

正交法测定钉螺离体 GPT 反应的最佳条件

余蔚 刘高云 朱隽 曹玲伟 李文新

(华中师范大学生命科学学院, 武汉 430079)

THE OPTIMIZATION OF CONDITIONS FOR ASSAYING ACTIVITY OF GPT FROM *ONCOMELANIA HUPENSIS* IN VITRO BY ORTHOGONAL MATRIX METHOD

YU Wei, LIU Gao-Yun, ZHU Jun, CAO Ling-Wei and LI Wen-Xin

(College of Life Sciences, Huazhong Normal University, Wuhan 430079, China)

关键词: 湖北钉螺; GPT 反应; 正交试验; 最佳测定条件

Key words: *Oncomelania hupensis* Gredler; Pyruvate transaminase; Experiment; Conditions

中图分类号: Q176 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2010)02-0463-04

钉螺是日本血吸虫幼虫的唯一中间宿主, 药物灭螺是阻断日本血吸虫病传播的有效方法。由于化学灭螺药物的生产和使用对环境及非靶标生物均产生严重污染和毒害作用, 因而低毒、易分解的植物灭螺药物研究受到重视, 已筛选出诸如黄姜(*Dioscorea zingiberensis* C.H. Wright, DZ)、吉祥草(*Reineckea carnea*, RC)等皂甙类植物灭螺剂^[1,2]。近年, 作者又从药用生物碱植物中筛选出对鱼低毒的高效的新灭螺植物黄果茄(*Solanum xanthocarpum*: SX)^[3], 其有效成分是含澳洲茄胺骨架的生物碱(*Solanum avicular*: LS)。LS 在水温(23±1)℃、1.16 mg/L 浸泡钉螺 24h 的死亡率为 96.7%。LS 的 24h 灭螺效应与 *Camellia sinensis*、*Enphorbia splendens* 及 *Endod* 等植物灭螺剂的同类研究相比较^[4-7], 杀螺活性高 10 倍以上, 但作用机制尚不清楚。

钉螺体内蛋白质含量约占螺体有机物的 60%^[8], 研究证明其干燥 GPT 转氨基活力最高。GPT 反应是蛋白质代谢的重要环节之一, 与三羧酸循环关联, 是沟通蛋白质合成和糖代谢的桥梁^[9]。近年来研究发现, 一些化学药物以及植物提取物的灭螺效应, 大多数是作用于钉螺 GPT 等各种酶类。王根法等用 2 mg/L 烟酰胺浸泡 24h, 可抑制 40% GPT 活力^[10], 柯文山等分别用 1 mg/L 枫杨和羊蹄浸提液作用 GPT, 其活力均提高 76.0% 以上, 认为 GPT 活力变化的原因是钉螺失去代谢平衡, 有毒代谢物积累产生肝中毒, 致使肝功能紊乱或肝组织坏死, 最终

使钉螺死亡^[11]。作者拟定研究澳洲茄生物碱灭螺高效作用与钉螺 GPT 活力的关联, 阐明其高效的原因, 为合成和筛选新的杀螺剂提供线索。由于钉螺 GPT 活力受温度等多因素影响而发生变化, 本文先报道钉螺 GPT 活力的测定最佳条件, 为上述目标研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

使用湖北钉螺指名亚种肋壳钉螺(*Oncomelania hupensis hupensis*)株, 采自湖北省荆州市李埠镇沟渠, 用清水洗净后于实验室内饲养待用。

1.2 方法

GPT 的制备 选用能正常活动的阴性成螺, 除壳取出整个软体组织。按 1:5 (w/v) 加入预冷 PBS 置匀浆器内冷浴匀浆。匀浆液离心(4℃, 13000 r/min, 20min)收集上清液, 加入 30% 饱和度(NH₄)₂SO₄ 冷浴盐析 3h, 离心, 沉淀加少量 PBS 溶解。上清液如上方法, 加(NH₄)₂SO₄ 使其饱和度依次达到 60% 和 90%, 分别离心得 60% 和 90% 盐析蛋白。将 3 组盐析蛋白分别装入透析膜(8000—12000 D, 北京拜尔迪生物公司)内, 置于 500 mL PBS 冷浴透析 12h, 其间更换 3 次透析液。透析膜内截留盐析蛋白分别作为钉螺 GPT-I、II 和 III 的酶源, 于 0℃ 保存备用。

