



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108588044 A

(43)申请公布日 2018.09.28

(21)申请号 201810306747.8

(22)申请日 2018.04.08

(71)申请人 山东博科生物产业有限公司

地址 250200 山东省济南市章丘明水经济开发区(经十东路与明埠路交界山东博科产业园)

(72)发明人 罗维晓 魏海明 王美丽 胡晓飞

(51)Int.Cl.

C12N 9/04(2006.01)

C12N 9/18(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页 附图3页

(54)发明名称

一种PEG修饰胆固醇氧化酶和胆固醇脂酶的制备方法

(57)摘要

本发明涉及一种PEG修饰胆固醇氧化酶和胆固醇脂酶的制备方法,属于临床体外检测技术领域,其基本步骤为首先配置缓冲液,然后加入对氨基苯磺酸和AEO-9两种物质作为激活剂,然后加入载体PEG20000(sigma),再加入保护剂以及乳化剂和离子物质搅拌均匀后,依次加入胆固醇氧化酶和胆固醇脂酶,慢中速搅拌10分钟,然后使用低转速离心机离心后,取出上清液即可得到同等效果的PEG修饰酶。配方组成成分:PIEPES、对氨基苯磺酸、AEO-9、PEG20000、保护剂、乳化剂、离子物质、胆固醇氧化酶、胆固醇脂酶、MIT,本方法操作简单、成本低,与PEG修饰酶法检测高密度脂蛋白胆固醇具有良好的兼容性。

试剂检测方法

加入物	空白管	标准管	测定管
R1	200μL	200μL	200μL
激活剂	4μL		
缓冲液		4μL	
标准			4μL
混合,置37℃预孵育5分钟,记录吸光度A1			
R2	200μL	100μL	100μL
混匀,在波长560nm,反应5分钟后,记录A2,计算ΔA			

计算: $33BL-C \text{ 含量} (\mu\text{mol/L}) = (\Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准}) \times C \text{ 标准}$

1. 一种PEG修饰胆固醇氧化酶和胆固醇脂酶的制备方法如下:

1) 基本原理:以PEG20000为载体,在激活剂以及离子物质的存在的情况下,使胆固醇氧化酶和胆固醇脂酶与PEG20000之间形成离子键,以获取具有对脂蛋白具有选择性的PEG修饰酶;

2) 基本步骤:

首先配置缓冲液,然后加入对氨基苯磺酸和AEO-9两种物质作为激活剂,然后加入载体PEG20000(sigma),再加入保护剂以及乳化剂和离子物质搅拌均匀后,依次加入胆固醇氧化酶和胆固醇脂酶,慢中速搅拌10分钟,然后使用低转速离心机离心后,取出上清液即可得到同等效果的PEG修饰酶;

3) 配方组成成分:

PIEPES	100mmol/L PH=7.0
对氨基苯磺酸	5mmol/L
AEO-9	1.2g/L
PEG20000(sigma)	5G/L
保护剂	2ml/L-3ml/L
乳化剂	1ml/L-3 ml /L
离子物质	3g/L-5g/L
胆固醇氧化酶	3KU/1
胆固醇脂酶	1KU/1
MIT	0.5g/L-1g/L。

2. 根据权利要求1所述的一种PEG修饰胆固醇氧化酶和胆固醇脂酶的制备方法,其特征在于试剂中所选择的酶结合载体为PEG20000。

3. 根据权利要求1所述的一种PEG修饰胆固醇氧化酶和胆固醇脂酶的制备方法,其特征在于试剂R1所述PEG激活剂为对氨基苯磺酸和AEO-9。

4. 根据权利要求1所述的一种PEG修饰胆固醇氧化酶和胆固醇脂酶的制备方法,其特征在于所述乳化剂为曲拉通-100。

5. 根据权利要求1所述的一种PEG修饰胆固醇氧化酶和胆固醇脂酶的制备方法,其特征在于所述离子物质为氯化钠。

6. 根据权利要求1所述的一种PEG修饰胆固醇氧化酶和胆固醇脂酶的制备方法,其特征在于所述保护剂为磷脂血清。

一种PEG修饰胆固醇氧化酶和胆固醇脂酶的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种PEG修饰胆固醇氧化酶和胆固醇脂酶的制备方法,属于临床体外检测技术领域。

