

固定化乳酸脱氢酶的研究

李慧贤 汪静英

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海)

血清中甘油三酯的升高和冠状动脉疾病及动脉硬化的危险程度有关, 因此甘油三酯的测定在临床诊断中受重视。固定化酶作为生物传感器受到更多注意。我们对酶法测定顺序多酶系统的最末的乳酸脱氢酶 (LDH), 用CNBr活化的Sephacrose 4B进行了固定化, 并观察了固定化酶稳定性的影响。

材料与 方法

(一) 材料

LDH 是由兔肌提取, 经纯化^[1]得到活力单位为每毫克蛋白400单位。

Sephacrose 4B由瑞典 Pharmacia 公司进口。

溴化氢 Merck 产品。丙酮酸钠盐、NADH由上海生化东风试剂厂提供。

(二) 测定方法

1. 乳酸脱氢酶活力测定: 3ml 0.1M pH7.5磷酸缓冲液的测定液中含有 0.17mM NADH及5mM的丙酮酸钠, 加入 1 μ l酶液, 25 $^{\circ}$ C进行反应, 于340nm波长测定光吸收的减少。规定在上述条件下, 每分钟能氧化生成1微克分子辅酶I的酶量为1单位。NADH的克分子消光值以 6.22×10^3 计算。

2. 固定化LDH活力测定: 方法类似于溶液酶。只是反应体积扩大5倍, 加入一定量固定化酶后搅拌反应, 然后滤出上清测340nm波长光吸收的减少。固定化酶

活力定义同溶液酶, 以 μ /g 湿重固定化酶表示。

实验与 结果

(一) 固定化乳酸脱氢酶的制备

用基本上类似Axen等报道的方法^[2]固定化。Sephacrose 4B (湿重) 用CNBr以 1:0.1 (W/W) 的比例在最终浓度为1.25M 磷酸钾缓冲液 (pH11.5) 中活化。然后将乳酸脱氢酶与CNBr活化的Sephacrose 4B在0.05M pH7.5磷酸缓冲液偶联, 再用乙醇胺封闭未完全反应的活化基团。所得固定化酶的活力为7.5 μ /g湿重载体, 活力回收为13.5%, 相对活力为39%。

(二) 温度对酶反应速度的影响

固定化LDH与溶液酶于不同温度测定其活力, 从温度-活力曲线 (图1) 可以看出, 在我们所采用的测定条件下, 溶液酶的最适温度为45 $^{\circ}$ C, 经固定化后为50 $^{\circ}$ C, 比溶液酶升高了5 $^{\circ}$ C。对温度的耐受较溶液酶有显著的增大。固定化酶在60 $^{\circ}$ C反应时活力仍维持90%以上, 而溶液酶在55 $^{\circ}$ C反应时活力却只剩下16%左右。

(三) 温度对酶稳定性的影响

在无底物存在的条件下, 将固定化酶与溶液酶悬浮于 0.1M pH7.5 的磷酸缓冲液中, 于不同温度保温1h后, 置冰浴冷却, 再于25 $^{\circ}$ C测其残留活力, 由热稳定性 (图

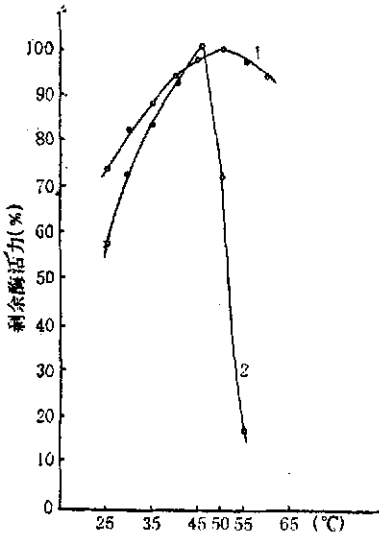


图 1 温度对酶反应速度的影响
1. 固定化酶 2. 溶液酶

2) 表明, 固定化酶在保温温度低于40°C 时其活力基本上无失活, 随着保温温度的升高其活力逐渐下降, 到保温温度达到65°C 时其活力才完全丧失。而溶液酶在其保温温度低于40°C 就已明显失活, 到55°C 时活力就完全丧失。显然, LDH 经固定化后酶的热稳定性有很明显的提高。

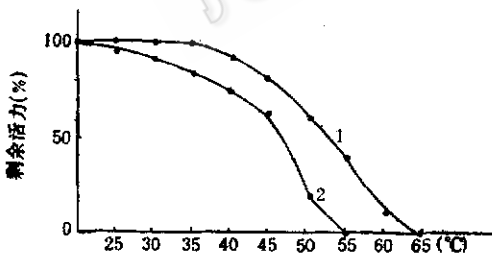


图 2 酶的热稳定性
1. 固定化酶 2. 溶液酶

(四) pH对酶反应速度的影响

在不同 pH 的反应液中, 测定其固定化酶与溶液酶的活力。从 pH-活性曲线 (图 3) 可以看出, 固定化酶与溶液酶的最适 pH 没有任何差异, 均为 7.5。