蛋白质的含量测定 参照紫外分光光度计法, 用

收稿日期: 2008-07-15; 修订日期: 2009-05-16

基金项目: 863 计划专项项目资助

作者简介: 余蔚(1984—), 女, 汉族, 湖北武汉人; 硕士研究生; 主要从事植物化学与药物方向研究。E-mail: weiyu1984@yahoo.cn

通讯作者: 李文新, E-mail: liwenxin0505@yahoo.com.cn; Tel: 027-67867133

PBS 作空白对照,测定蛋白质溶液在 280 nm 处的吸光度值。用牛血清白蛋白作为标准蛋白,测定绘制蛋白质标准曲线。在紫外分光光度计上直接读取待测酶液 280 nm 波长处的吸收值,对照蛋白质标准曲线计算其蛋白含量。

GPT 的活性测定 以丙酮酸作为标准液,采用分光光度法测定 GPT 活力。取 4 支试管并编号,1 号为空白对照管。向试管中各加入 0.5 mL GPT 底物,置于 37℃ 水浴锅中预热 10min,使管内外温度平衡。取 0.1 mL GPT 酶液,分别加入 2、3、4 号试管内,继续保温 60min。然后向 4 支试管中各加入 0.5 mL 2,4-二硝基苯肼终止反应和 5.0 mL 0.4 mol/L NaOH 溶液显色(以上药品均为国药集团化学试剂有限公司产品)。冷却至室温(25℃),静置 30min 后,测定 520 nm 处的 OD 值。在丙酮酸标准曲线上计算丙酮酸微摩尔数,以 1.0 μmol 丙酮酸代表 1 个 GPT 比活力单位($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$)。

GPT 催化反应的最佳条件测定 酶促反应速率受多个因素(因子)及其变化所处状态(水平)的影响。正交试验法是根据组合理论,借助正交表设计简化实验,是多因素(水平)统计分析的有力工具。选定 GPT 酶浓度、底物浓度、反应体系的 pH、反应时间及反应温度 5 个因素及其 5 个水平,采用 $L_{25}(5^6)$ 正交试验法试验,统计分析找出 GPT 催化反应的最佳条件,试验设计(表 1)。

2 结 果

2.1 不同处理组合 GPT 的比活力

使用 30%、60% 和 90% 饱和度 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 析得到的蛋白组分 GPT-I、II 和 III,其比活力分别为 0.016、0.015 和 0.134 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$,可见,90% 饱和度盐析酶液中的 GPT 比活力最高,即将其作为本次试验的酶源。以比活力为指标比较各因素与水平处理对钉螺 GPT 催化反应的影响(表 2)。

2.2 不同处理组合 GPT 比活力的极差分析

用极差统计分析表 2 所列各处理组合中各因素的影

响大小、最优水平及其最佳组合。数据用 spss 软件处理(版本为 15.0)。因素影响分析结果如表 3 所示,按极差 R 值划分各因素对钉螺 GPT 的比活力影响大小顺序为酶浓度、底物浓度、反应体系的 pH、反应温度以及反应时间,结果说明酶浓度对 GPT 的活性影响最大。各因素最优水平分别为 0.1 mg/L GPT、5 mmol/L α -酮戊二酸、反应体系 pH 6.5、反应温度 35℃、反应时间 30min。

2.3 不同处理组合 GPT 比活力的方差分析

极差分析正交试验法结果能找出最佳的因素与水平,方差分析能区分试验过程以及试验结果测定中必然存在的误差大小,并检验各设定因素对钉螺 GPT 活性影响是否显著^[12]。对表 2 不同处理组合 GPT 比活力方差分析结果如表 4。经 F 检验,酶浓度和反应时间均对 GPT 活力测定影响达到极显著水平,而底物浓度,反应体系 pH 及反应温度无显著影响。