背景技术

[0002] PEG修饰酶法检测血清高密度脂蛋白胆固醇,由1995年Sugiuchi首先提出,属于均相法检测血高密度脂蛋白胆固醇的一种重要的方法,其方法的反应原理为试剂1中硫酸 α -环糊精、硫酸葡聚糖与标本中的LDL、VLDL及CM形成水溶性复合物。试剂2中PEG修饰酶系对HDL发生反应,从而达到检测目的。本法原理着重点在于:①硫酸 α -环糊精对富含apoB的LDL组分产生一种屏蔽作用;②PEG修饰酶中的PEG分子产生空间位阻,不利于大分子底物与酶接触,而又不影响小分子的HDL与酶发生酶促反应;③试剂2中的表面活性剂在不影响硫酸 α -环糊精-LDL复合物的基础上能使HDL快速充分溶解。上述三点充分保证HDL测定的特异性和准确性。本法试剂非常优良,与CDC指定的比较方法具有非常好的相关性,本法能够实现HDL充分、快速反应,对LDL的非特异性反应极少,抗干扰能力较强,结果较准确。

[0003] 但因技术难度较大,国内尚无产品问世,技术问题主要存在于修饰酶的合成与表面活性剂的筛选,其中最难以控制的就是PEG修饰酶的制备,Sugiuchi建立的方法为首先将PEG6000使用N-羟基琥珀酰亚胺和二环己基碳二亚胺(DCCI)进行活化,将胆固醇氧化酶和胆固醇脂酶,加入到0.1mol/L的HEPES PH=8.5的缓冲液,溶解完全后,将活化的PEG6000加入到酶溶液中,令PEG6000与酶通过共价键结合在一起,至少需要30分钟的时间,然后将PEG6000使用滤网将其过滤掉,然后使用HPLC方法进行检测结合后的酶的活性,作者通过大量的实验发现,本方法存在以下几个问题:①在PEG6000与酶结合的过程中,即使是PEG6000非常过量,但是也有少量的酶类没有被结合,这就在使用的时候为修饰酶的特异性增加了难度;②所激活PEG6000的两种物质,如果清理不当,会对后面HDL-C的检测造成影响,③如果没有结合酶的PEG过滤不够彻底,则会造成结果HDL-C的检测不准确,④修饰酶的过程过于繁杂,需要很高的技术和实验水平,修饰酶的获取成本高。

[0004] 因此基于以上的条件制约,影响了PEG-修饰酶法这种非常优良的检测方法的普及和推广,因此根据这些问题,发明了一种PEG修饰胆固醇氧化酶和胆固醇脂酶的制备方法。

发明内容

[0005] 本发明涉及一种PEG修饰胆固醇氧化酶和胆固醇脂酶的制备方法。

[0006] 本发明是通过以下步骤得到的:

1) 基本原理:以PEG20000为载体,在激活剂以及离子物质存在的情况下,使胆固醇氧化酶和胆固醇脂酶与PEG20000之间形成离子键,以获取具有对脂蛋白具有选择性的PEG修饰酶;

2) 基本步骤:

首先配置缓冲液,然后加入对氨基苯磺酸和AEO-9两种物质作为激活剂,然后加入载体

PEG20000 (sigma), 再加入保护剂以及乳化剂和离子物质搅拌均匀后, 依次加入胆固醇氧化酶和胆固醇脂酶, 慢中速搅拌10分钟, 然后使用低转速离心机离心后, 取出上清液即可得到同等效果的PEG修饰酶;

3) 配方组成成分:

PIEPES	100mmol/L PH=7.0
对氨基苯磺酸	5mmol/L
AE0-9	1.2g/L
PEG20000 (sigma)	5G/L
保护剂	2ml/L-3ml/L
乳化剂	1ml/L-3 ml /L
离子物质	3g/L-5g/L
胆固醇氧化酶	3KU/1
胆固醇脂酶	1KU/1
防腐剂	0.5g/L-1g/L。

