腺苷敏感组织电极的研究*

狄平平　　邓家祺
(上海交通大学应用化学系,上海 200030)　(复旦大学化学系,上海)

提　　要

将一种含丰富腺苷脱氨酶的新鲜猪肝组织切片,通过"三明治夹心"法固定于氨气敏电极上,制成对腺苷具有特异响应的生物催化组织膜电极. 电极测定腺苷浓度线性范围为 1.4×10^{-4}—1.0×10^{-2}mol/L, 检出限为 5.0×10^{-5}mol/L. 并对介质条件, pH 影响,选择性以及动力学响应行为进行研究,电极寿命达一个月以上. 电极用于合成样品测定,效果满意.

关键词　生物传感器,组织电极,腺苷

核苷酸是一类在代谢上极其重要的物质,是 DNA 和 RNA 生物合成前体,是生物能量代谢中的高能量物质[1], 目前检测腺苷方法有放射免疫法, 荧光法, 色谱法[2,3]和酶电极测定腺苷[4]方法. 本文报道利用新鲜猪肝组织切片配上氨气敏电极制成了腺苷敏感电极, 其线性范围为 1.4×10^{-4}—1.0×10^{-2}mol/L, 检出限 5.0×10^{-5}mol/L, 电极选择性好,干扰少,寿命长达一个月以上. 用于合成样品中腺苷含量测定,效果满意. 回收率在 93.3—102%之间.

1　材料和方法

1.1　仪器和试剂

自制离子电极阻抗转换器, 输出接入 x-y 函数记录仪(上海大华仪表厂). pHS-2 型酸度计(上海第二分析仪器厂), pNH_3-1 型氨气敏电极(上海电光器件厂), 79-1 型磁力搅拌器, 实验温度均在 20℃.

所有溶液均用去离子水配制. 所用生化试剂由上海生化试剂商店购得. 无机试剂均为分析纯. 各种缓冲液按文献 [5] 方法配制, 并加入 0.03% NaN_3 起防腐作用. 新鲜猪肝从当地农副市场购得,并放入 —15℃ 冰箱中保存待冰冻后切片.

1.2　电极制作和保存

根据文献 [6] 报道的"三明治夹心"法固定

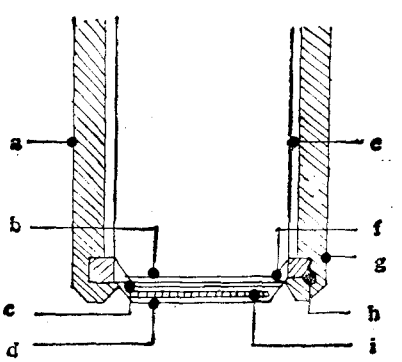

图 1　腺苷组织电极的构造
a. 外壳; b. 氨气透膜; c. 透析膜; d. 尼龙网; e. pH电极; f. 内参比液; g. 电极帽; h. 橡皮圈; i. 猪肝组织

猪肝组织切片膜. 其结构见图 1. 将冰冻猪肝用手术刀轻轻切下 0.2mm 左右厚组织, 置于 10ml 烧杯中,用去离子水洗涤几遍. 而后取与氨气透膜直径大小一样的尼龙网和透析膜各一片, 将猪肝组织夹于它们之间, 放平后轻轻挤压,使切片均匀覆盖于尼龙网上,制成的猪肝组

* 本文系国家自然科学基金资助课题.
收稿日期: 1991-04-02　　修回日期: 1991-07-18

织膜按图 1 装入氨气敏电极上。电极放置在 0.2mol/L Na_2HPO_4，pH9.2，含 0.03% NaN_3 缓冲液中浸泡活化 2h，以使生物膜中的酶活性稳定，同时可消除组织中残余游离氨干扰。