3 讨 论

一种酶的活力测定最佳条件,会因不同物种,或是同一物种组织不同经常发生变化,这种变化源自温度等多种因素,因而在研究钉螺离体 GPT 前必须确定其动力学特征^[13,14]。本文将酶浓度、底物浓度、反应体系的 pH、反应温度及反应时间视为影响 GPT 酶活力的主要因素,并在各因素中分别给出 5 个水平。本文首次应用 $L_{25}(5^6)$ 正交试验法确定钉螺离体 GPT 活力的最佳测定条件,为今后对 GPT 的进一步研究奠定了基础。

本文使用钉螺的全部软体组织,匀浆后离心的上清液,用 90% 饱和度 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析收得 GPT 活性蛋白作为酶源,研究其最适测定条件(组合)。结果是酶浓度影响 GPT 活力最大,其反应速度与其浓度成反比,可能有两点原因:① GPT 酶液中可能含有抑制物;② 底物浓度与酶浓度不平衡,只有当底物浓度大于酶浓度时,反应速度才与酶浓度成正比,相反随着酶浓度的增加,反应速

表 1 正交试验中影响 GPT 比活力的因素及水平

Tab. 1 Experimental factors and their levels for orthogonal projects

水平 Level	酶浓度 Concentration of GPT (mg/mL)	底物浓度 Concentration of substrate ($\mu\text{mol}/\text{L}$)	pH	反应温度 Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	反应时间 Reaction time (min)
	A	B	C	D	E
1	0.1	2.0	6.5	25	30
2	0.2	3.0	7.0	30	45
3	0.4	4.0	7.5	35	60
4	0.8	5.0	8.0	40	75
5	1.6	6.0	8.5	45	90

注: 1、2、3、4 和 5 分别表示各因素的 5 个水平; A、B、C、D 和 E 分别表示酶浓度、底物浓度(表中显示不同浓度底物中 α -酮戊二酸的浓度)、pH、反应时间和温度,下同

Note: Numerals 1, 2, 3, 4, and 5 represent 5 levels of factors; letters A, B, C, D, and E represent factors of concentration of GPT, concentration of the substrate, pH, reaction temperature and reaction time, respectively, and the same below

表 2 不同处理组合钉螺 GPT 的比活力
Tab. 2 Application of orthogonal projects in assaying the GPT activity from snail

编号 No.	因素与水平组合 Combination of treatment	GPT 的比活力 Specific activity of GPT ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$)
1	A ₁ B ₁ C ₁ D ₁ E ₁	0.1304±0.0263
2	A ₁ B ₂ C ₂ D ₂ E ₂	0.1017±0.0271
3	A ₁ B ₃ C ₃ D ₃ E ₃	0.0974±0.0213
4	A ₁ B ₄ C ₄ D ₄ E ₄	0.0586±0.0138
5	A ₁ B ₅ C ₅ D ₅ E ₅	0.0525±0.0193
6	A ₂ B ₁ C ₂ D ₃ E ₄	0.0349±0.0096
7	A ₂ B ₂ C ₃ D ₄ E ₅	0.0401±0.0141
8	A ₂ B ₃ C ₄ D ₅ E ₁	0.0295±0.0052
9	A ₂ B ₄ C ₅ D ₁ E ₂	0.1100±0.0274
10	A ₂ B ₅ C ₁ D ₂ E ₃	0.0783±0.0136
11	A ₃ B ₁ C ₃ D ₅ E ₂	0.0139±0.0016
12	A ₃ B ₂ C ₄ D ₁ E ₃	0.0445±0.0075
13	A ₃ B ₃ C ₅ D ₂ E ₄	0.0330±0.0077
14	A ₃ B ₄ C ₁ D ₃ E ₅	0.0244±0.0024
15	A ₃ B ₅ C ₂ D ₄ E ₁	0.0242±0.0055
16	A ₄ B ₁ C ₄ D ₂ E ₅	0.0143±0.0027
17	A ₄ B ₂ C ₅ D ₃ E ₁	0.0094±0.0014
18	A ₄ B ₃ C ₁ D ₄ E ₂	0.0097±0.0019
19	A ₄ B ₄ C ₂ D ₅ E ₃	0.0094±0.0008
20	A ₄ B ₅ C ₃ D ₁ E ₄	0.0299±0.0062
21	A ₅ B ₁ C ₅ D ₄ E ₃	0.0053±0.0005
22	A ₅ B ₂ C ₁ D ₅ E ₄	0.0042±0.0008
23	A ₅ B ₃ C ₂ D ₁ E ₅	0.0172±0.0035
24	A ₅ B ₄ C ₃ D ₂ E ₁	0.0119±0.0039
25	A ₅ B ₅ C ₄ D ₃ E ₂	0.0080±0.0015