[0007] 所述的一种PEG修饰胆固醇氧化酶和胆固醇脂酶的制备方法, 试剂中所述保护剂为磷脂血清;

所述的一种PEG修饰胆固醇氧化酶和胆固醇脂酶的制备方法, 试剂所述乳化剂为曲拉通-100;

所述的一种PEG修饰胆固醇氧化酶和胆固醇脂酶的制备方法, 试剂所述离子物质为氯化钠;

所述的一种PEG修饰胆固醇氧化酶和胆固醇脂酶的制备方法, 试剂所述防腐剂为MIT。

[0008] 本发明的创新之处如下:

1) 本发明建立其一种操作简单的获取PEG修饰胆固醇氧化酶和PEG修饰胆固醇脂酶的制备方法, 由原来的共价结合, 改为离子结合;

2) 在试剂中选取了分子量较大的PEG20000作为载体, 即使是有未被活化的PEG20000加入到试剂中也不会造成影响试剂的反应;

3) 在试剂中加入对氨基苯磺酸和AE0-9能够较好激活PEG20000, 且不会对酶活性以及高密度脂蛋白胆固醇的检测造成影响;

4) 乳化剂曲拉通100和氯化钠则能增加酶与激活后的PEG20000的结合;

5) 磷脂血清则能够提高产品PEG-修饰酶的稳定性, 而MIT防腐剂的选择则能够较好的抑制细菌的生长。

附图说明

[0009] 图1 为实施例3试剂检测方法;

图2 为实施例1与和实施例2分别与对照组PEG修饰酶检测结果比较;

图3 为实施例1与对照组PEG修饰酶相关性;

图4 为实施例2与对照组PEG修饰酶相关性。

具体实施方式

[0010] 下面结合实施例对本发明作进一步的说明：

实施列1

一种PEG修饰胆固醇氧化酶和胆固醇脂酶的制备方法。

[0011] 1) 基本步骤：

首先配置缓冲液,然后加入对氨基苯磺酸和AEO-9两种物质作为激活剂,然后加入载体PEG20000(sigma),再加入保护剂以及乳化剂和离子物质搅拌均匀后,依次加入胆固醇氧化酶和胆固醇脂酶,慢中速搅拌10分钟,然后使用低转速离心机离心后,取出上清液即可得到同等效果的PEG修饰酶。

[0012] 2) 配方组成成分：

PIEPES	100mmol/L PH=7.0
对氨基苯磺酸	5mmol/L
AEO-9	1.2g/L
PEG20000(sigma)	5G/L
磷脂血清	2ml/L
曲拉通-100	1ml/L
氯化钠	3g/L
胆固醇氧化酶	3KU/1
胆固醇脂酶	1KU/1
MIT	0.5g/L。

[0013] 实施例2

本实施例描述的是一种原料增加后的新型的PEG修饰胆固醇氧化酶和PEG修饰胆固醇脂酶的制备：

制备步骤：

1) 首先配置缓冲液,然后加入对氨基苯磺酸和AEO-9两种物质作为激活剂,然后加入载体PEG20000(sigma),再加入保护剂以及乳化剂和离子物质搅拌均匀后,依次加入胆固醇氧化酶和胆固醇脂酶,慢中速搅拌10分钟,然后使用低转速离心机离心后,取出上清液即可得到同等效果的PEG修饰酶。

[0014] 2) 配方组成成分：

PIEPES	100mmol/L PH=7.0
对氨基苯磺酸	5mmol/L
AEO-9	1.2g/L
PEG20000(sigma)	5G/L
磷脂血清	3ml/L
曲拉通-100	3 ml /L
氯化钠	5g/L
胆固醇氧化酶	3KU/1
胆固醇脂酶	1KU/1
MIT	1g/L。

