

文章编号 :1009-038X(2000)03-0251-03

比色法测定胆固醇氧化酶酶活^{*}

季文明,陈毅力,张和春,王武

(无锡轻工大学生物工程学院,江苏无锡 214036)

摘 要:根据实验结果和理论计算确定检测体系中胆固醇的质量浓度为 0.387 mg/mL,表面活性剂的质量浓度为 0.2 g/dL,确定过氧化氢浓度与反应液吸光度之间的定量关系.在此基础上,建立了比色法测定胆固醇氧化酶酶活的方法.

关键词:胆固醇氧化酶;胆固醇;比色法检测

中图分类号:Q554 文献标识码:A

Colorimetric Determination of the Activity of Cholesterol Oxidase

Ji Wen-ming, CHEN Yi-li, ZHANG He-chun, WANG Wu

(School of Biotechnology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

Abstract: In the paper, Determined the cholesterol and the detergent in the final solution were determined as 0.387 mg/mL and 0.2 g/dL respectively. A linear equation about the quantitative relationship between the hydrogen peroxide and the absorbency was set up. The colorimetric determination method of the activity of cholesterol oxidase was established.

Key words: cholesterol oxidase; cholesterol; colorimetric determination

胆固醇氧化酶是一种多功能酶^[1].目前,检测血清胆固醇含量的诊断试剂就应用了胆固醇氧化酶.胆固醇氧化酶可以降低食品中的胆固醇含量^[2],能有效抑制鳞翅目昆虫的生长繁殖,是一种生物杀虫剂^[3].胆固醇的氧化产物——胆甾-4-烯-3-酮还具有抗肥胖、治疗肝病等药效^[4,5].

测定胆固醇氧化酶活性的方法有胆甾酮分析法、过氧化氢分析法、液相色谱法和薄层层析法等多种方法^[6].酶催化反应过程中,氧化 1 mol 胆固醇,产生 1 mol 过氧化氢.比色法是依据过氧化氢在过氧化物酶的作用下分解,可使 4-氨基-安替比林与苯酚形成亚醌类呈红色的化合物,在 500 nm 处有最大吸收峰的原理^[7],通过测量反应液在 500 nm

处的吸光度,就可以定量测定胆固醇被氧化的量,从而计算出胆固醇氧化酶的酶活单位.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 产胆固醇氧化酶短杆菌 DGCD-2 实验室保藏.

1.1.2 试剂 胆固醇 BR 上海生化试剂公司提供;4-氨基-安替比林 AR 华东师范大学化工厂产品;辣根过氧化物酶 华美公司提供;过氧化氢 AR 宜兴第二化学试剂厂产品;其它试剂均为分析纯.

* 收稿日期:1999-10-27;修订日期:2000-03-12.

基金项目:国家轻工局轻工科技发展计划项目(G03-13).

作者简介:季文明(1965年7月生),男,江苏扬州人,生物工程博士研究生.

1.1.3 培养基种子培养基 (g/dL):牛肉膏 0.3 , 蛋白胨 1 ,NaCl 0.5 , pH 7.5 ;发酵培养基(g/dL): 胆固醇 0.05 ,葡萄糖 2 ,酵母膏 0.75 ,NaCl 0.01 ,pH 7.5.

1.1.4 试剂 溶液 A 4-氨基-安替比林 1 mmol/L ;苯酚 6 mmol/L ;磷酸钾缓冲液 pH= 7.5 25 mmol/L ;叠氮钠 0.02 % ;辣根过氧化物酶 7 000 U/L ;Triton X-100 0.2 % ;溶液 B 试剂 A(不含有 Triton X-100);溶液 C 过氧化氢 2.584 mmol/L ;溶液 D 胆固醇/异丙醇溶液(含 Triton X-100 ,4.26 %) 0.826 % ;溶液 E 胆固醇/异丙醇溶液 0.826 % .

1.2 仪器

721 分光光度计 上海第三分析仪器厂生产.

1.3 方法

1.3.1 培养方法 斜面→种子培养液→发酵液 ;装液量均为 250 mL 的三角瓶装 30 mL 培养液 ,30 ℃ 220 r/min ,种子培养 12 h ,接种量为 10 % ,发酵培养 36 h.

1.3.2 胆固醇溶解度试验 在溶液 E 中加入不同量的 Triton X-100 ,取 150 μL ,加入 3 mL 溶液 B 中 ,在光照下观测丁达耳现象 ,500 nm 处测吸光度.

