

糖化酶活性的电化学测定及其影响因素

邱娟娟

刘瑞莲 汪卫华

(上海市劳动卫生职业病研究所)

(上海市电视十一厂)

范培昌

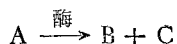
(华东师范大学生物系)

提 要

采用上海电视十一厂生产的 MS-1 型电化学酶活力测定仪,能快速而准确地测出糖化酶活力,又能直观其酶反应动力学。实验表明,本法灵敏度比常规比色法高。本文还试验了各种影响因素,确定了糖化酶活力测定的最适反应条件。

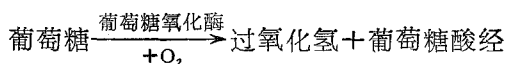
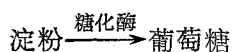
范培昌等人曾试制了一架电化学酶活力测定仪^[1],并已成功地应用于胆碱酯酶类^[1,2],过氧化氢酶与过氧化物酶类的活力测定^[3]。现在该仪器已由上海电视十一厂生产,并取名为 MS-1 型酶活力测定仪。我们把这种仪器用于对无锡酶制剂厂酶法生产葡萄糖的糖化酶活力测定,获得了比原用比色法更佳的测定效果。

按文献所述^[1-4],凡属:

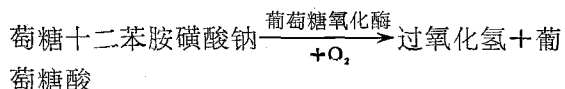


这类酶反应,只要产物 B 或 C 具有小于(如胆碱酯酶类^[1,2])或大于(如过氧化氢酶和过氧化物酶类^[3])底物 A 的电活性,就能用本法测定。但是,如果底物没有电活性,本法是否还起作用呢?本文对这一问题给出了肯定的答案。

无锡酶制剂厂在酶法制取葡萄糖时,系用糖化酶催化淀粉水解,糖化酶活力测定则是根据所生成的葡萄糖量,用次亚碘酸盐化学比色法定量,我们是根据 Guibault 法进行测定,其反应式如下:



用 MS-1 型酶活力测定仪测定,证明上述两酶底物均无电活性,本体系不能起动,似乎难以用本仪器测定。据此,我们根据 Guibault 法^[4,5],在体系中加入一种不影响本反应但具有电活性的物质(二苯胺磺酸钠),促使体系起动。即:葡萄糖十二苯胺磺酸钠



($E_0 - 0.8V$)

($E_0 - 1.3V$)

实验结果表明,这种想法是正确的,这就扩大了本仪器的应用范围。

材 料 与 方 法

葡萄糖氧化酶购自 Sigma,比活力为 35.3 单位/毫克。其他试剂均用分析级,且用 8 兆无离子水配制。

1. 标准曲线的绘制

[9] Porker, P. J.: *Biochem. Biophys. Commun.*, 1978, 80, 849.

[11] Beisiegel, U.: *Electrophoresis*, 1986, 7, 1.

[10] Brada, D. et al.: *Anal. Biochem.*, 1984, 142, 79.

[本文于 1988 年 1 月 4 日收到]

于 MS-1 型酶活力测定仪所附反应池中, 加入 25 ml、内含 0.01 mol/L 葡萄糖和 0.006 mol/L 二苯胺磺酸钠的 0.1 mol/L, pH 7.4 Tris-HCl 缓冲液。插入电极, 电磁搅拌下恒温于 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 。恒电流调为 $35 \mu\text{A}$, 记录仪纸速为 60 cm/h。此时, 记录仪绘一直线, 30 秒钟后, 加入 1% 葡萄糖氧化酶液 0.3 ml。由于酶反应, 记录纸上出现 S 形酶反应动力学曲线。当曲线趋于直线时, 反应结束, 全程约 4 分钟。重复上述操作, 但葡萄糖量分别改为 10^{-3} 、 10^{-4} 和 10^{-5} mol/L。所得各曲线按文献作图^[1,2]得 $\Delta E/\Delta t$ 值, 以此为纵座标, 葡萄糖克分子浓度为横座标, 即得标准曲线。按无锡酶制剂厂原有标准, 赋予糖化酶活力单位定义为:

糖化酶粉在规定条件下, 1 小时内分解可溶性淀粉而产生的 1 个毫微克分子葡萄糖的酶量, 定义为糖化酶活力单位。据此再把标准曲线横座标换算成糖化酶活力单位。

2. 糖化酶活力测定

以下制样操作均按无锡酶制剂厂原用比色法步骤进行。精确称取该厂生产的糖化酶粉 1.0 g 倒入 50 ml 烧杯中, 用少量 0.1 mol/L, pH 4.6 乙酸-乙酸钠缓冲液溶解。用玻棒捣研后将上层液仔细倾入 500 ml 容量瓶中。残渣再加入少量同种缓冲液捣研取上层液。如此重复 4 次, 合并上层液并定容到 500 ml。经滤纸过滤后取滤液 2 ml, 1% 淀粉液 5 ml、0.1 mol/L, pH 4.6 乙酸钠缓冲液 5 ml, 并用无离子水定容到 25 ml, 于 $55-58^\circ\text{C}$ 水浴中糖化 1 小时。此后, 取此糖化液 2 ml 替代上述制备标准曲线时反应液中的葡萄糖, 按同样操作求得 $\Delta E/\Delta t$ 值, 并从标准曲线算出糖化酶活力单位。

结果与讨论

1. 糖化酶活力与其相应 $\Delta E/\Delta t$ 值呈线性关系

图 1 是反应体系中加入二苯胺磺酸钠, 使无电活性的反应体系出现 0.8V 的起始电压。当加入葡萄糖氧化酶后, 因葡萄糖氧化, 体系中生成有电化活性的 H_2O_2 , 并随时间进程, 记录

