶学性质研究中表现出优异特性,具有用其检测 AFU 的潜力,后续需进一步评价 XPT-F 作为底物,在 AFU 临幊检测中的准确度、精密度、抗干扰能力等性能指标,改善目前 AFU 临幊检测存在问题,提高 AFU 的检测准确性。

参考文献

- [1] Deugnier Y, David V, Brissot P, et al. Serum alpha-L-fucosidase: a new marker for the diagnosis of primary hepatic carcinoma? [J]. Hepatology, 1984, 4(5): 889-892.
- [2] 段俊林, 欧超伟. α -L-岩藻糖苷酶的研究进展 [J]. 国际检验医学杂志, 2008, 29(8): 731-732.
- [3] Deugnier Y, Le TA, Glaise D, et al. A study of lysosomal enzyme activities in serum and leukocytes in chronic liver diseases [J]. Clin Chim Acta, 1980, 108(3): 385-392.
- [4] Bauer CH, Vischer P, Grünholz H, et al. Glycosyltransferases and glycosidases in Morris hepatomas [J]. Cancer Res, 1977, 37(5): 1513-1518.
- [5] 张瑞霞, 杨义明, 赵学峰, 等. 血清甲胎蛋白、 α -L-岩藻糖苷酶和肿瘤相关物质联合检测对原发性肝癌的诊断价值 [J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(2): 111-112.
- [6] Khunsook S, Alhadeff JA, Bean BS. Purification and characterization of human seminal plasma alpha-L-fucosidase [J]. Mol Hum Reprod, 2002, 8(3): 221-227.
- [7] 黄丽君. α -L-岩藻糖苷酶的研究进展 [J]. 检验医学与临幊, 2012, 9(15): 1920-1921.
- [8] 刘建武. 连续监测法测定血清 α -L-岩藻糖苷酶 [J]. 临幊检验杂志, 1997, 15(3): 153-154.
- [9] Attia MS, Othman AM, Aboaly MM, et al. Novel spectrofluorimetric method for measuring the activity of the enzyme alpha-L-fucosidase using the nano composite optical sensor Samarium (III)-doxycycline complex doped in sol-gel matrix [J]. Anal Chem, 2010, 82(14): 6230-6236.
- [10] Cuer M, Barnier A, De La Salmoniere P, et al. Fluorimetric measurement of plasma alpha-L-fucosidase activity with a centrifugal analyzer: reference values in a healthy French adult population [J]. Clin Chem, 2000, 46(4): 562-564.
- [11] Wang JJ, Cao EH. Rapid kinetic rate assay of the serum alpha-L-fucosidase in patients with hepatocellular carcinoma by using a novel substrate [J]. Clin Chim Acta, 2004, 347(1/2): 103-109.