1.3 组织中酶活力评估

组织电极浸入 9.5ml，pH9.2，0.2mol/L Na_2HPO_4 缓冲液中，记录电位对时间响应曲线见图2。若记录一条水平基线则电极活化完毕。

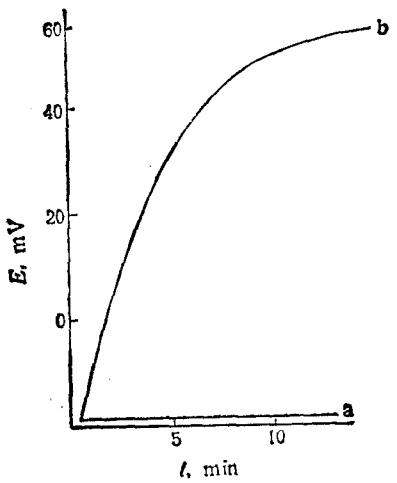

图 2　响应曲线
a. 基线；b. 1.0×10^{-3}mol/L 腺苷(在 0.2mol/L，pH9.2 Na_2HPO_4 中)

随后在该溶液中注入 500μl，0.02mol/L 腺苷标准液，即含 1.0×10^{-3}mol/L 腺苷，电位变化值为 80mV。在中速搅拌下，腺苷分子进入生物催化膜中，腺苷分子在猪肝组织中的腺苷脱氨酶作用下转化为次黄嘌呤核苷和氨，产物氨由氨气敏电极定量检出。酶的活力和电极安装好坏可由响应值或响应速率 $\Delta E/\Delta t$ 大小得到评估。

2 结果与讨论

2.1 缓冲液的选择

以 pH9.2 的0.2mol/L Tris-HCl，K_2HPO_4，硼酸-NaOH 和硼砂-NaOH 4 种缓冲体系为介质，用电极测定 1.0×10^{-3}mol/L 腺苷响应，结果前二者响应较大，可选作电极的缓冲介质，但同时试验了 AMP 和 ATP 均有干扰响应。

2.2 介质 pH 值对组织膜中酶活力影响

生物催化膜电极的最适 pH 依赖于生物催化反应的最佳 pH 和氨电极响应 NH_3 的适宜 pH 的两者综合因素。本文采用 0.2mol/L K_2HPO_4-KH_2PO_4-NaOH 缓冲介质，调节不同 pH 值，在腺苷和 AMP 浓度均为 1.0×10^{-3}mol/L 条件下，测得酶活性即电位响应-pH 关系见图 3。可知在 pH9.2 左右电极具有最大的响应。

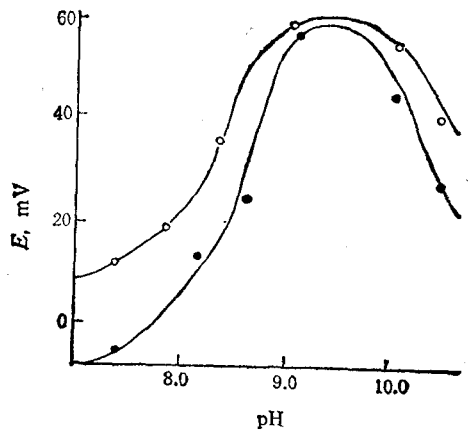

图 3　底物电位响应与 pH 关系
○—○：腺苷　●—●：AMP

2.3 腺苷电极的选择性和干扰试验

由于猪肝组织含多种活性酶，亦包括 AMP 脱氨酶，非特异脱氨酶等，所以在 pH9.2，0.2 mol/L K_2HPO_4，含 0.03% NaN_3 缓冲液中，AMP 和 ATP 对电极均产生严重干扰(见图 4)。但磷酸盐对 AMP 脱氨酶有抑制作用[7]。经试验，当在 pH9.2，2.0 mol/L K_2HPO_4，0.03% NaN_3 介质中，AMP 和 ATP 几乎无响应，酶失去活力，而腺苷仍有良好响应(见图 5)。所以选择 pH9.2，2.0mol/L K_2HPO_4，含 0.03% NaN_3 缓冲液作为腺苷组织电极工作液。

在选定工作液条件下，试验了电极对几种核苷酸，碱基物质和氨基酸干扰程度，结果见表 1，电极具有较好的抗干扰性。

2.4 组织电极的动力学响应行为

图 6 是不同浓度的腺苷在电极上的响应曲线，腺苷底物浓度愈低，则响应时间愈长，4.0×10^{-5}mol/L 和 1.0×10^{-3}mol/L 响应时间分别为 15min 和 8min。本文同时试验了当底物腺

