

- 9 孙志贤, 党进军, 陈惠鹏等. 生物化学杂志, 1989; 5: 423
- 10 Suzuki F, Umeda Y, Kato K. J Biochem, 1980; 87: 1587

A Convenient Method for the Purification of Neuron Specific Enolase. Guo Jian, Zhang Shiming, Zhou Runqi*, Chen Shigen*, Han Yiping (Department of Respiratory, Chang Hai Hospital, Shanghai 200433, China; *Department of Biochemistry, Fudan University, Shanghai 200433, China).

Abstract A simple and convenient method for the purification of neuron specific enolase

(NSE) from human brain is described through only one DEAE-Sephadex A50 chromatography. The specific activity is 92.1 U/mg and increase of purity 59.4 fold. Certain biophysical and biochemical features were also studied. The molecular weight of the subunit of NSE is 45 000 and pI is 4.7. Amino acid composition analysis showed that NSE is an acidic protein.

Key words neuron specific enolase, purification, biophysical and biochemical features

谷氨酸棒状杆菌尿素传感器的研究*

雷呈宏 包雅芳 邓家祺

(复旦大学化学系, 上海 200433)

摘要 基于脲酶催化尿素分解产生氨, 以氨气敏电极为基础电极, 用含脲酶丰富的谷氨酸棒状杆菌研制成测定尿素的微生物传感器. 在 30℃、pH8.0、0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液中, 该传感器的线性范围为 $1.1 \times 10^{-4} \sim 1.4 \times 10^{-2}$ mol/L, 斜率为 51.2 mV/decade, 检测下限为 1.0×10^{-5} mol/L, 寿命可达 45 d. 考察了传感器响应初速和底物浓度之间的关系, 测定了微生物膜中脲酶的表现米氏常数 K_m 及最大响应初速 v_m .

关键词 谷氨酸棒状杆菌, 尿素, 脲酶, 微生物传感器

自从 Divies^[1]和 Rechnitz 等^[2]分别研制成功第一支电流型和电位型微生物传感器以来, 众多学者竞相研究, 测定组氨酸^[3]、丝氨酸^[4]、酪氨酸^[5]、谷氨酸^[6]、苯丙氨酸^[7]、蔗糖^[8]等的微生物传感器相继出现. 这不仅因为微生物作为生物催化材料, 可以随时培养, 克服了纯酶价格昂贵、难以保存的缺点, 而且和纯酶相比, 微生物酶由于没有失去其依存的细胞生理环境和辅助因子, 因而可以较长时间地保持活性, 其催化底物进行某些生化反应的效果会更好. 文献[9]曾对谷氨酸微生物传感器和酶生物传感器进行了比较研究. 但微生物体内往往含有多种酶, 寻找到含有某种酶, 并能够研制成对其

相应底物有较高灵敏度和较好选择性的传感器的微生物, 并非易事. 近 20 年来, 微生物酶传感器陆续有报道, 但并不多, 到目前为止, 对微生物传感器动力学响应机理仍不清楚.

尿素的测定在临床和其他许多领域均具有重要意义. 尿素可以被脲酶分解而放出氨气, 根据这个原理, 以氨气敏电极为基础电极, 可以制作间接测定尿素的传感器. 谷氨酸棒状杆菌是氨基酸发酵工业中常用的菌株之一, 生长迅速, 使用安全. 使用谷氨酸棒状杆菌作为生

*国家自然科学基金及中国科学院长春应用化学研究所电分析化学开放实验室资助课题.

收稿日期: 1995-01-25, 修回日期: 1995-05-08

物催化材料, 尚未见文献报道. 本研究寻找到一种含脲酶丰富的谷氨酸棒状杆菌 629, 首次用来代替脲酶研制成尿素传感器. 该传感器具有较好的能斯特响应行为, 在 30°C 、 $\text{pH} 8.0$ 、 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液中, 其线性范围为 $1.1 \times 10^{-4} \sim 1.4 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$, 斜率为 51.2 mV/decade , 检测下限为 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, 寿命可达 45 d. 本文还对微生物传感器动力学响应机理进行了初步探讨. 考察了传感器响应初速和底物浓度之间的关系, 结果表明, 谷氨酸棒状杆菌尿素传感器的动力学响应过程和纯的脲酶催化的酶促动力学过程类似^[10~12], 这正是微生物酶体系代替纯酶制作生物传感器的根据; 并测定了微生物膜中脲酶的表现米氏常数 K_m 及最大响应初速 v_m .