[0015] 实施例3

本实施例描述的是将实施例1、2方法获取的PEG修饰酶与Sugiuchi方法获取的PEG修饰酶进行临床应用检测结果比较。

1) 配置PEG修饰酶方法的高密度脂蛋白检测试剂配置方案：

本方案为双试剂：

试剂R1：MOPS缓冲液30mmol/L, PH7.0； α -环状葡聚糖硫酸盐0.5mmol/L；硫酸葡聚糖0.5g/L；氯化镁 2mmol/L；EMSE 0.3g/L。

[0016] 试剂R2：MOPS缓冲液30mmol/L, PH7.0；PEG修饰胆固醇酯酶1KU/L；PEG修饰胆固醇氧化酶5KU/L；过氧化物酶30KU/L；4-AA 0.5g/L。

[0017] 2) 检测比较：

将实施例1和实施例2作为实验组，以Sugiuchi方法描述制备的PEG修饰酶作为对照组，按照PEG修饰酶法高密度脂蛋白胆固醇检测试剂的配置方法，作为原材料加入使用，在使用时采用具有双试剂功能的全自动生化分析仪，如日立7180全自动分析仪等，利用终点法进行测定。将试剂R1和R2按照3:1的比例放置到对应的试剂位上，在样品盘的对应位置放置好蒸馏水、标准品和样本，具体操作方法见图1。

[0018] 将实施例1、2方法获取的PEG修饰酶和对照组PEG修饰酶，分别配置成高密度脂蛋白胆固醇检测试剂，进行40个临床样本的检测比对，其对比检测的结果见图2。结果发现相对偏差在10%以内，实施例1与和实施例2分别与对照组的相关系数分别为： $R_1=0.9980$ 和 $R_2=0.9977$ ，结果如图3、图4，这说明具有非常好的相关性。

试剂检测方法

加入物	空白管	标准管	测定管
R1	300 μ L	300 μ L	300 μ L
蒸馏水	4 μ L		
标准液		4 μ L	
标本			4 μ L
混合，置 37℃ 预孵育 5 分钟，记录吸光度 A1			
R2	100 μ L	100 μ L	100 μ L
混匀，在主波长 546nm，反应 5 分钟后，记录 A2，计算 ΔA 。			

计算：HDL-C 含量 (mmol/L) = (ΔA 测定 \div ΔA 标准) \times C 标准。

图1

实施例 1、2 与对照组 PEG 修饰酶检测结果比较

样本号	实施例 1	实施例 2	Sugiuchi 方法获取的 PEG 修饰酶
1	3.56	3.47	3.55
2	0.25	0.24	0.26
3	3.22	3.15	3.19
4	1.45	1.45	1.39
5	2.12	2.15	2.19
6	1.14	1.2	1.18
7	3.52	3.51	3.49
8	1.83	1.61	1.62
9	2.35	2.35	2.39
10	0.19	0.2	0.17
11	1.25	1.2	1.29
12	2.56	2.59	2.59
13	3.69	3.66	3.71
14	0.36	0.35	0.38
15	1.56	1.46	1.51
16	2.56	2.89	2.56
17	1.56	1.52	1.51
18	1.49	1.48	1.46
19	3.69	3.46	3.59
20	4.56	4.52	4.51
21	0.56	0.55	0.52
22	0.28	0.28	0.29
23	1.56	1.52	1.55
24	0.98	0.96	0.98
25	1.56	1.58	1.36
26	4.96	4.98	4.86
27	5.12	5.26	5.08
28	1.75	1.72	1.69
29	1.73	1.71	1.71
30	0.96	0.99	0.99
31	0.78	0.8	0.82
32	3.45	3.55	3.49
33	2.56	2.49	2.5
34	2.55	2.61	2.61
35	1.98	1.99	2.01
36	1.87	1.85	1.91
37	1.56	1.52	1.52
38	1.36	1.38	1.39
39	2.65	2.66	2.68
40	2.45	2.39	2.49

