

用荧光底物测定半乳糖 6-硫酸酯酶的简易方法

赵会全 张贵寅 李璞

(哈尔滨医科大学医学遗传研究室)

O. P. van Diggelen W. J. Kleijer

(荷兰鹿特丹大学临床遗传室)

半乳糖 6-硫酸酯酶 (Gal-6S) 是粘多糖贮积症 IVA 型 (MPS IVA) 的缺陷酶。以往, MPS IVA 的酶学诊断均采用同位素标记的放射性寡糖充当底物, 这种底物很不稳定, 在贮存过程中需要反复的纯化才能使用, 很难实行商品化; 而且, 成本较高, 操作程序复杂费时, 严重地限制了 MPS IVA 诊断工作的开展。基于上述种种不利因素, 我们利用市销的 4-甲基伞型酮半乳糖苷 (4 Mu-Gal), 通过硫酸化的原理合成了一种新的荧光底物: 4-甲基伞型酮 6-硫酸半乳糖苷 (4 Mu-Gal-6S)。通过对正常人和 MPS IVA 病人的各种样品进行应用, 证明这种荧光底物是特异的, 并较放射性底物具有许多优点。现将这种荧光底物的制备和应用简述如下。1. 底物的合成: 10 g 4 Mu-Gal 溶于 500 ml 蒸馏过的吡啶中, 加热至 60°C 使其完全溶解。然后, 加入 0.5 g 4-二甲氨基吡啶, 混合后在 0°C 密封条件下搅拌 30 分钟, 再逐滴加入氯磺酸和二氯甲烷的混合物 (1:13) 40 ml, 继续搅拌 3—4 小时后, 移到 25°C 再搅拌 2 小时。加入 100 ml 冷蒸馏水终止上述反应, 在 25°C 下真空干燥。2. 底物的纯化: 溶解上述干粉在 100 ml 蒸馏水中, 离心 (3,000 r/min) 10 分钟

后, 取上清液加在用 10 mM NH_4Ac 平衡的 DEAE 纤维素 (DE_{32}) 离子交换柱上。以大约 1 ml/min/cm² 的流速冲洗后, 逐步用 50、100、200 和 1000 mM 的 NH_4Ac , pH 6.0 进行洗脱。通过在 318 nm 的分光值监测柱子的洗脱, 对高分光值的组分进行冷冻干燥, 得到纯化的底物。3. 底物的检测及应用: 用 0.1 M NaCl/NaAc (pH 4.3) 制成 1 mM 的底物溶液。取待检的样品细胞, 加蒸馏水后进行超声破碎, 然后离心 (12,000 r/min) 10 分钟。取上清液 10 μl 加底物溶液 20 μl , 混合后在 37°C 下温浴 17 小时 (过夜)。用 200 μl 0.5 M $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ (pH 10.7) 终止反应后, 测定游离 4 Mu 的荧光值, 计算酶的活性值。

我们合成的荧光底物 (已经商品化) 相当稳定, 可以长期保存。以此建立的 Gal-6S 测定方法所需仪器简单, 操作方便, 其成本还不足同位素方法的 1%。灵敏度高, 病人和正常人间酶活性的差异达到了 100 多倍。更有意义的是, 这种简单的荧光技术可以用来进行 MPS IVA 携带者的检出, 这是优于放射性底物的另一个重要特点。

Zhao Huiquan et al.: A Simple Fluorimetric Method for the Assay of Galactose 6-sulphate Sulphatase
本文于 1989 年 10 月 10 日收到。