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂

501 型氨气敏电极 (江苏电分析仪器厂); PXS-215 型离子活度计 (上海第二分析仪器厂); 3086 型函数记录仪 (日本横河公司, 重庆组装); 20PR-52D 型高速冷冻离心机 (日本日立公司).

试验用试剂均为分析纯以上. 尿素、氨基酸均购自上海生化试剂商店. 试验用水为新制去离子水. 0.1 mol/L 磷酸氢二钠-磷酸二氢钾, 0.05 mol/L 硼砂-磷酸二氢钾缓冲体系按常法配制.

1.2 尿素传感器的制作

谷氨酸棒状杆菌 629 由复旦大学遗传学研究所提供. 微生物 LB 液体培养基组成为: 每 1000 ml 水含多聚蛋白胨 10 g、酵母粉 5 g、氯化钠 10 g、蔡啉酮酸 40 mg. 培养基使用前以 1.1 kg/cm^2 , 121°C 灭菌 20 min.

挑取一环斜面保存的菌种于 2 ml 培养基中, 30°C , 250 r/min, 培养 14 h. 然后以 2% 量转接扩大培养, 30°C , 250 r/min, 培养 20 h. 细菌悬浮液以 7000 r/min, 4°C 离心 6 min. 用 $\text{pH} 7.5$ 、 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液洗涤、离心, 重复两次. 倾去上层清液得菌体沉淀. 称

120 mg 菌体和 120 mg 4% 海藻酸钠, 在载玻片上混匀, 铺成 $1.5 \text{ cm} \times 6 \text{ cm}$ 的菌膜, 浸入 4% CaCl_2 水溶液中固化 1 h. 截取 $\Phi = 10 \text{ mm}$ 的菌膜, 夹心于两片赛璐玢透析膜之间, 贴于氨气敏电极上的气透膜上, 把三层膜一起用氨电极内套管压入外套管, 构成尿素传感器 (见图 1). 内参液为 $0.1 \text{ mol/L NH}_4\text{Cl}$.

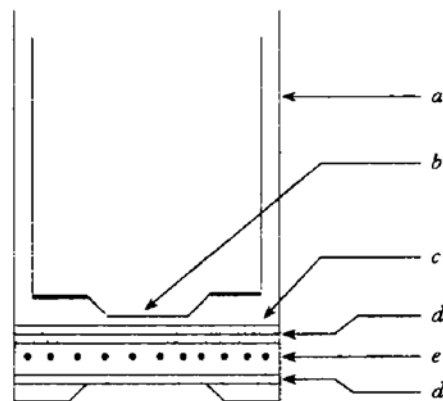


图 1 尿素传感器的结构

a. 氨气敏电极本体; b. 内平板 pH 玻璃电极; c. 氨气敏膜; d. 赛璐玢透析膜; e. 固定化微生物膜.

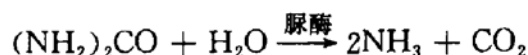
1.3 实验方法

将传感器浸入 10 ml、 0.1 mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液中, 开启离子活度计, 恒温 30°C , 磁力搅拌下, 待空白电位值稳定后, 加入一定量的 0.1 mol/L 尿素, 记录电位-时间响应曲线.

2 结果和讨论

2.1 尿素传感器的基本原理

基于谷氨酸棒状杆菌中含有丰富的脲酶, 催化下述反应:



通过氨电极间接测定尿素.

2.2 实验条件的选择

实验考察了尿素传感器在磷酸盐和硼砂两种缓冲体系中的响应特性. 发现在前者中响应很好, 而在硼砂体系中很差. 这说明缓冲介质不仅起了调节溶液 pH 的作用, 而且对菌体中

的脲酶有激活或抑制作用. 考察了传感器在 $0.1 \text{ mol/L Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲体系中的响应特性, 结果表明, 在 pH 8.0 时, 该传感器响应最佳, 因而定为工作缓冲液 (见图 2).