注: 按L₂₅(5⁶)正交表安排的25个处理组合进行实验, 下角标代表各因素的不同水平; 每个处理重复3次, 每个重复测定3次; 表中数据为比活力平均值±标准差

Note: The arrangements of A, B, C, D, E were tested by orthogonal design for 5 (factor) ×25 (run number); every row of run number represents one experimental replicate, every run was replicated three times and every replicate was measured three times. Values were mean±SD

表 3 L₂₅(5⁶)正交试验极差分析表
Tab. 3 Analysis of the results from L₂₅(5⁶) orthogonal projects with the method of range analysis

	GPT 的比活力 Specific activity of GPT ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$)				
	A	B	C	D	E
K ₁	1.3218	0.5964	0.7410	0.9960	0.6162
K ₂	0.8784	0.5997	0.5622	0.7176	0.7299
K ₃	0.4200	0.5604	0.5796	0.5523	0.7074
K ₄	0.2181	0.6429	0.4647	0.4137	0.4818
K ₅	0.1398	0.5787	0.6303	0.3285	0.4455
k ₁	0.0881	0.0398	0.0494	0.0664	0.0410
k ₂	0.0586	0.0340	0.0375	0.0478	0.0486
k ₃	0.0280	0.0374	0.0387	0.0348	0.0470
k ₄	0.0145	0.0429	0.0310	0.0276	0.0321
k ₅	0.0093	0.0386	0.0420	0.0219	0.0297
R 值	0.0788	0.0055	0.0184	0.0445	0.0190
最佳水平 Optimal level	1	4	1	1	2

注: K_i代表各因素 i 水平下比活力值的和; k_i代表 K_i的平均值

Note: K_i is the sum of the specific activity of GTP of the i level of different factors, and k_i represents the average of K_i

表 4 $L_{25}(5^6)$ 正交试验的方差分析表Tab. 4 Analysis of the results from $L_{25}(5^6)$ orthogonal projects with the method of range analysis

变异来源 Source of variation	SS (平方和) Sum of square	df (自由度) Degree of freedom	MS (均方) Mean square	F
A	0.196	4	0.0490	90.438**
B	0.001	4	0.0000	0.153
C	0.007	4	0.0020	1.319*
D	0.056	4	0.0140	11.966**
E	0.013	4	0.0030	2.288

注: “*”表示显著性差异($P \leq 0.05$); “**”表示差异极显著($P \leq 0.01$)Note: “*”represent significant difference, respectively ($P \leq 0.05$); “**”represent extremely significant difference, respectively ($P \leq 0.01$)

率反而下降。杨利寿等比较了温度对 4 种脊椎动物(蛙、鳖、鹌鹑、兔)的 GPT 活性的影响, 研究表明, GPT 反应最适温度与动物自身代谢率相关, 如鹌鹑肝脏 GPT 在 45°C 时活性出现最高值, 这是由于它们的代谢率及体温高于其他动物^[15]。而钉螺在 20°C 活动能力极强^[8], 本次试验表明钉螺 GPT 对温度很敏感, 40°C 时 GPT 酶反应速率下降明显, 而 35°C 时酶反应速率达到最高。另外, 由于酶的不稳定性, 在反应条件下可能逐渐变性、失活, 故保温时间也应严格控制, 此次实验证明, 反应时间不宜超过 30min。反应环境 pH 对酶的活力影响较大, 过酸或过碱将引起酶的空间结构的改变从而酶活性丧失, 但本次实验说明在 pH 6.5—8.0 时, 钉螺离体 GPT 反应并不敏感。

参考文献:

