DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.10.031
第26卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 10
2004年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2004

文章编号:1000-5404(2004)10-0923-03

技术方法

用积分法测定血清芳香酯酶活性

Assay of serum arylesterase activity by the integrated method

廖 飞[1],王继红[1],曾昭淳[1],康格非[2],左渝萍[1],王咏梅[1],王 娜[1],袁小媚[1],宋 正[1],余婷婷[1],杨 柳[1] (重庆医科大学:[1]生物化学教研室,[2]检验系临床生物化学教研室,重庆 400016)

提 要:目的 以血清芳香酯酶(ArE)为模型,用模拟和实验考察积分法测定酶活性的可靠性。方法 用酚乙酸酯测定ArE反应曲线。按ArE的积分速度方程 $In(S_0/S_i)+(S_0-S_i)/K_m=(V_m/K_m)\times t_i$ 计算无误差反应曲线,叠加随机误差得模拟曲线。以底物浓度(S_0)为参数用Equ①非线性拟合测定 V_m/K_m,换算得 V_m。结果 模拟表明积分法测定酶活性与 S_0 无关,升高 S_0 可提高测定上限。实验表明 S_0 低于 K_m 的20%时 V_m/K_m 无变化;重复性5.8%($\nu=6$);本底和反应起点延迟无干扰;升高 S_0 可提高上限。此积分法用20% K_m 的 S_0 测定86份血清,ArE活性 V_m 呈正态分布,与据初速度按米氏方程计算的 V_m 无差异。结论 此积分法能可靠测定酶活性 V_m/K_m 或 V_m。

人血清芳香酯酶(arylesterase, ArE, EC 3.1.1.2)活性对心血管和肝脏疾病有诊断价值[1]。在底物浓度为 K_m 的8%时,我们用以反应时间为自变量的积分速度方程的简化形式拟合血清ArE反应曲线,成功测定其活性(此法即积分法)[2]。此简化积分法测定精度与初速度法相当,对多种系统误差有抗性,底物用量比初速度法显著减少而测定上限却提高数倍。快速简便地测定 V_m/K_m 对筛选某些已知抑制机制的酶抑制剂类药物也是必需的[3]。因此,完善和确立此积分法有重要意义。

当定量灵敏度有限时,只有适度升高底物浓度,并用完整的而非简化的积分速度方程拟合酶反应曲线,才能用积分法测定酶活性。但此策略从未见报道。人血清ArE水解酚乙酸酯基本为均一酶单底物动力学[2]。本研究仍以人血清ArE为模型,通过拟合分析计算机模拟和实验测定的ArE反应曲线,考察在底物浓度高于10% K_m 时,用以反应时间为自变量的完整积分速度方程拟合反应曲线测定ArE活性的可靠性。

1 材料与方法

1.1 试剂和材料

酚乙酸酯购自Aldrich。三羟基氨基甲烷(Tris)和 $CaCl_2$ 为国产分析纯。水重蒸。健康人血清收集于重医附一院检验科。4 ℃存放,5 d内测定。

基金项目:国家自然科学基金青年基金资助项目(30200266)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30200266)
作者简介:廖 飞(1969-),男,四川省盐亭县人,硕士,副教授,主要从事酶动力学、酶结构和功能关系、酶抑制剂类药物的合理设计和筛选方面的研究,发表论文16篇。电话:(023)68485073
收稿日期:2002-08-01;修回日期:2003-02-13

1.2 芳香酯酶反应体系

除了pH降为7.4以减少底物自发水解,且底物浓度随需要变化外,其余条件与前相同[2]。反应缓冲液预热到(25±0.3)℃。用752型分光光度计在270 nm测定苯酚生成。加入底物启动反应15 s后,以10 s间隔记录光吸收变化,直到其变化速度降到反应开始时的1/10(通常启动反应30 s后底物消耗小于20%)。所有实验反应曲线都在12 min内测定完毕。

1.3 理论基础和数据处理方法

单底物不可逆酶反应速度方程可积分成

$$In(S_0/S_i)+(S_0-S_i)/K_m=(V_m/K_m)\times t_i \quad ①$$

S_0 为初始底物浓度。实验所用最高酚乙酸酯浓度时,非酶水解反应导致的光吸收变化仍小于0.001/min,故可忽略不计。取 A_i 为特定反应时刻产物光吸收,A_m 为最大产物光吸收(均含本底)。测定本底(A_b,主要为蛋白质在270 nm吸收)。ArE的 K_m 为1.0 mmol/L,苯酚摩尔吸收系数(ε)为1.31 $mmol/L^{-1}\cdot cm^{-1}$[2]。在光吸收和苯酚浓度呈正比的范围内(实验中设定光吸收小于0.950),Equ①可以转变成:

$$In[(A_m-A_b)/(A_m-A_i)]+(A_i-A_b)/(\varepsilon\times K_m)=(V_m/K_m)\times t_i \quad ②$$