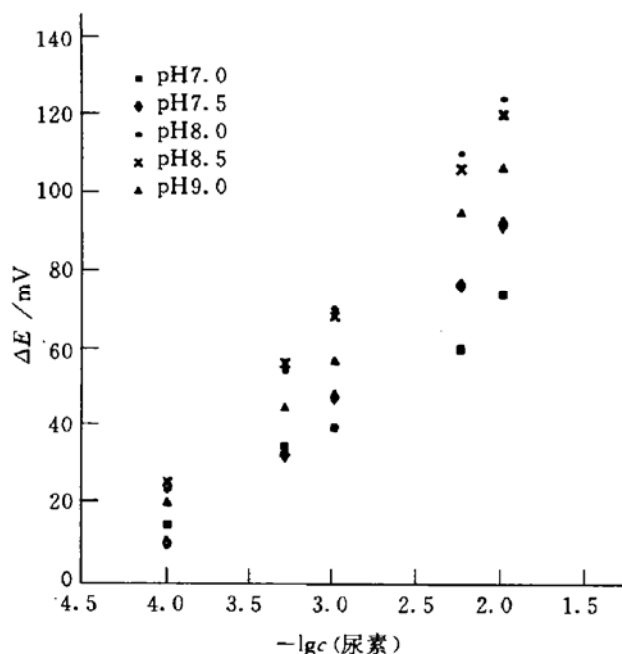


图 2 pH 对尿素传感器的影响

温度为 30°C .

温度低于 25°C 时, 响应较小, 且响应时间过长; 温度高于 35°C 时, 响应不稳定, 且对菌膜寿命不利, 因而以 30°C 为工作温度. 在此条件下, 稳态电位响应时间为 $4\sim 8 \text{ min}$, 说明该传感器对尿素的响应是较快的.

2.3 尿素传感器的响应特性曲线

尿素传感器的响应特性曲线 (见图 3) 的线性范围为 $1.1 \times 10^{-4} \sim 1.4 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$, 斜率为 51.2 mV/decade , 检测下限达 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$. 说明谷氨酸棒状杆菌尿素传感器性能良好, 其测定尿素的灵敏度是较高的. 取 $1.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ 浓度范围内的六份标准尿素样品做回收实验, 平均回收率为 99.7% . 相对标准偏差为 1.81% .

2.4 尿素传感器的选择性

脲酶可专一地催化尿素的分解反应, 但细菌往往含有一些氨基酸脱氨酶. 因而主要考察了尿素传感器对常见氨基酸的响应. 结果表明,

常见氨基酸中只有 L-精氨酸、L-谷氨酰胺、L-天冬酰胺、L-天冬氨酸有响应 (见图 3). DL-丙氨酸, L-赖氨酸, L-亮氨酸, DL-苏氨酸, L-鸟氨酸, L-脯氨酸, 甘氨酸, DL-蛋氨酸, L-组氨酸, L-酪氨酸, DL-色氨酸, DL-苯丙氨酸, L-半胱氨酸, L-谷氨酸, L-缬氨酸, L-丝氨酸无响应.

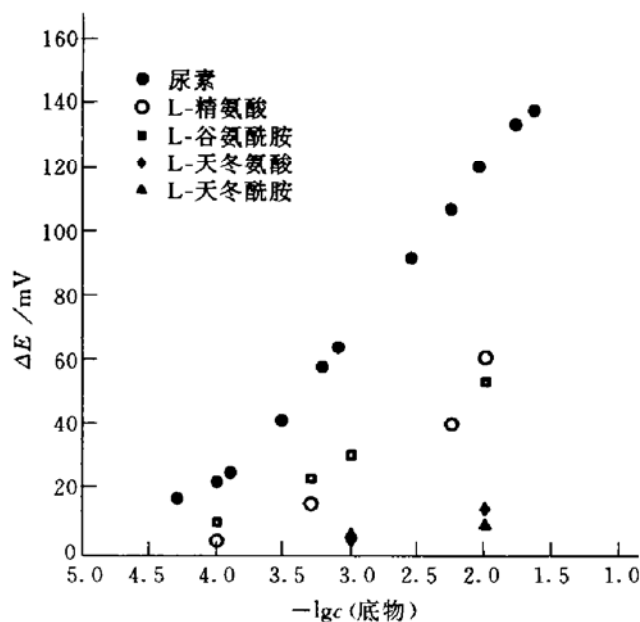


图 3 尿素传感器的工作曲线及对某些氨基酸的响应

2.5 尿素传感器的稳定性

传感器平时浸入 pH 7.5, 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液中, 4°C 冰箱中保存, 隔一定时间测其