- [1] Zhang Y Z, Yu L J, Xu H B. The on *Dioscorea zingiberensis* [J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2003, 5: 376—378 [张永忠, 余龙江, 徐辉碧. 盾叶薯蓣的研究进展. 中药材, 2003, 5: 376—378]
- [2] Li W X, Huang X Y, Chen X M. Study on the molluscicidal component of *Reinecken carnea* [J]. *Pesticides*, 2008, 47(2): 97—99 [李文新, 黄雪英, 陈新苗. 吉祥草杀螺成分的分离和结构解析. 农药, 2008, 47(2): 97—99]
- [3] Li W X, Huang X Y, Liu S. The molluscicidal component of *Solanum xanthocarpum* [J]. *Agrochemicals*, 2007, 46(9): 591—593 [李文新, 黄雪英, 刘实. 黄果茄果实杀螺成分的分离和结构解析. 农药, 2007, 46(9): 591—593]
- [4] Schall V T. Evaluation of temporal, seasonal and geo-graphic stability of the molluscicidal property of *Euphorbia splendens latex* [J]. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de sao Paulo*, 1992, 34(30): 183—191
- [5] Madhina D, Shiff C. Prevention of snail miracidia inter-actions using phytolacca dodecandra (L. herit) (endod) as a Miracidicide:an alternative approach on the focal control of schistosomiasis [J]. *Tropical Medicine & International Health*, 1996, 1(2): 221—226
- [6] Shoeb H A, Ei-emam M A. The Molluscicidal Properties of Natural Products from *Ambrosia Maritime* [J]. *Egyptian Jour-nal of Bilhaziasis*, 1976, 3(2): 157—167
- [7] Josekutty P P C. Selection and characterization of vari-ant *solanum xanthocarpum cekk line* with augmented steroid metabolism [J]. *South African Journal of Botany*, 1998, 64(4b): 238—243
- [8] Zhou X N. Science on *Oncomelania* Snail [M]. Beijing: Science Press. 2005, 73, 95 [周晓农. 实用钉螺学. 北京: 科学出版社. 2005, 73, 95]
- [9] Song G M, Wang G F. Studies on the amino acid of *Oncomelania hupensis* [J]. *Chinese Journal of Schistosomiasis Control*, 1990, (4): 93—95 [宋庚明, 王根法. 钉螺氨基酸分析. 中国血吸虫病防治杂志, 1990, (4): 93—95]
- [10] Wang G F, Song G M. Accidence studies on the transaminase of *Oncomelania hupensis* [J]. *Chinese Journal Of Parasitology and Parasitic Diseases*, 1990, 8(2): 110—112 [王根法, 宋庚明. 钉螺转氨酶初步研究. 中国寄生虫与寄生虫病杂志, 1990, 8(2): 110—112]
- [11] Zhu D, Zhou X N. Study on mechanism of molluscicides [J]. *Parasitic Diseases Foreign Medical Science*, 2005, 32(6): 269—271 [朱丹, 周晓农. 灭螺药物作用机制的研究. 国外医学(寄生虫病分册), 2005, 32(6): 269—271]
- [12] Ou G J, Hu Z L. Biological Statistics [M]. Shanxi Normal University Press. 1995, 73—89 [欧光鉴, 胡中立. 生物统计. 陕西师范大学出版社. 1995, 73—89]
- [13] Zhang H Y, Liu K W, Shi A J. Isolation, purification and some kinetic properties of alkaline phosphatase from the mantle of *-anodonta woodiana* (heude) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1996, 20(1): 57—62 [张洪渊, 刘克武, 石安静. 背角无齿蚌碱性磷酸酶的分离、纯化及其动力学研究. 水生生物学报, 1996, 20(1): 57—62]
- [14] Ma C C, Wang Z H. Studies on lactate dehydrogenase isozymes of *megalobatrachus davidianus* (blanchard) II kinetics [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1997, 21(2): 137—142 [马成仓, 王子浩. 中国大鲵乳酸脱氢酶同工酶研究 II 动力学性质. 水生生物学报, 1997, 21(2): 137—142]
- [15] Yang C L, Pang H, Yu F. Comparison of activity and of GPT and GOT in several amniote and the relationship between activity and the temperature [J]. *Journal of Nanjing Normal University* (Natural Science), 1984, 2: 81—85 [杨春利, 庞宏, 郁斐. 几种脊椎动物某些组织中谷丙、谷草转氨酶活性比较及对温度的依赖关系. 南京师大学报(自然科学版), 1984, 2: 81—85]