取Equ[2]的左边部分为 y_i,即按下式进行数据转换:

$$y_i=In[(A_m-A_b)/(A_m-A_i)]+(A_i-A_b)/(\varepsilon\times K_m) \quad ③$$

取光吸收随机误差为定值,按误差传递确定 y_i 的误差,则 y_i 的加权因子(Wi^2)为[2]

$$W_i^2=[(A_m-A_i)/(\varepsilon\times K_m+A_m-A_i)]^2 \quad ④$$

以与初始底物浓度对应的 A_m 为参数而 K_m 为常数进行数据转换,按Equ⑤

$$y_i=a+b\times t_i \quad ⑤$$

非线性最小二乘加权拟合酶反应曲线,以 F 检验确定拟合优度,就可得 V_m/K_m(Equ⑤中的系数b),用设定 K_m 换算可得 V_m[2]。

1.4 反应曲线的模拟和计算机程序设计

按Equ②用给定的ε、S_0 和 V_m/K_m,以Newton-Raphson法计算反应进行到不同时刻对应的产物光吸收(精度为0.001)。随机迭加恒定光吸收误差得模拟的反应曲线(如未说明,起点底

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

物消耗为20%)。

所需程序参照以前用 Qbasic 4.5 编写[2]。被分析的模拟和实验测定曲线中光吸收之差大于0.003的数据量都不少于5点。模拟时每组参数进行400次模拟和分析。

1.5 统计学分析方法

模拟和实验测定结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,配对 t 检验和方差分析。

2 结果

2.1 反应曲线起点误差和本底对测定 V_m/K_m 的影响

将底物为0.20和0.60 mmol/L的模拟曲线整体沿时间轴往前或朝后移动5 min,所得 V_m/K_m 无差异($\nu=9$, $P>0.50$)。拟合分析上述条件下叠加不同本底(低于真实 A_m 的1/3)的反应曲线,发现酶活性对应的 V_m/K_m 从0.100到2.000/min均不受本底影响($\nu=9$, $P>0.2$)。对于实验测定反应曲线的拟合分析,发现对应的本底和反应起点误差对测定结果也无显著影响(数据未给)。

2.2 反应曲线数据覆盖范围和底物浓度对 V_m/K_m 的影响

拟合分析模拟反应曲线表明,底物消耗比例高于70%时,随底物浓度从0.10 mmol/L升高到0.60 mmol/L,所得 V_m/K_m 无差异($P>0.05$);给定底物浓度后终点底物消耗比例从70%升高到95%,所得 V_m/K_m 变异系数降低($P<0.05$);固定终点底物消耗比例,升高底物浓度也使所得 V_m/K_m 的变异系数逐步降低。随机误差从0.001增大到0.003后这种变化趋势仍然存在。

分析0.20 mmol/L底物消耗95%以上的实验反应曲线,固定终点底物消耗为70%、80%、90%或95%,拟合分析起点为第二个记录数据时所得 F 值总比起点为第一个记录数据所得 F 值大($P<0.01$,各自配对 t 检验,$\nu=3$),但所对应的 V_m/K_m 无差异($P>0.05$)。分析扣除本底后从第二个记录数据开始的所有数据对应 V_m/K_m 为0.460/min的实验反应曲线,随终点底物消耗比例从70%增加到95%,所得 V_m/K_m 从0.448/min增加到0.460/min;将终点底物消耗固定在95%,起点底物消耗比例从25%升高到80%时,V_m/K_m 从0.456/min增加到0.486/min,变化都小于4%。

表1 底物浓度对测定 ArE 活性($\bar{x}\pm s$)的影响

底物浓度 (mmol/L)	V_m/K_m(min^{-1})	
	实验测定 (ν)	对应模拟测定
0.10	0.661±0.034 (3)	0.661±0.036
0.20	0.653±0.023 (3)	0.662±0.022
0.30	0.555±0.021 *(6)	0.660±0.014 #
0.40	0.502±0.028 *(4)	0.663±0.008 #
0.60	0.366±0.021 *(6)	0.662±0.004 #

*:与0.10 mmol/L比较,$P<0.05$;#:与0.10 mmol/L比较(模拟测定),$P<0.05$;实验时底物消耗85%。模拟时 V_m/K_m 为0.660/min,随机误差0.001,底物消耗80%

