

[3] 钱露萍等:《植物生理学报》, 5, 49, 1979。
[4] Kay, A. et al.: *Nature*, 219, 267, 1968。
[5] Filner, P.: *Biochim. Biophys. Acta*, 118, 299, 1966。
[6] Garrett, R. H. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 58, 1063, 1967。

[7] Doisy, R. J., et al.: *J. Biol. Chem.*, 217, 307, 1955。
[8] Tager, J. M. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 18, 111, 1955。

[本文于1983年9月19日收到]

生物发光分析中细菌荧光素酶及其与黄酶 在琼脂糖 4B 上固定条件的研究

聂松青

(北京医学院生物物理教研室)

一、引言

生物发光分析中常用的两个发光系统是萤火虫荧光素酶和发光细菌的荧光素酶^[1]。萤火虫酶发光系统已被广泛应用来定量检测各种样品中的 ATP, 细菌发光系统可用来检测 NADH、FMN、乳酸脱氢酶等多种酶和底物。生物发光分析具有特异性强、灵敏度高、速度快等优点。近年来建立的固定酶法, 与可溶性酶法相比, 具有酶可重复使用、稳定性好, 催化效率高^[2]等特点。本文报道细菌荧光素酶及其与黄酶(代替 NADH:FMN 氧化还原酶)用琼脂糖 4B 固定, 各种条件对生物发光分析的影响。

二、材料和方法

化学试剂: 琼脂糖 4B(pharmacia Fine chemicals, Sweden), 溴化氰(Estman chemicals Kodak), 癸醛、BSA(Sigma), NADH、FMN、黄酶均是西德产品。

酶的制备: 细菌荧光素酶是从冰冻的发光细菌(*Beneckea harveryi* strain B-392)按 Baldwin 等的方法分离提纯的^[3]。实验中所用的酶, 在使用前均以 0.1M 磷酸缓冲液(pH7.0)稀释。

1. 酶的固定

(1) 琼脂糖 4B 的活化^[4] 5g 琼脂糖 4B 用水洗涤抽干, 加 10ml 2M K₂CO₃ 在冰浴上搅

拌, 不断加入 CNBr (溶于乙腈)。反应完后, 在玻璃漏斗上用水, 然后用 0.1M 焦磷酸液洗涤抽干。

(2) 酶的固定 活化的琼脂糖 4B 加酶溶液在试管中进行偶联反应, 用 0.1M 磷酸缓冲液(pH7.0, 内含 10⁻⁴M DTT); 0.1M 磷酸缓冲液、10⁻⁴M DTT、1M NaCl pH7.0; 0.1M 磷酸缓冲液, 10⁻⁴M DTT 洗涤。最后悬浮在 1.5ml 0.1M 磷酸缓冲液中(pH7.0)。

2. 生物发光分析

(1) 荧光素酶活性测定 5 μ l 癸醛加 10ml 乙醇制得癸醛储备液。10 μ l 储备液加至 9.99ml 0.1M 磷酸缓冲液中得癸醛缓冲液。取 0.42ml 癸醛缓冲液于小管中, 加 10 μ l 固定酶溶液摇匀, 立即放至 Amico-chem-Glow 光度计上, 通过仪器密封垫向小管内注入事先在钨灯下光还原的 FMN 溶液 100 μ l (1.5 \times 10⁻⁴M FMN, 5 \times 10⁻³M EDTA 溶在 0.1M 磷酸缓冲液中)。FMN 光还原成 FMNH₂。记录产生的相对光强, 计算出固定酶活性。

(2) 黄酶活性测定 参照 Jablonski 的方法进行^[5]。

(3) 荧光素酶、黄酶偶联系统酶活性测定及 NADH 的发光分析 取 0.5ml 癸醛缓冲液, 10 μ l 1.5 \times 10⁻³M FMN, 10 μ l 2 \times 10⁻²M NADH 到分析小管中, 最后加 10 μ l 荧光素酶、黄酶偶

