

溶血栓酶活性测定的一种新方法*

谢秋玲** 林剑 张玲

(暨南大学生物工程研究所, 广州 510632)

摘要 根据血栓溶解会引起吸光度下降的特性, 在细胞培养板上制作小血栓, 利用酶标仪同时检测多个样品的吸光度变化. 发现反应初期, 血栓吸光度的降低同时间呈线性关系, 其回归方程的斜率 k 与酶活性成正比. 因此可用 k 来表示酶活性. 此方法与蛋白凝块溶解时间法 (CLT 法) 相关性很好. 该法省时, 成本低, 是一种较好的、实用的检测溶血栓酶活性的方法.

关键词 溶血栓活性, 尿激酶, 活性测定

学科分类号 Q55

一些具有溶血栓性质的酶, 如尿激酶、纤溶酶、tPA 及纳豆激酶的酶活性检测方法, 最为常用的有两种: 一种是纤维蛋白平板法, 一种是蛋白凝块溶解时间法 (CLT 法)^[1,2]. 前者用血栓平板上的溶解面积来表示酶的活性, 其缺点是恒温时间长, 精度低; CLT 法则以凝块溶解时间作为衡量标准, 目前许多生产尿激酶的厂家就是以此法测定酶活力, 比之平板法, CLT 法迅速快捷, 有较大的分辨率, 但随着灵敏度的提高, 溶解时间的判断也更加困难, 同时测定多个样品难以做到.

近年来也发展了其他测活方法, 如酶联免疫吸附法 (ELISA)^[3]. 该法灵敏度、特异性都很高, 但操作复杂, 成本高. 也有人根据纤维蛋白溶解导致吸光度下降的特性, 而用 A 值变化来表示酶的活性^[4].

本试验尝试在细胞培养板上制作小血栓, 用酶标仪同时测定多个样品 A_{630} 值的变化.

1 材料与方法

1.1 标准尿激酶、凝血酶、纤维蛋白溶酶原、纤维蛋白原 均购自中国药品检定研究所. 酶标仪为 EL311 Auto Reader.

1.2 CLT 法测定酶活性

按照中华人民共和国药典 (二部) 有关尿激酶的测定方法^[5].

1.3 酶标仪法测定酶活性

按照 CLT 法在 96 孔板各小室内制作小血栓, 其中加入的标准尿激酶也同 CLT 法一样按相同梯度稀释. 每隔一定时间测量各小室内的吸光度

A_{630} .

2 结果与讨论

2.1 时间与 $-A_{630}$ 之间的关系

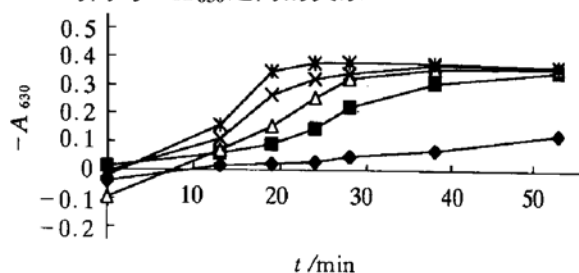


Fig. 1 The relationship of UK activity and $-A_{630}$

◆ —◆: 6 U/ml; ■ —■: 12 U/ml; △ —△: 18 U/ml;
× —×: 24 U/ml; * —*: 30 U/ml.

由图 1 可看出, 在反应初期, 时间与 $-A_{630}$ 之间是呈线性关系的, 但随着时间的延长, 尿激酶含量高的组, $-A_{630}$ 值不再线性增长, 而趋于平缓, 尿激酶浓度达到 30 U/ml 的一组, 其 $-A_{630}$ 在后期甚至有减小的现象. 这是一个酶反应的弛豫过程, 一个不平衡的反应体系逐渐趋向平衡, 达到平衡后产物量不再发生变化. 酶活性越大, 达到平衡的时间越短, 其速率应与酶活性呈线性关系.

因此, 以反应初期的 $-A_{630}$ 与 t 作线性回归, 得出回归方程及斜率 k 如下:

* 暨南大学博士启动基金资助.

** 通讯联系人.

Tel: 020-85220220-17, E-mail: x_qiuling@163.net

收稿日期: 2000-07-04, 接受日期: 2000-08-23

$$6 \text{ U/ml: } y = 0.0030x - 0.0370 \quad r^2 = 0.9827$$

$$12 \text{ U/ml: } y = 0.0072x - 0.0112 \quad r^2 = 0.9381$$

$$18 \text{ U/ml: } y = 0.0129x - 0.0857 \quad r^2 = 0.9606$$

$$24 \text{ U/ml: } y = 0.0135x - 0.0216 \quad r^2 = 0.9594$$

$$30 \text{ U/ml: } y = 0.0176x - 0.0322 \quad r^2 = 0.9642$$

由上可看出, 随着尿激酶活性的增大, k 值也增大.