1.3.3 标准曲线反应时间的确定 取溶液 B 3 mL 于试管中 ,37 ℃ 保温 3 min ,加入溶液 C 75 μL ,反应不同时间 ,检测 500 nm 处的吸光度.

1.3.4 确定标准曲线的反应 取溶液 B 3 mL 于试管中 ,37 ℃ 保温 3 min ,加入不同量溶液 C ,反应 5 min ,在 500 nm 处测吸光度.

1.3.5 测定酶活 取溶液 B 3 mL ,溶液 D 150 μL 于试管中 ,37 ℃ 保温 3 min ,加入 50 μL 酶液 ,准确反应 5 min ,于沸水中加热 3 min ,冷却后 ,在 500 nm 处测吸光度.

1.3.6 实验数据处理 应用软件 EXCEL 处理.

2 结果与讨论

2.1 胆固醇溶解试验

测定酶活时 ,一般选酶反应的最大初速度或零级反应阶段的每反应速度来计算酶活单位 .由于在酶促的最初阶段 ,底物的变化量或产物的生成量相对较小 ,不易检测 ,所以实际多选用零级反应阶段 .它要求底物的变化量小于 5 % 或底物浓度大于 10 K_m ^[8] .而胆固醇氧化酶的 K_m 值一般在 10⁻⁵ ~ 10⁻⁴ mol/L 之间 ,所以假定短杆菌所产生的胆固醇经酶的 K_m 为 5 × 10⁻⁵ mol/L ,根据此计算出测酶活的反应体系中的胆固醇质量浓度为 0.387 mg/

mL. 胆固醇不溶于水 ,易溶于有机溶剂 ,使用表面活性剂可以将胆固醇分散于水相中 .表面活性剂用量少 ,胆固醇在反应液中呈胶体状 ,有丁达耳现象 ,影响吸光度的测定 ;用量多则影响酶促反应的进行 .所以在胆固醇质量浓度确定的情况下必需考察表面活性剂的用量对胆固醇溶解度的影响 ,以确定最小用量 .

按照方法 1.3.1 ,调整溶液 E 中 Triton X-100 的含量 ,使反应液中 Triton X-100 的质量浓度分别为 0.05 ,0.10 ,0.15 ,0.20 ,0.25 g/dL ,在光照下观察丁达耳现象 ,在 500 nm 测吸光度 ,结果见表 1.

表 1 不同 Triton 质量浓度下胆固醇的溶解情况
Tab.1 The solubility of cholesterol in solutions to the concentrations of Triton X-100

反应液中 Triton 的质量浓度/(g/dL)	丁达耳现象	OD ₅₀₀
0.05	有	0.387
0.10	有	0.123
0.15	微	0.076
0.20	微	0.012
0.25	微	0.006

表 1 可见 ,当反应液中 Triton X-100 的含量为 0.20 g/dL 时 ,反应液基本没有丁达耳现象 ,所以确定 Triton X-100 的最终质量浓度为 0.20 ,即使溶液 E 中的 Triton X-100 的质量浓度为 4.26 g/dL.

2.2 制定标准曲线反应时间的确定

过氧化氢在过氧化物酶的作用下瞬间分解 ,但苯酚与 4-氨基-安替比林的反应速度未确定 .所以 ,在制订标准曲线之前 ,先考察反应时间对吸光度的影响 .在 3 mL B 液中加入 75 μL 溶液 C ,反应不同时间 ,观察吸光度的变化 .实验结果见表 2.

表 2 不同反应时间反应液的吸光度
Tab.2 The absorbencies of solution to the time of reactions

反应时间/min	OD ₅₀₀
1	0.501
3	0.506
5	0.498
8	0.505
10	0.497

从表 2 中可以看出 ,反应时间在 1 min 以后 ,反

应液的吸光度基本不变,也就是说,在 1 min 之内过氧化氢已完全被氧化,稍留余量,确定反应时间为 5 min.

2.3 确定标准曲线

按照方法 1.3.3,分别加入溶液 C 30,60,90,120,150 μL ,反应 5 min,然后测定吸光度.进行两次平行实验,结果见表 3.