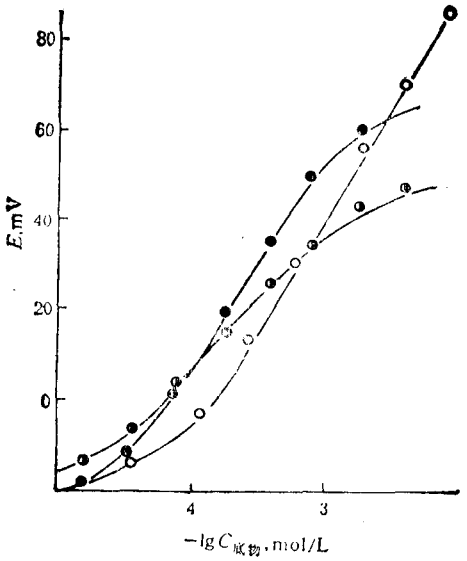

图 4　底物响应曲线
○—○: 腺苷; ●——●: AMP; ◑—◑:ATP

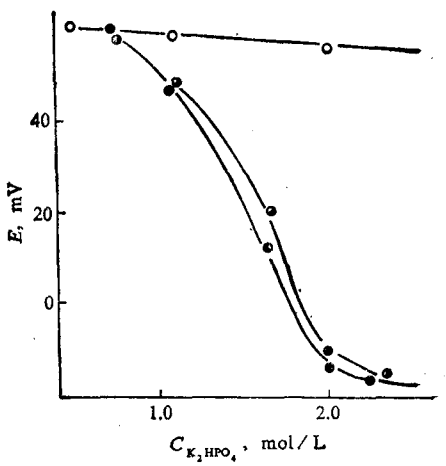

图 5　底物响应电位对 K_2HPO_4 浓度曲线
○—○: 腺苷; ●—●: AMP; ◑—◑:ATP

苷，AMP 和 ATP 浓度均为 1.0×10^{-3} mol/L 时，响应时间分别为 8min，10min 和 20min. 这可能是各种不同底物的生物催化机理不同，造成 ATP 释放 NH_3 代谢步骤较腺苷和 AMP 复杂.

2.5　电极响应特性

在选定工作条件下，电极测定腺苷浓度线性范围为 1.0×10^{-4}—1.0×10^{-2}mol/L，检出限 5.0×10^{-5}mol/L (见图 7).

表 1　腺苷电极抗干扰性试验

响应底物 浓度 1.0×10^{-3}mol/L	无响应底物 浓度 1.0×10^{-3}mol/L
腺苷 $\Delta E = 60$mV	AMP，ATP，ADP，c-AMP，鸟苷，鸟嘌呤，腺嘌呤，甘氨酸 DL-赖氨酸，L-酪氨酸，丝氨酸，L-谷氨酸，L-苯丙氨酸

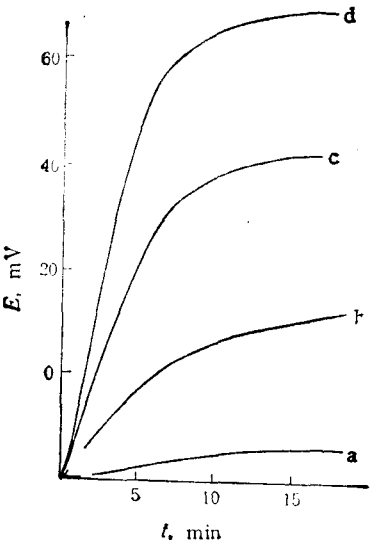

图 6　动力学响应曲线
a. 4.0×10^{-5}mol/L; b. 2.8×10^{-4}mol/L;
c. 1.0×10^{-3}mol/L; d. 4.0×10^{-3}mol/L