2.2 斜率与尿激酶活性之间的关系

图2显示, 斜率 k 与尿激酶活性之间有线性关系. 因此用斜率 k 可以表示尿激酶的酶活性.

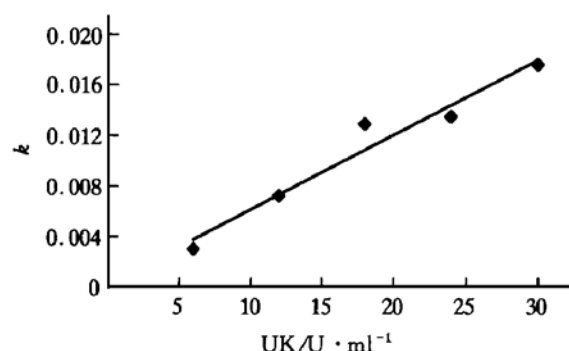


Fig. 2 The relationship of UK activity and k

$$y = 0.0006x + 0.0002, \quad r^2 = 0.9567.$$

2.3 酶标仪法与 CLT 法的比较

图3显示了两种方法相关性很好, 也即说明, 酶标仪法用来检测溶血栓酶活性是一种可行的方法. 但应注意两点: a. 样品的添加顺序. 本法先加入溶血栓酶, 最后加入凝血酶, 在 30 min 内完成; 日本原敏夫等则最后加入溶血栓酶, 在 4 h 内完成. 所以本法更为迅速简便. b. 反应 0 时, 各样品的吸光度之间的差值不能过大, 否则不能用 k 值来表示酶活性. 这就需要样品的纯度越高越好,

或者尽量降低样品量, 以减少杂质的影响. 这也说明了酶标仪法的灵敏性较高, 所用试剂和样品量小, 节省成本.

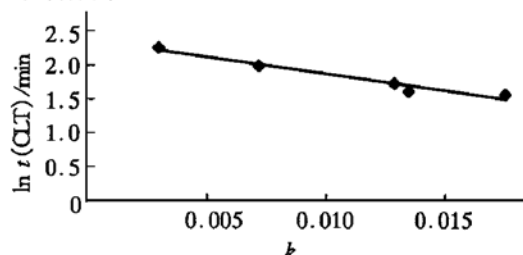


Fig. 3 The relationship of k and $\ln t$

$$y = -49.182x + 2.3637, \quad r^2 = 0.956.$$

参 考 文 献

- 1 Ploug J, Kjeldgaard N O. Urokinase: an activator of plasminogen from human urine. *Biochim Biophys Acta*, 1957, **24** (2): 278 ~ 282
- 2 须见洋行, 中岛伸佳, 田谷直俊. 血栓溶解酵素 ナフトウ キーゼの活性測定法. *J Brew Soc Japan*, 1993, **88** (6): 482~ 486
Sumi H, Nakajima N, Taya N. *J Brew Soc Japan*, 1993, **88** (6): 482~ 486
- 3 Yukiv Y, Nakagawa T, Fujita M, *et al.* A sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for nattokinase. *Biosci Biotech Biochem*, 1994, **58** (2): 366~ 370
- 4 原敏夫, 田所优子, 里山俊哉. マイクロプレートによる簡便な血栓溶解酵素活性測定法. *日本食品科学杂志*, 1996, **43** (2): 172~ 175
Hara T, Tadokoro Y, Satoyama T. A simple, easy and routine assay of thrombolytic enzyme activity. *J Food Sci Japan*, 1996, **43** (2): 172~ 175
- 5 中华人民共和国卫生部药典委员会编. 中华人民共和国药典 (二部). 北京: 化学工业出版社, 广东科技出版社, 1995. 320~ 321
The Pharmacopoeia Committee of the Ministry of Public Health of the People's Republic of China. *The Pharmacopoeia of People's Republic of China (section 2)*. Beijing: Chemical Industry Press & Science Technology Press of Guangdong, 1995. 320~ 321

A New Assay of Fibrinolytic Enzymes*

XIE Qiu-Ling**, LIN Jian, ZHANG Ling

(Bioengineering Institute of Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract Based on the decline of A_{630} with the clot lyses, the $-A_{630}$ of many samples was detected at the same time with EL311 Auto Reader. It was found that the A_{630} declined linearly with time, and k under different dillutions could reflect the fibrinolytic activity of enzyme. This method costs less time, less reagent and correlated with CLT very well, indicating it was a good and useful method for determination of fibrinolytic enzymes.

Key words fibrinolytic activity, urokinase, activity assay

* This work was supported by Ph. D Initiative Fund of Jinan University.

** Corresponding author. Tel: 86-20-85220220-17, E-mail: x_qiuling@163.net

Received: July 4, 2000 Accepted: August 23, 2000