(五) pH对酶稳定性的影响

在无底物的情况下, 将固定化酶与溶

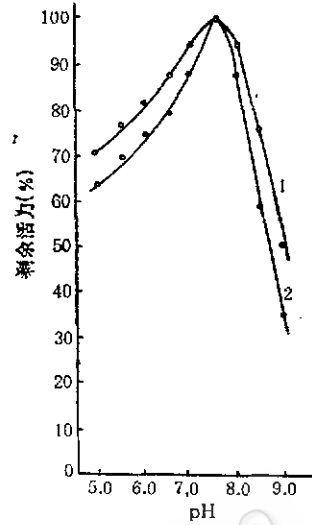


图 3 pH-活性曲线
1. 固定化酶 2. 溶液酶

液酶悬浮于0.02M不同pH的缓冲液中, 置冰箱(4°C)2h后, 将其pH调节到pH7.5, 然后测定酶的残留活力。由 pH 稳定性曲线 (图 4) 表明, 乳酸脱氢酶固定化前后对 pH 的稳定性有很明显的差异, 固定化酶的活力在 pH 5.0—8.5 的范围内均在 90% 以上。而溶液酶却只在 pH 7.0—8.0 的范围内其活力变化较少。在偏酸或偏碱侧的稳定性就比较差。

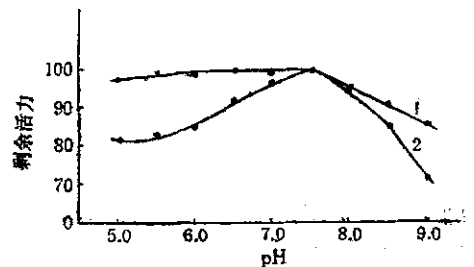


图 4 pH稳定性曲线
1. 固定化酶 2. 溶液酶

(六) 酶的表观米氏常数 K_m'

按照 $1/V$ 对 $1/S$ 作图法, 分别测定了 LDH 及固定化 LDH 的表观米氏常数, 由 (图 5) 表明, 两者的表观米氏常数基本上相同, K_m 为 0.1mM 左右。

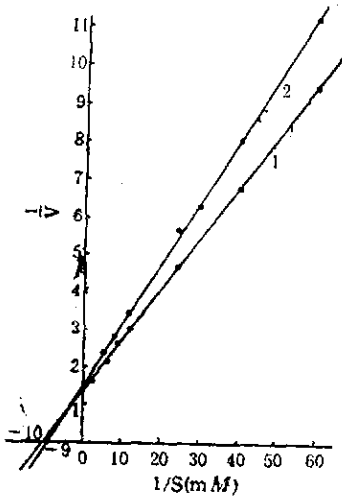


图5 酶的表现米氏常数 K_m'
1. 固定化酶 $K_m' = 0.1mM$
2. 溶液酶 $K_m' = 0.11mM$

(七) 酶的贮存稳定性

将固定化LDH与溶液酶悬浮于0.05M pH7.5的磷酸缓冲液中,置4℃冰箱保存,间隔一段时间测定活力,其剩余活力见图6), LDH经过固定化后其稳定性比溶液酶有明显的优势。溶液酶在4℃保存了35天后其活力仅剩30%,而固定化酶在保存了65天后其活力仍保留70%。

讨 论

LDH用CNBr活化的 Sepharose 4B 固

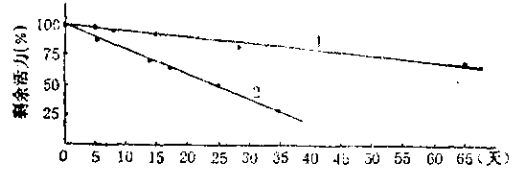


图6 酶的贮存稳定性
1. 固定化酶 2. 溶液酶

定化后在酶学性质上与溶液酶基本无改变,如最适pH均在7.5,表观米氏常数均在0.1mM左右,说明底物在载体中的扩散及通透性无空间阻碍。热稳定性和保存稳定性有明显的提高,这可能是由于酶蛋白分子与载体的结合增强了酶蛋白分子构型的刚性,减少了酶分子结构受到热处理而伸展变性的结果。

目前国外已生产全酶试剂盒,并应用于自动化分析仪。酶法测定简便、快速、特异性高,缺点是试剂昂贵,目前供应尚有困难。而固定化酶除具有酶法测定的一些优点外,它还能够反复使用。这将有助于大大降低成本。因此固定化多酶系统的研究更受到重视。我们对检测甘油三酯多酶系统的其他酶的固定化正在进行研究中。

参 考 文 献

- [1] Scopes, R.K. and Stotek, A., In, Methods in Enzymology, Vol. 90, p. 479, 1982.
[2] Axen, R. et al., Nature, 214:1302, 1976.