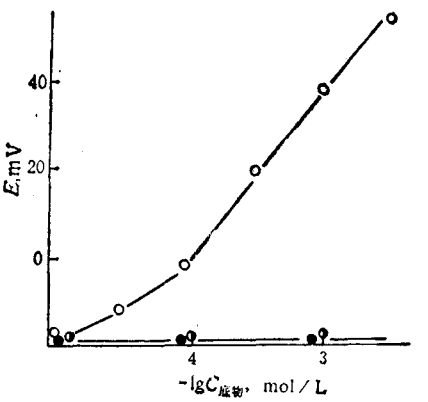

图 7　工作曲线
○—○: 腺苷; ●——●: AMP; ◑—◑: ATP

2.6　电极寿命

组织电极在两次测定之间置于 0.2mol/L K_2HPO_4 含 0.03% NaN_3 防腐剂的缓冲液中，并放入 4℃ 冰箱中保存，每隔一段时间测定电极

响应特性，寿命至少为 40d 以上。

2.7 合成样品测定和回收率

配制含一定浓度腺苷合成样品，其中加入在实际样品常见的干扰物质，如核苷酸类，碱基物质和氨基酸等物质，检测结果满意，回收率在 93.3—102% 之间(表 2)。

表 2 样品检测和回收率

腺苷加入量 mol/L	测得电位值 ($n=7$) 平均值 (mV)	变异系数 (%)	平均回收量 mol/L	平均回收率 %
1×10^{-4}	−0.3	1.40	0.97×10^{-4}	97.0
2.8×10^{-4}	+8.5	1.35	2.85×10^{-4}	102
6.5×10^{-4}	+21.7	1.20	6.40×10^{-4}	98.5
1.2×10^{-3}	+44.1	1.21	1.12×10^{-3}	93.3

参 考 文 献

1 沈同，王镜岩，赵邦悌．生物化学．北京：人民教育出版社，1980：599—601

2 Camici M, Mura U, Corso A D *et al.* *Anal Biochem*, 1987; **166**(2): 253

3 Yoshioka M, Yamada K, Abu-Zeid M M *et al.* *J Chromatogr*, 1987; **400**: 133

4 Deng I, Enke C. *Anal Chem*, 1980; **52**: 1937

5 杭州大学化学系分析化学教研室．分析化学手册，第二分册．北京：化学工业出版社，1982：16—30

6 Rechnitz G A, Arnold M A, Meyerhoff M E. *Nature*, 1979; **278**: 466

7 Ronca-Teston S, Raggl A, Ronca G. *Biochim Biophys Acta*, 1970; **198**: 101

明胶亲和层析纯化人血浆纤维连接蛋白及其糖链结构的初探

查锡良　任常春*　陈惠黎

(上海医科大学生化教研室，上海　200032)

提　　要

应用明胶亲和层析并结合凝胶过滤的方法，纯化人血浆纤维连接蛋白(Fn)，此法仅二步层析，步骤简化且操作简便．纯化的 Fn 经凝胶电泳鉴定为一条蛋白条带，免疫鉴定仍保持原有的抗原性，得率为 36%．用 ConA 亲和层析鉴定纯化的 Fn 分子中糖链结构为 N-连接型复杂型糖链二天线，此均一糖链结果佐证了 Fn 的纯度．还对凝胶过滤分离得到的具有 Fn 抗原性的 Fn 片段进行了讨论．

关键词　纤维连接蛋白，明胶亲和层析，寡聚糖结构，ConA 亲和层析

纤维连接蛋白是一个分子量为 450000 的糖蛋白，广泛存在于细胞间质，包括血浆、组织间液、关节腔滑液等体液，也存在于细胞表面膜[1]．体内诸多细胞可分泌 Fn，纤维母细胞的分泌量尤为突出．Fn 分子中包括各特定结构域，其中有与胶原蛋白专一结合的结构域[2,3]．近年来认为 Fn 含量及其蛋白结构与细胞增殖、分化有一定关系，甚至与恶性细胞的某些行为如接触抑制消失、易转移等有关[4,5]．

为进一步研究 Fn 的生理作用及与疾病的关系等，测定、纯化组织 Fn 是基本而重要的一步．由于血浆 Fn 含量高达 300mg/L，因此被视为最常用的 Fn 来源．以往常用的方法是盐析、离子交换层析等，其得率低且纯度也不令人满意，不符合分子结构及分子中糖链研究的要求．

* 川北医学院

收稿日期：1991-04-27　　修回日期：1991-09-28