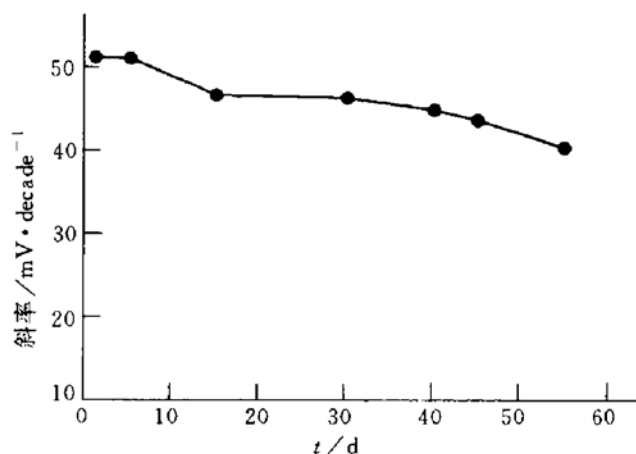


图 4 尿素传感器的稳定性

性能, 45 d 后电位响应还在 90% 以上, 且斜率仍高于 40 mV (见图 4)。

2.6 尿素传感器动力学响应机理的研究

考察了传感器电位初始响应速度和尿素浓度之间的关系, 结果表明在尿素浓度小于 8×10^{-4} mol/L 时, 响应速度和浓度成正比, 此时传感器微生物膜中的酶促反应为一级反应。高于此浓度后, 响应速度上升趋势, 并趋向于一极限值 (见图 5)。说明随尿素浓度的增加, 传感器菌膜中的脲酶渐渐被底物所饱和, 传感器微生物膜中的酶促反应渐趋向于零级反应。这一结果表明, 传感器中微生物酶促动力学反应和纯酶作为生物催化剂的酶促动力学反应的规律类似^[10~12], 这也正是微生物酶体系代替纯酶制作生物传感器的理论根据。说明微生物体内的酶可以不经分离直接作用于底物, 并和底物形成了某种中间过渡态^[12]: 第一步为 $B(E) + S \rightarrow B(E)S$; 第二步为 $B(E)S \rightarrow B(E) + P$ ($B(E)$ 代表微生物细胞中的酶, S 代表底物, P 代表产物)。

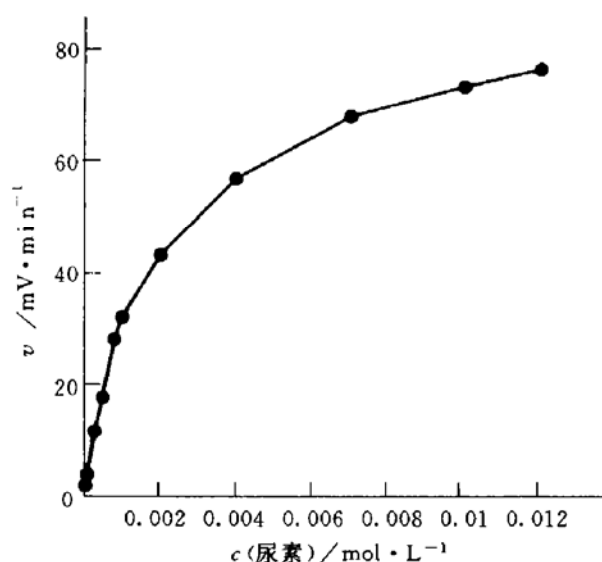


图5 尿素传感器电位初始响应速度和尿素浓度的关系

用 Eadie-Hofstee 法^[12], $v = v_m - K_m(v/[S])$, 求得了尿素传感器的最大响应初速 v_m 和表观米氏常数 K_m 分别为: 91.5 mV/min, 2.25×10^{-3} mol/L。

参 考 文 献

- 1 Divies C. Ann Microbiol, 1975; 126A: 175
- 2 Rechnitz G A, Kobos R K, Riechel S J *et al.* Anal Chim Acta, 1977; 94: 357
- 3 Rodney R W, Barbara E M, Richard P B. Anal Chem, 1980; 52: 1680
- 4 Dipaolantonio C L, Arnold W A, Rechnitz G A. Anal Chim Acta, 1981; 128: 121
- 5 Dipaolantonio C L, Rechnitz G A. Anal Chim Acta, 1982; 141: 1
- 6 Riedel K, Scheller F. Analyst, 1987; 112: 341
- 7 Ihn G S, Kim I T. Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 1989; 21: 223
- 8 Barlikova A, Svorc J, Miertus S. Anal Chim Acta, 1991; 247: 83
- 9 孔继烈, 何 红, 邓家祺. 分析化学, 1993; 21 (131): 251
- 10 Michaelis L, Menten M. Biochem Z, 1913; 49: 333
- 11 Guilbault G G, Smith R K, Jr Montalvo J G. Anal Chem, 1969; 41 (4): 600
- 12 沈 同, 王镜岩, 赵邦梯等. 生物化学 (上册). 北京: 高等教育出版社, 1980: 232

Studies on a Urea Biosensor Based on Immobilized *Corynebacterium glutamicum*. Lei Chenghong, Bao Yafang, Deng Jiaqi (Department of Chemistry, Fudan University, Shanghai 200433, China).