用0.20和0.60 mmol/L酚乙酸酯,实验测定 V_m/K_m 变异系数都不超过5.8%($\nu=6$)。用50 mmol/L的Tris-HCl缓冲液,相同量ArE的活性(V_m/K_m)在底物浓度高于0.20 mmol/L后随底物浓度增加持续下降,见表1。把Tris-HCl浓度升高到200 mmol/L(pH和钙离子都不变),其下降比例相同(数据未给)。

2.3 V_m/K_m 对酶量的响应和检测限

以连续五点光吸收差大于0.003为可靠测定 V_m/K_m 前提,测定标准差的两倍为下限,被考察点与预测值的偏离小于测定标准差两倍为上限。底物为0.10 mmol/L时模拟分析的最大可测 V_m/K_m 为3.100/min,ArE活性小于2.400/min的响应曲线斜率为0.989,测定标准差为0.022/min,线性响应上限为2.800/min;0.20 mmol/L底物时,最大可测 V_m/K_m 为4.100/min,ArE活性小于3.200/min的响应曲线斜率为0.990,测定标准差为0.015/min,线性响应上限为3.700/min。

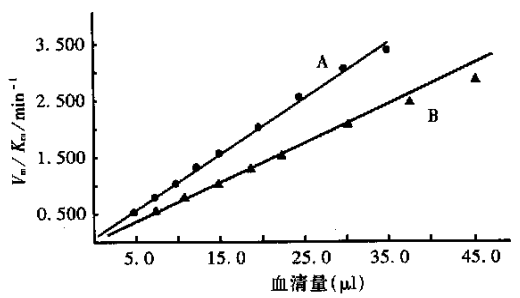


图1 实验测定 ArE 活性 V_m/K_m 对酶量的响应

考察实验反应曲线发现,ArE活性(V_m/K_m)在0.20 mmol/L底物时最大实验可测值为3.280/min,在0.10 mmol/L底物时最大可测值为2.713/min。底物为0.20 mmol/L时,V_m/K_m 小于2.600/min的响应曲线测定标准差为0.037/min,上限为2.939/min(图1A)。底物为0.10 mmol/L时,V_m/K_m 小于2.130/min的响应曲线测定标准差为0.053/min,上限为2.485/min。

2.4 样品测定

用此积分法在0.20 mmol/L酚乙酸酯测定86份健康人血清ArE活性。在2.0 ml反应体系中加入7.5μl未稀释血清,反应曲线通常只需要在4 min内记录。拟合分析所得 V_m/K_m 为(1.16±0.27)/min,基本呈正态分布。以 K_m 为1.0 mmol/L计算,最大反应速度 V_m 为(310±71) mmol/min每升血清。用1.0 mmol/L的酚乙酸酯测定这些血清中ArE初速度(血清稀释20倍,在2.0 ml反应体系加入30.0μl稀释后的血清),其活性为(0.102±0.028) mmol/min,也呈正态分布。两种方法测定相同ArE的活性高度正相关($\nu=85$,相关系数 $R>0.94$,$P<0.001$)。用1.0 mmol/L底物测得血清ArE初速度为(154±40) mmol/min每升血清。用米氏方程按相同 K_m 和1.0 mmol/L底物计算,初速度法对应 V_m 为(312±82) mmol/min每升血清。按 V_m 进行比较,两种方法测定ArE活性的均值和标准差都无显著性差异($P>0.05$)。

3 讨论

Equ①描述酶的稳态反应过程。用酚乙酸酯为底

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

物测定血清 ArE 时杂酶活性非常低, 故 ArE 水解酚乙酸酯反应曲线可用 Equ①拟合分析。分析不同延迟时间实验反应曲线所得 F 值的差异表明 ArE 反应在启动后需要 30 s 以上才达到稳态。将初始底物浓度作为参数可消除其误差及本底对积分法测定参数的影响[2]。模拟与实验分析都表明, 以初始底物浓度为参数非线性最小二乘拟合可克服本底的干扰。可见, 此积分法应用时与经典初速度法相同, 都不必独立测定本底和精确确定反应起点。

模拟分析表明用此积分法测定酶活性不受底物浓度影响。实验测定 ArE 活性在 0.10 mmol/L 和 0.20 mmol/L 时与底物浓度无关而和酶量呈正比, 与模拟结果一致。底物浓度高于 0.30 mmol/L 后 ArE 活性下降的原因不明。下降比例不随缓冲离子浓度变化, 表明不是由反应过程中 pH 改变造成。推测此现象可能与产物苯酚积累有关。此积分法测定 ArE 时上限随底物浓度升高, 血清无须稀释, 而样品测定所需时间与初速度法接近, 可见此法效率更高, 适度升高底物浓度更有利于发挥此积分法的优势。初速度法测定的酶活性只有换算成 V_m 才可与积分法测定的酶活性(V_m)比较。按 V_m 比较, 在底物为 K_m 的 20%时用积分法测定人血清 ArE 活性与经典初速度法测定的 ArE 活性一致, 表明在此底物浓度下用积分法测定酶活性仍是可靠的。

