

80 min in dark with samples, the sulfanilic acid and N- (1-naphthyl) -ethylenediammonium was added to the reaction system to measure the concentration of produced nitrite in system. It was found that the optimum pH for the enzyme reaction was 7.4, K_m was 0.1 mmol/L. There was a relationship between the amounts of sample and nitrite concentration in the system. This

method is simple and convenient. Intra-assay CV value is 3.69% and inter-assay CV value is 5.16%. The specific activity of nitric oxide synthase in ten rats' brains is (39.61 ± 7.64) nmol/ (min·g).

Key words rats' brain, nitric oxide synthase, nitric oxide, nitrite

胰蛋白酶活性的定量测定方法

张东裔 唐建国¹⁾ 张龙翔

(北京大学生命科学学院, 北京 100871)

摘要 对甲苯磺酰基精氨酸甲酯 (TAME) 是胰蛋白酶的专一性底物. TAME 经胰蛋白酶水解释放出的对甲苯磺酰基精氨酸与活性测定混合物中的 NaOH 反应, 导致溶液 pH 值的下降. 以酚红为指示剂, 通过测定 555 nm 处光吸收值的降低可以监测 pH 的变化. 在 0.001~0.3 μ g 的范围内, 胰蛋白酶含量与 555 nm 处光吸收值的降低呈线性关系.

关键词 胰蛋白酶, 活性测定, 对甲苯磺酰基精氨酸甲酯, 酚红

基因工程表达产生的胰蛋白酶及其突变体的活性, 常用对甲苯磺酰基精氨酸甲酯 (N α -p-tosyl-L-arginine methyl ester, TAME) 活性胶法定性监测^[1]. 在活性胶方法的基础上, 发展了一个胰蛋白酶活性的定量测定方法. 利用 TAME 作为胰蛋白酶的专一性底物, 在一定条件下被胰蛋白酶水解后释放出的游离羧基与反应体系中的氢氧化钠发生中和反应, 导致溶液 pH 值降低, 以苯酚红 (phenol red) 为指示剂, 测定溶液在 555 nm 处光吸收值的变化, 可以快速测得胰蛋白酶活性数据. 胰蛋白酶在一定的浓度范围内与 555 nm 处光吸收值的降低呈良好的线性关系, 因此可以作为定量测定胰蛋白酶的方法.

1 材料和方法

1.1 材料

TAME、胰蛋白酶、嗜热菌蛋白酶为 Sigma 公司产品, 其中胰蛋白酶的活力为

10 700 U/mg, 嗜热菌蛋白酶活力为 54 U/mg. 胰凝乳蛋白酶和枯草杆菌蛋白酶由上海丽珠生化技术公司提供, 活力分别为 4000 U/mg 和 2000 U/mg. 分析纯苯酚红 (pH 变色范围: 6.8 黄~8.4 红) 为北京化学试剂公司产品. 其他试剂均为国产分析纯.

1.2 方法

苯酚红溶液的配制: 40 mg 苯酚红用蒸馏水溶解, 加入 240 μ l 1.0 mol/L 的 NaOH 溶液, 用蒸馏水定容至 200 ml.

在 1.5 ml 苯酚红溶液中加入 0.2 ml 2 mmol/L TAME 溶液、20 μ l 1 mol/L CaCl₂ 溶液, 适量的酶用水溶解至 0.28 ml, 反应总体积为 2 ml, 此时溶液的 pH 值为 6.90. 室温下 10 min 内在紫外可见分光光度计 (UV-120-02, 岛津) 上测定 555 nm 的光吸收值变化. 以不加酶液的同样反应为对照, 以蒸馏水溶液

¹⁾ 通讯联系人.

收稿日期: 1996-01-31, 修回日期: 1996-03-25

为空白. 一个苯酚红单位定义为室温下每分钟使得 A_{555} 降低 0.001 的酶量.

2 结果与讨论

在苯酚红-TAME 溶液中加入胰蛋白酶之前以及加入胰蛋白酶反应一段时间后, 反应溶液的颜色由红色逐渐变黄, 通过光谱扫描发现原来在 535~580 nm 之间存在的一个吸收峰随着反应的进行逐步消失, 而该峰峰尖对应于 555 nm 处 (图 1). 因此选择 555 nm 处光吸收值的变化作为测定的指标.