表 3 不同浓度过氧化氢的吸光度

Tab.3 The absorbencies of solutions to concentration of H_2O_2

溶液 C 添加量/ μL	溶液 D 浓度/ $(\mu\text{mol}/\text{mL})$	平均吸光度
30	0.0251	0.214
60	0.0497	0.396
90	0.0781	0.579
120	0.0975	0.753
150	0.121	0.925

对数据进行线性回归,得以下方程:

$Y=0.1347X-0.003 \quad R^2=0.9979$

其中: X 为反应液的吸光度; Y 为反应液中过氧化氢的浓度($\mu\text{mol}/\text{mL}$); R^2 为相关系数

从平行试验的数据和平均值可以看出,数据偏差很小,回归方程的相关系数也较好.所以,其平均值所得的方程可以代表胆过氧化氢与反应液吸光度之间的关系(见图 1).

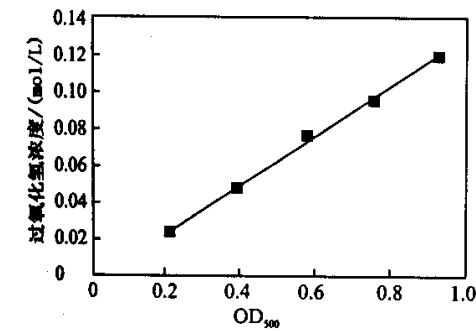


图 1 过氧化氢浓度标准曲线

Fig.1 The standard absorbance of H_2O_2

2.4 胆固醇氧化酶酶活的测定方法

胆固醇氧化酶酶活的定义为:在 37 $^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=7.5$,1 min 内,催化 1 μmol 胆固醇氧化为胆甾-4-烯-3-酮所需的酶.根据酶活定义和过氧化氢浓度标准曲线方程,可以得出酶活的计算公式为:

酶活(U/L)= $0.1315 A_{500} \times 1000 \times V \times K \div T \times 1000$

其中: A :反应液吸光度; V :反应液体积(mL); K :酶液稀释倍数($1/\text{mL}$); T :反应时间(min)

按照方法 1.3.4,测定发酵液的酶活,重复 8 次,并按公式计算酶活,结果见表 4.

表 4 比色法测定酶活的平行试验结果

Tab.4 The results of determination of the activities of cholesterol oxidase

序号	吸光度 A_{500}	酶活/ (U/L)
1	0.291	490
2	0.294	495
3	0.297	500
4	0.288	485
5	0.285	480
6	0.296	498
7	0.292	491
8	0.283	496

对表 4 中数据进行处理,得出以下结果:
平均酶活为 491 U/L ,相对偏差小于 2.2%.

3 结 论

与胆甾酮分析法相比,省去了有机溶剂萃取的过程,可直接在可见光波长下检测,简化了检测过程,提高了检测的稳定性.在保证酶促反应在均相中进行和最终反应液为均相的前提下,确定了最低表面活性剂的质量浓度为 0.2 g/dL .以过氧化氢确定标准曲线,保证了实验数据的可靠性.实际检测结果重复性较好,相对偏差小于 2.2%,能够满足实验要求.

参考文献

[1] MAKINODAN, YASUO. コレステロール酸化酵素[J]. バイオサイエンスとイダストリ,1996,54(1):16~22
[2] WU Chung-yung, YU Roch-chui, HSU Shun-yao. Decomposing Cholesterol in Egg Yolk by Enzymes of Rhodococcus equi No. 23 [J]. Shipin Kexue, 1995, 22(1):69~76

- [3] PURCELL P , GREENPLATE T , JENNINGS G , et al. Cholesterol Oxidase : A Potent Insecticidal Protein Active against Boll Weevil Larvae[J]. **Biochem Biophys Res Commun** ,1993 , 196(3) :1406~1413
- [4] SUZUKI Kunio. 4-Cholesten-3-one for the Control of Obesity[P]. 世界专利 : **WO** 93 12 798 08 ,1993.
- [5] KASHIMA M , KINOSHITA T , INAOKA Y , et al. Cholestanones for Treatment of Liver Diseases[P]. 日本专利 : **JP** 07 69 , 898 [95 69 , 898] ,1995 - 05 - 14.
- [6] ANDREW G. Cholesterol Oxidase : Properties and Applications[J]. **J Steroid Biochemistry** , 1976 , 7 : 705~713
- [7] CHARLES C , LUCY S. POON , et al. Enzymatic Determination of Total Serum Cholesterol[J]. **Clin Chem** , 1974 , 20(4) : 470~475
- [8] 颜思旭 , 蔡红玉主编. 酶催化动力学原理与方法[M]. 厦门 : 厦门大学出版社 ,1987.

(责任编辑 朱 明)