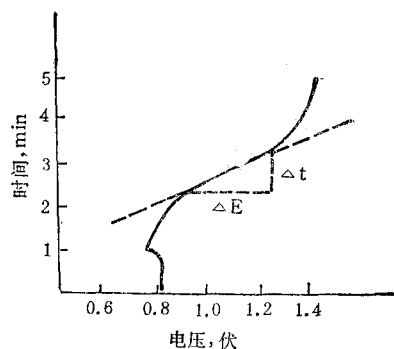


图 1 用二苯胺磺酸钠作为启动电位物质得到了葡萄糖氧化酶氧化葡萄糖的电压 (E , 伏)—时间(t , 分)曲线

纸上绘出 S 形酶反应动力学曲线, 由此不难看出, 此图类似于过氧化氢酶类^[3], 即电压由小变大; 而和胆碱酯酶类相反^[4], 后者电压由大变小。

经用一系列浓度葡萄糖标准液测试, 所得各反应曲线的 $\Delta E/\Delta t$ 值与其相应浓度呈线性关系(图 2)。由此证明, 本法既可用于糖化酶, 葡萄糖氧化酶的活力测定, 也可用于葡萄糖量的测定。

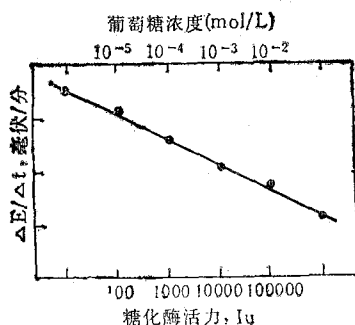


图 2 葡萄糖量(或糖化酶活力单位)与其相应的 $\Delta E/\Delta t$ 值呈线性关系

本实验装置附有恒温设备, 结果稳定。故此标准曲线不必经常校正。

2. 关于二苯胺磺酸钠的最适浓度

由于葡萄糖这种底物在此电化学反应体系中不具有电活性, 二苯胺磺酸钠在本系统中系作为起始电位的添加剂。实验证明(表 1), 其浓度影响起始电位值, 按文献[5]和为了节省试剂, 我们取其浓度在 7.5—10 mg/ml。此时, 起始电压在 0.8 V 左右。

表1 二苯胺磺酸钠含量与起始电位关系

二苯胺磺酸钠 (mg/ml)	加入体积 (ml)	毫 伏 (mV)
5.0	1	750
7.5	1	798
10.0	1	810
20.0	1	789
30.0	1	754
40.0	1	726

为了验证上述浓度对酶反应的影响,又试验了7.5和10 mg/ml两种浓度下进行酶反应时所得 $\Delta E/\Delta t$ 值变化,结果如表2所示。可见,两种浓度所得 $\Delta E/\Delta t$ 值都随酶浓度之变化而有规律地变化。表2结果也表明,二苯胺磺酸钠浓度对酶反应影响不大,它只是一种为获取起始电压的添加剂而已。

表2 二苯胺磺酸钠对葡萄糖氧化酶反应的影响

葡萄糖氧化酶浓度 (mg/ml)	二苯胺磺酸钠浓度	
	7.5mg/ml	10.0mg/ml
0.01	0.7	0.7
0.02	1.4	1.42
0.04	2.80	2.86

反应条件如表1,表中为 $\Delta E/\Delta t$ 值,单位为毫伏/秒。

3. 关于灵敏度考核

在无锡酶制剂厂大力协作下,取该厂同种糖化酶粉,分别于无锡,上海进行测试,但前者用原比色法(次亚碘酸盐法),后者采用MS-1型酶活力测定仪。实验共进行四次,结果如表3所示。可见,二者所得结果极为接近,说明电化学法所得结果是可靠的,更重要的是,本法最小检测值小于100单位(见图2)。也就是说,灵敏度要比原用比色法高许多。

表3 原比色法和电化学法测定糖化酶活力的比较

单位: 糖化酶活力单位

编 号	比色法	电化学法
1	33,000	35,000
2	42,900	46,250
3	50,000	50,625
4	2,000	2,436

4. 关于 pH 值的选择

由表4可见,pH值为4.5时, E_0 可近似0.8伏,这与文献报道值相符^[5,6],再则,糖化酶在pH4.5左右时溶解度亦最佳。(反应条件如标准曲线。)

表4 pH 值的选择

pH 值	毫伏 (mV)
2.5	538
3.5	630
4.5	798
5.5	850
6.51	1160

5. 关于重现性

表5列出了6次重复实验的测定结果,把各次所得 $\Delta E/\Delta t$ 值平均,得标准误差(S)为0.099,变异系数(CV)为3.1%,均符工业测试要求。大量的实验使我们体会到,误差主要来源于手工加样和手工作图。

表5 不同日期下所测同种样品的实验结果

编 号	$\Delta E/\Delta t$ (毫伏/秒)
1	3.16
2	3.17
3	3.27
4	3.27
5	3.15
6	3.10
平均	3.17
S	0.099
CV	3.1%

反应条件如标准曲线,葡萄糖浓度为 10^{-3} mol/L。

参 考 文 献

- [1] 范培昌等:《生物化学与生物物理进展》,1984,(6),59。
- [2] 范培昌等:《生物化学与生物物理学报》,1986,18(4),349。
- [3] 沈洁和范培昌:《宁波师院学报(自然科学版)》,1987,5(1),45。
- [4] Guilbault, G. G. et al.: *Anal. Chem.*, 1966, 14(1), 61。
- [5] Guilbault, G. G. (缪辉南译):《酶法分析》,科学出版社,北京,1977,68—71页。
- [6] 《糖化酶工艺及其应用》,内部资料(无锡酶制剂厂)。

[本文于1988年1月20日收到]