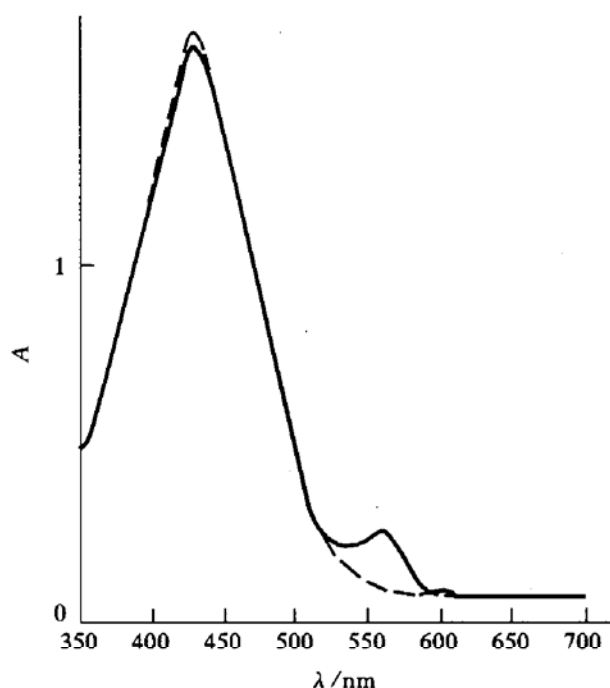


图 1 酚红-TAME 溶液的光吸收图谱

—: 胰蛋白酶加入之前; ----: 加入 0.2 μg 胰蛋白酶 10 min 后.

图 2 所示的是 2 ml 测活溶液 10 min 内 A_{555} 变化的绝对值与酶量之间的关系. 该方法较为灵敏, 可以检出 1 ng 的胰蛋白酶, 随着反应时间的延长, 可检出的胰蛋白酶量还可以更低. 图 3 所示的是 0.1 μg 胰蛋白酶在室温下水解 TAME 的时间过程, 从图 3 可以看出, A_{555} 的减少与时间呈良好的线性关系. 在对照反应中加入 0.01 mmol/L HCl 发现, 每加入 10 nmol 的氢离子使得溶液在 555 nm 处的光吸收值降低 0.1 个单位, 由此引起的溶液 pH

值的改变是使用普通 pH 计所无法检测的.

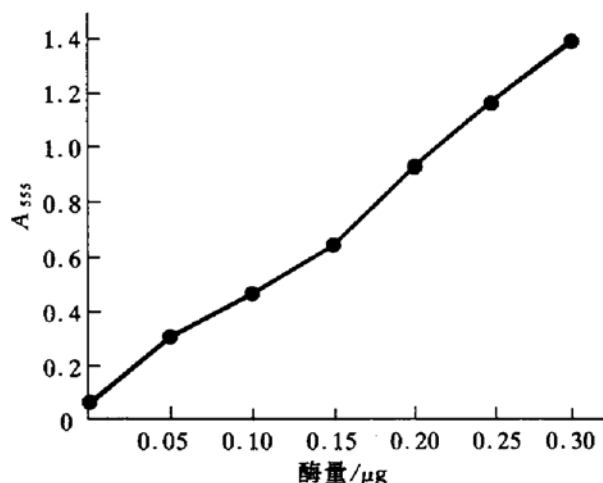


图 2 单位时间内 A_{555} 的变化与胰蛋白酶用量之间的关系

反应时间: 10 min; 反应温度: 室温.

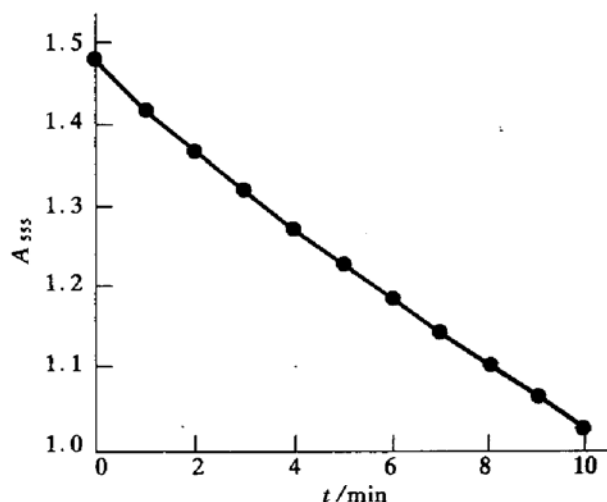


图 3 0.1 μg 胰蛋白酶对 TAME 的时程水解图谱

反应温度: 室温.