图2

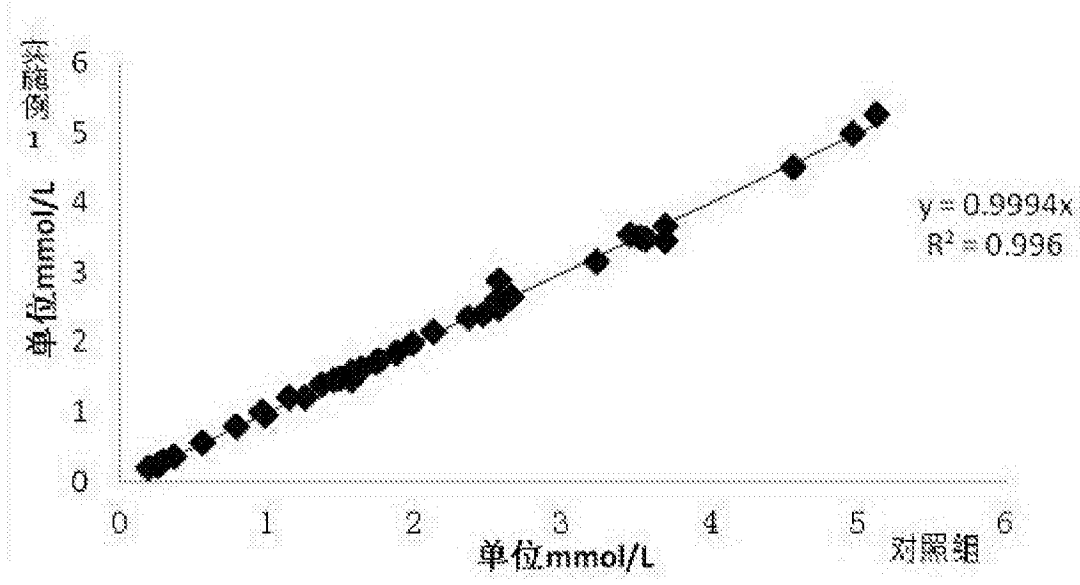


图3

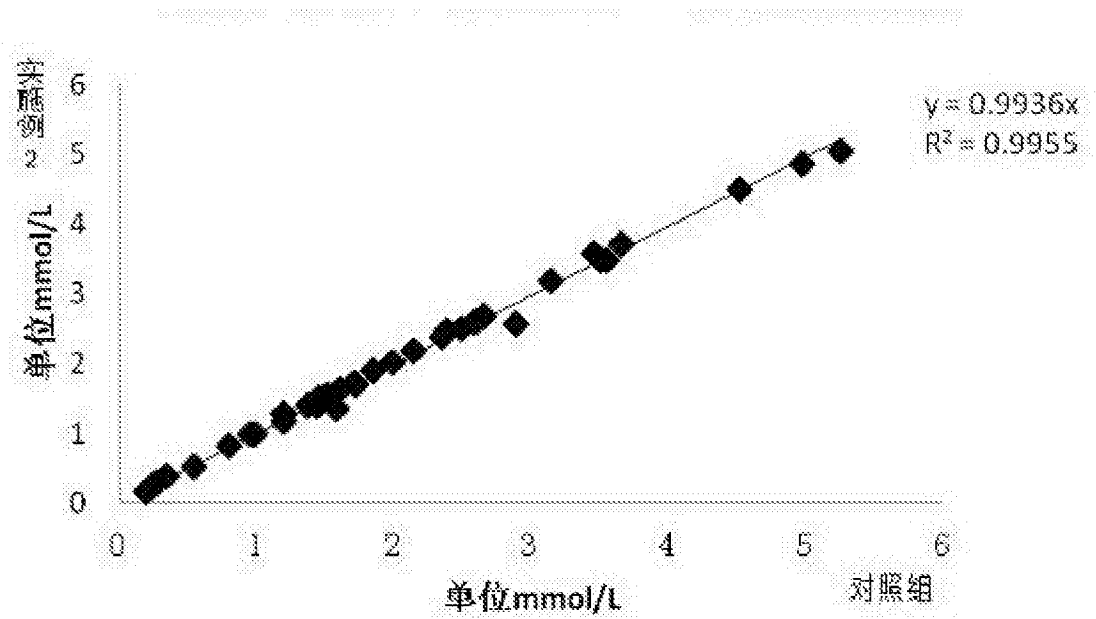


图4