联酶，混合后立即在上述光度计上测量相对光强。

三、结果与讨论

1. 活化剂 CNBr 与琼脂糖 4B 之比对荧光素酶偶联效果的影响 (图 1)。

从图 1 可见 100mg CNBr/g 琼脂糖胶时，荧光素酶活性最大。其原因可能是：当 CNBr 浓度低时，活化的琼脂糖 4B 上的氰酯基—O—CN 较少，能偶联的 NH_2 也就较少，因而固定的酶较少，表现为固定酶活性降低。CNBr 浓度升高时，更多的酶固定在活化的琼脂糖 4B 上，表现为酶活性升高。然而当 CNBr 的浓度超过 100mg/g 胶后，固定酶活性反而降低。因而作者认为，CNBr 浓度过高，在琼脂糖 4B 上会导致产生过多的 —O—CN 基因，与酶偶联时产生多位点结合而使酶变性或失活^[6]，因而用琼脂糖这类多糖作固定剂时，必须选择适当的 CNBr 量。

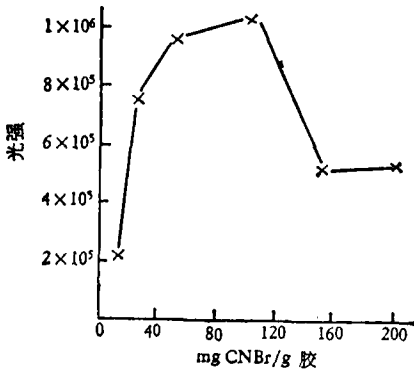


图 1 CNBr 与琼脂糖 4B 之比对偶联酶活性的影响
1g 活化的琼脂糖 4B, 1.3×10^8 光单位
荧光素酶 4℃ 20 小时

2. 酶与琼脂糖 4B 偶联时间、温度对固定酶活性的影响

反应温度为 22℃ 时，偶联进行很快，两小时后达到峰值，这时酶活性最高，此后逐渐下降；反应温度为 4℃ 时，偶联进行缓慢，16—20 小时达到饱和，22℃ 时的峰值大于 4℃ 的饱和值。22℃ 不仅对固定荧光素酶是合适的，而且对固定荧光素酶和黄酶两种酶也得到同样结

果。作者用荧光素酶，黄酶偶联系统分析不同浓度 NADH，测定其发光强度和线性范围，实验结果表明，22℃ 固定 2 小时的酶活性比 4℃ 固定 20 小时要高^[7]，可进行分析的 NADH 线性范围相同 (图 2)。

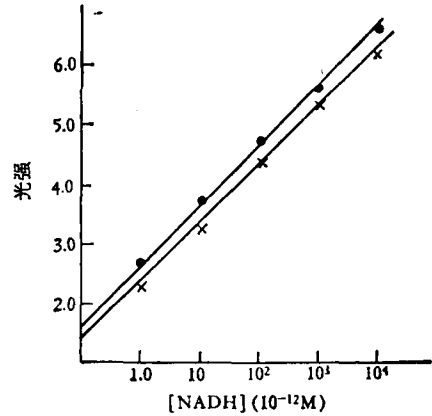


图 2 温度对偶联酶活性的影响
活化的琼脂糖 4B 1g, 2 单位黄酶, 2×10^8 光单位荧光素酶
●—● 22℃ 2 小时, ×—× 4℃ 20 小时

3. 微环境对固定酶活性的影响

在固定酶实验中对比了加 BSA 与不加 BSA 的区别，结果证明若酶的总量为 10mg/g 胶时，酶的回收率只有 1.8%，若在相同条件下加 BSA，使蛋白总量达 20mg/g 胶，则酶的回收率可达 6—10%，酶活性也相应提高。作者认为 BSA 的存在，可使酶在偶联过程中不易产生多位点结合而失活。

4. 两种酶的比例对固定酶活性的影响

本实验为荧光素酶和黄酶的偶联系统。第一组实验保持荧光素酶浓度一定 (2×10^8 光单位/g 胶)，黄酶量从 1 单位—12 单位/g 胶，分析 10^{-12} M NADH 时产生的光强。实验结果如图 3 所示，当黄酶浓度为 2 单位/g 胶时，产生的光强度最大即酶活性最高。

第二组实验固定黄酶量为 2 单位/g 胶，改变荧光素酶的含量从 4×10^7 — 4×10^8 光单位/g 胶，用此偶联系统分析 NADH，其含量从 10^{-13} M 至 10^{-7} M。结果表明 (图 4)，当荧光素酶的浓度为 2×10^8 光单位/g 胶时产生的光强度最大，即酶活性最高。当荧光素酶浓度大于