由于 TAME 为胰蛋白酶的专一性底物, 因此该方法具有高度的专一性. 使用各 5 μg 的胰凝乳蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶以及嗜热菌蛋白酶进行对照实验, 在 1 h 内 A_{555} 基本没有变化.

与 TAME 活性胶方法相比较, 本方法操作简单、迅速, 并且可以对酶的活性进行定量测定. 与经典的 BAEE 测定方法^[2] 比较, 苯酚红方法的灵敏度明显提高, 1 个 BAEE 单位相当于 150 个苯酚红单位; 与考马氏亮蓝 G250-酪蛋白测定方法^[3] 相比, 本方法的灵敏度也有所提高, 而且不受其他蛋白酶类的干扰.

由于该方法实际上是通过将蛋白酶水解底物反应与酸碱中和反应相偶联,并以指示剂在特定波长下的光吸收值的变化作为测定的指标,因此通过选择不同的指示剂以及使用其他合适的底物,可以测定其他种类的蛋白酶类的活性,从而建立一系列以指示剂为基础的酶活性测定方法.

参 考 文 献

- 1 Evnin L, Craik C S. Enzyme Engineering, 1988; 542: 61
- 2 Rick W. In: Bergmeyer H U ed. Methods of Enzymatic Analysis, New York and London: Academic Press, 1963; 807
- 3 周慧, 鲁治斌, 齐 杰等. 生物化学杂志, 1994; 10 (5): 630

A Quantitative Assay Method for Trypsin Activity. Zhang Dongyi, Tang Jianguo, Zhang Longxiang (Department of Biochem-

istry and Molecular Biology, College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China).

Abstract TAME (N_α -p-tosyl-L-arginine methyl ester) is a specific substrate of trypsin. N_α -p-tosyl-L-arginine is released from TAME after tryptic hydrolysis, which reacts with NaOH in the assay mixture and causes the decrease of pH. Using phenol red as the indicator, the pH change of the solution can be monitored by the decrease of the absorbance at 555 nm. The decrease of A_{555} is directly proportional to the amount of trypsin with a linear range of 0.001~0.3 mg. The method is very convenient to use, highly sensitive and specific.

Key words trypsin, assay, TAME, phenol red

邻二氮菲- Fe^{2+} 氧化法检测 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ 产生的羟自由基

金 鸣 蔡亚欣 李金荣 赵 辉

(北京市心肺血管医疗研究中心, 北京 100029)

摘要 报告检测 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ 所产生羟自由基的新方法. 羟自由基氧化反应后, 邻二氮菲- Fe^{2+} 的 A_{536} 明显下降, 且 ΔA_{536} 与邻二氮菲, FeSO_4 及 H_2O_2 呈量效关系, 随反应时间延长, ΔA_{536} 依幂函数规律上升. 此法试验结果表明, 甘露醇, 抗坏血酸及硫脲清除羟自由基作用呈明显的量效关系.

关键词 羟自由基, 邻二氮菲- Fe^{2+} , H_2O_2 , FeSO_4

羟自由基是体内最活泼的活性氧, 可介导许多病理变化. 目前, 离体检测羟自由基有电子自旋共振法^[1], 化学发光法^[2], 细胞色素 c 氧化法^[3] 等. 这些方法或仪器特殊, 或试剂昂贵, 使其应用受到限制. $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ 体系可通过 Fenton 反应产生羟自由基^[4], 邻二氮菲- Fe^{2+} 水溶液被羟自由基氧化为邻二氮菲- Fe^{3+} 后, 其 536 nm 最大吸收峰消失. 根据上述原

理, 我们建立了以 A_{536} 变化反映羟自由基氧化作用的比色测定法, 该法设备简单, 试剂便宜, 操作简便, 适于广泛使用.

1 材料与方 法

设备: 7230 型分光光度计.

试剂: 全部为国产分析纯.