经典积分法用以 为自变量且对 K_m 和 V_m 为线性的积分速度方程拟合酶反应曲线[4]。此自变量含有来自实验测定数据(底物浓度)的误差, 且分布范围很窄, 方程统计合理性低。最小二乘拟合时所用方程自变量的误差会降低所测定参数精度[5]。本研究所用的 Equ①中自变量为反应时间, 基本无误差且分布范围宽, 方程统计合理性高, 这可能是此新的积分法能可靠测定酶活性且对系统误差有抗性的主要原因。此积分法测定酶活性底物用量少, 系统误差影响小, 上限远比初速度法高。因此, 对于定量灵敏度较低的酶反应体系, 只要酶反应曲线便于连续测定, 适度升高底物浓度后用以反应时间为自变量的完整积分速度方程拟合酶反应曲线, 仍能可靠测定酶活性, 且可进一步提高测定上限。此方法有望用于临床检验等领域。

关键词: 血清酶活性; 积分法; 反应曲线; 非线性最小二乘拟合; 芳香酯酶

中图法分类号: Q556.1; R446.1　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Laplaud P M, Dantoine T, Chapman M J. Paraoxonase as a risk marker for cardiovascular disease: facts and hypotheses[J]. Clin Chem Lab Med, 1998, 36(7): 431－441.

[2] Liao F, Liu W L, Zhou Q X, *et al*. Assay of serum arylesterase activity by fitting reaction curve with an integrated rate equation[J]. Clin Chim Acta, 2001, 314(1－2): 67－76.

[3] Meyer-Almes F J, Auer M. Enzyme inhibition assays using fluorescence correlation spectroscopy: a new algorithm for the derivation of K cat/KM and Ki values at substrate concentrations much lower than the Michaelis constant[J]. Biochemisty, 2000, 39(43): 13261－13268.

[4] Atkins G L, Nimmo I A. The reliability of Michaelis constants and maximum velocities estimated by using the integrated Michaelis-Menten equation[J]. Biochem J, 1973, 135(4): 779－784.

[5] del Rio F J, Riu J, Rius F X. Robust linear regression taking into account errors in the predictor and response variables[J]. Analyst, 2001, 126(7): 1113－1117.

（编辑　薛国文）

（上接 922 页）

吸入气道内, 可吸收水分, 使雾粒增大, 促进沉积, 改善气道干燥, 促进纤毛运动, 有利粘稠痰液排出及粘膜消肿。雾化吸入组患者异烟肼雾化液经高频振动加压雾化后, 除缓解其咳嗽症状外, 排痰量明显较平时增多, 双肺哮鸣音明显减少, 呼吸困难明显减轻。

雾化治疗经口呼吸, 行深而慢的呼吸以及吸气末屏气, 增加雾粒重力沉积的机会, 故治疗时应训练患者使用这种呼吸方式, 雾化吸入组患者的刺激性剧烈咳嗽缓解时间较对照组明显缩短, 为病人及早解除痛苦。

本组资料表明浸润型支气管内膜可能尚处于早期发病阶段, 支气管粘膜充血水肿, 病灶未侵及肌层, 故及时采用抗结核治疗辅以高频振动加压雾化, 防止或减轻气道狭窄的发生, 可使雾化吸入组气道完全恢复正常, 对照组亦大部分气道恢复正常; 但以瘢痕狭窄为主的支气管内膜结核两组无差别, 说明该疗法不能改变已狭窄的支气管。综上所述, 异烟肼高频振动加压雾化能缩短支气管内膜结核患者剧烈咳嗽的缓解时间, 有效促进炎症浸润型为主的支气管内膜结核的恢复, 改善溃疡型及增殖型为主的支气管内膜结核向瘢痕狭窄型转化, 减轻肺毁损, 改善预后。

关键词: 支气管内膜结核

中图法分类号: R523.053　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 王　蓉, 刘昌起. 第一届全国纤维支气管镜学术会议纪要[J]. 中华结核和呼吸杂志, 1994, 17(6): 326－328.

[2] Watanabe Y, Murakami S, Oda M, *et al*. Treatment of bronchial stricture due to endobronchial tuberculosis[J]. World J Surg, 1997, 21: 480－487.

（编辑　陈聪连）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net