2×10^8 光单位/g 胶时,即 4×10^8 光单位/g 胶,产生的光强度反而降低,即酶活性降低。可见当固定两种酶时,二者比例适当可提高酶的活性。

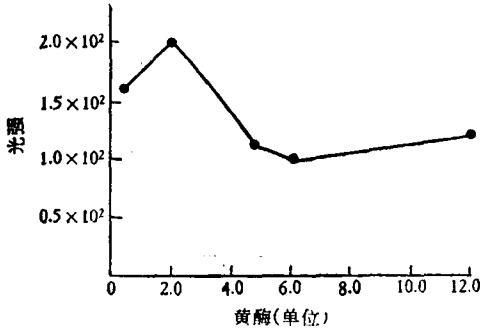


图3 荧光素酶浓度固定、黄酶量不同的偶联酶系统对发光分析的影响

荧光素酶浓度为 2×10^8 光单位/g 胶, NADH 的量为 $10^{-12}M$ 。

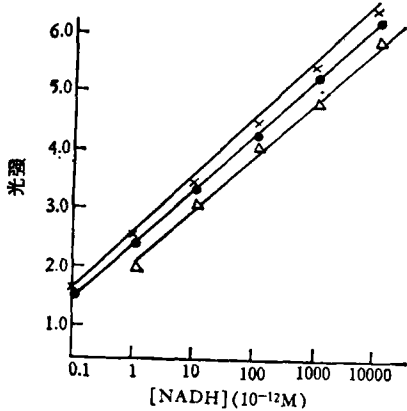


图4 黄酶浓度固定、不同荧光素酶浓度的偶联酶系统对发光分析的影响

荧光素酶浓度: (Δ — Δ), 4×10^7 光单位/g 胶, (\times — \times): 2×10^8 光单位/g 胶, (\bullet — \bullet): 4×10^8 光单位/g 胶

四、结 论

细菌发光系统分析中,可将细菌荧光素酶、黄酶固定在 CNBr 活化的琼脂糖 4B 上, CNBr 的量以 100mg/g 琼脂糖胶效果最好。活化的琼脂糖 4B 与酶偶联,在 $22^\circ C$, 2 小时条件下回收率以及酶活性均为最高。偶联过程加入一定量的 BSA 可防止酶的多位点结合以避免酶失活。当荧光素酶、黄酶同时固定在琼脂糖 4B 上成为偶联酶系统时,其浓度以每克琼脂糖 $4B 2 \times 10^8$ 光单位荧光素酶、2 单位黄酶为最适条件。

本文承林克椿同志审阅,谨表谢意。

参 考 文 献

- [1] Philip, E. S.: In *Bioluminescence and Chemiluminescence* (eds. by Deluca, M. A. and McElvoy, W. D.), p. 275, Academic Press. New York, 1981.
- [2] Jeanne, F. et al.: *Analytical Biochemistry*, 110, 43, 1981.
- [3] Baldwin, T. O. et al.: *J. Biol. Chem.*, 250, 2763, 1975.
- [4] March, S. C. et al.: *Analytical Biochemistry*, 60, 149, 1974.
- [5] Jablonski, E. et al.: in *Methods in Enzymology*, V. 57 p. 202, Academic Press, New York, 1978.
- [6] Jerker, P.: In *Methods in Enzymology* V. 34, 13, 1974.
- [7] Jerker, P. et al.: in *Methods in Enzymology*, V. 44, 19, 1976.

【本文于1983年9月27日收到】

茶花蜂蜜中糖类的分析*

竺安 贺玉珍 于海妮 沙逸仙

(中国科学院化学研究所,北京)

何慧珠

(中国科学院感光化学研究所,北京)

茶树是我国南方大面积种植的主要经济作物,花期长,流蜜量大,是晚秋的丰富蜜源之一,适于放养越冬蜂。我国有茶树两千万亩,油茶

树五千万亩,如都用来养蜂产蜜和王浆,将是一

* 中国医学科学院天津血液研究所许丹枫、徐丽珠同志参加部分工作。