Abstract A new biosensor for urea based on immobilized *Corynebacterium glutamicum* 629, coupling with potentiometric ammonia gas-sensing electrode, was designed and constructed. The calibration plot of mV measurement vs. logarithmic urea concentration was linear in the range $1.1 \times 10^{-4} \sim 1.4 \times 10^{-2}$ mol/L, with slope 51.2 mV/decade in pH 8.0, 0.1 mol/L phosphate buffer at 30°C. The relationship between the initial response velocity and the substrate concentration was also discussed. The results indicate that the kinetic response process of the reaction catalyzed by bacterium is similar to one by isolated enzyme. By using Eadie-Hofstee plot,

the apparent Michaelis-constant (K_m) and the maximum initial response velocity v_m for urease in the immobilized bacteria membrane were determined. The biosensor was relatively sta-

ble for 45 days.

Key words *Corynebacterium glutamicum*, urea, urease, microbial sensor

Gc、Pi 蛋白亚型的快速微量电泳分析

郭尧君 李辛晖

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

黄力力 喻忠义

(公安部第二研究所, 北京 100038)

摘要 用快速微量等电聚焦技术对 190 名北京地区汉族健康人血清 Gc 蛋白亚型、Pi 蛋白亚型进行分型鉴定和基因频率调查。上样量为 1.5 μ l, 电泳和染色各 0.5 h。Gc^{1F} = 0.4891, Gc^{1S} = 0.2432, Gc² = 0.2678, 观察值与期望值吻合良好, ($\sum X^2 = 1.404$, $0.7 < P < 0.8$)。Pi^{M1} = 0.7542, Pi^{M2} = 0.1808, Pi^{M3} = 0.0650, 观察值与期望值吻合也良好, ($\sum X^2 = 1.1233$, $0.7 < P < 0.8$)。

关键词 等电聚焦, 基因频率, Gc 蛋白亚型, Pi 蛋白亚型

型特异成分 (group-specific component, Gc) 又称维生素 D 结合蛋白 (VDBP), 是存在于人血清中的一组生物活性相同、结构相似的 α_2 球蛋白。1977 年, Constans 等^[1]用等电聚焦技术将 Gc 分成 Gc1F, Gc1S, Gc2, Gc2-1F, Gc2-1S, Gc1F-1S 六种表型, 这六种表型由复等位基因 Gc^{1F}, Gc^{1S}, Gc² 控制^[2~4]。Gc 的遗传标记在个体识别及群体进化遗传理论上具有重要意义。

α_1 -抗胰蛋白酶 (α_1 -antitrypsin) 是存在于人血清中的一种丝氨酸蛋白酶抑制剂 (protein inhibitor, Pi)。1965 年, Axelsson 等^[5]与 Fagerhol 等^[6]分别用琼脂糖凝胶电泳技术与酸性淀粉凝胶电泳技术发现并证实了 Pi 的遗传多态性。1974 年, Allen^[7]首次将等电聚焦技术应用于 Pi 分型。至 1989 年已发现 70 多个共显性人血清 Pi 等位基因^[8]。Pi^M 是出现频率较高的等位基因, 被广泛地应用于个体识别、法庭科学及医疗诊断等领域。

用等电聚焦技术对人血清 Gc、Pi 蛋白亚型进行分型鉴定已有不少尝试, 但以往的常规等电聚焦电泳时间长达 3 h^[9,10]。固相 pH 梯度等

电聚焦虽然具有超高分辨率, 但电泳时间更长^[11], 且二者花费较大。本实验旨在摸索快速、微量、简便、经济的方法。

1 材料与方法

1.1 样品

血样采自北京地区健康汉族人 (相互无亲缘关系者) 未抗凝全血。分离血清, -20℃ 保存一个月。

1.2 试剂

1.2.1 凝胶介质: 29.1% 丙烯酰胺和 0.9% N, N'-甲叉双丙烯酰胺为 LKB 公司 1987 年产品。Pharmalyte pH4.5~5.4, pH4.2~4.9 和 PhastGel 4.0~6.5 为 Pharmacia Biotech 公司产品。

1.2.2 Gc 抗血清 (Incstar 公司); 固定液: 20% 三氯醋酸; Gc 染色液: 0.2% 考马斯亮蓝 R250 于 Gc 脱色液中; Pi 染色液: 0.02% 考马斯亮蓝 R350 于 Pi 脱色液中; Gc 脱色液: 甲醇: 冰乙酸: 水 = 4: 1: 5 (体积比);