

进行的同位素标记抗体和酶标抗体法能在纸上实现,灵敏地检测出极微量的抗原^[3]。通过转移电泳技术,把聚丙烯酰胺凝胶电泳高分辨率和放射性标记和酶标免疫法的高灵敏度结合起来,产生了一种新的酶标免疫转移电泳,这种方法已用于检测血吸虫病人血清中的极微量抗体^[10,11]等。使转移电泳技术可能成为临床诊断的有力工具。事实上,转移电泳可应用于一切依赖于形成蛋白质-配体复合物的分析检测。

参 考 文 献

[1] Southern, E. M.: *J. Mol. Biol.*; **98**, 503, 1975.
 [2] Alwine, J. C. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **74**, 53, 1977.

[3] Towbin, H. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **76**, 4350, 1979.
 [4] Brain, Bowen, et al.: *Nucleic Acid Res.*, **8**, 1, 1980.
 [5] Sleweg, E. J. et al.: *Nucleic Acid Res.*, **8**, 299, 1980.
 [6] Reinhart, M. P. et al.: *Anal. Biochem.*, **123**, 229, 1982.
 [7] 余贺等:《临床免疫技术》,上海科技出版社,206,1982。
 [8] 欧阳启耀等:《上海第一医学院学报》, **9**, 433, 1982。
 [9] Burnette, W. N.: *Anal. Biochem.*, **112**, 195, 1981.
 [10] Victor C. W. Tsang, 未发表资料。
 [11] 傅奇,朱运松等:《中华医学杂志》, **64**(2), 75, 1984。
 [12] Bittner, M. et al.: *Anal. Biochem.*, **102**, 459, 1980.

[本文于1983年9月22日收到]

测定酶活性的电化学方法及其影响因素

范培昌 单志芳 郭志勤

(华东师范大学生物系,上海)

作者曾用固定化细胞技术分离了人红细胞膜表面蛋白质^[1]。为了能快速、准确、自动连续地测定固定化红细胞膜中乙酰胆碱酯酶(AchE)等各酶的活性,设计组装了一架酶活性电化学测定装置。本文报道试用该装置作测定胆碱酯酶(ChE)纯品的实验结果。

早在1962年, Kramer 等人就报道了一种半微量测定 AchE, ChE, 以及各种硫代胆碱酯的电化学方法^[2]。以后又将该仪器应用于测定高毒性有机磷化物^[3], 葡萄糖氧化酶^[4]、黄嘌呤氧化酶^[5], 以及过氧化物酶与过氧化氢酶类^[6]。并设计了能酶反应连续分析的装置^[7]。在此基础上我们设计组装了酶活性电化学测定装置。

材 料 与 方 法

1. 材料 ChE 系 Psuodo 生产的冻干品, 含量为4单位/毫克。硫代乙酰胆碱碘化物(AcSChI)系上海试剂一厂产品, 纯度98%。其它试剂均用8兆无离子水配制。

2. 仪器设计与组装 用实验室现有设备按图1设计组装而成。整机外貌如图2。需要说明的是:(1)所有电子元件组装在一起, 用有机玻璃制成外壳以防触电(即图2之11)。此部分除附有电极、电源、电压表和记录仪的接线柱, 以及微安表外, 尚附有分别调节恒电流与记录笔所处位置的可变电阻 W_1 和 W_2 。(2)附有

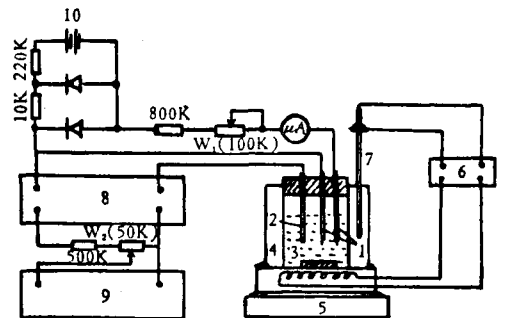


图1 测定酶活性的电化学装置线路设计及组装示意图

1. 铂对电极 2. 饱和甘汞电极 3. 反应池 4. 恒温浴外套
 5. 681型磁力加热搅拌器 6. 晶体管继电器 7. 接触温度计
 8. p1-8型直流数字电压表 9. 笔录式记录仪 10. 直流稳压电源(由DY-1型电泳仪之电源替代, 输出135V)。

恒温浴外套的反应池(图1之3与4),系用玻璃缸改制而成。反应池直径为32mm,高75mm,可装反应液25ml。反应池底部放有电磁搅拌棒。(3)一对铂电极系将铂丝封于玻管制成,铂丝露出玻管外10mm。饱和甘汞电极采用217型。三支电极均固定于反应池胶盖中。为了便于加样,胶塞还开有加样孔。

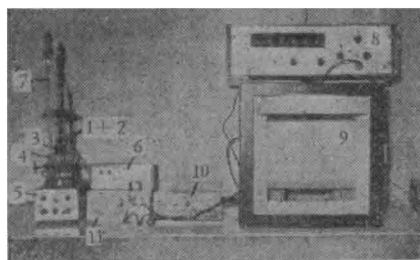
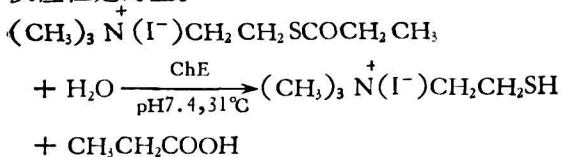


图2 测定酶活性的电化学装置外貌

1-10. 同图1 11. 铂对电极恒电流装置

3. 标准曲线的绘制 本文以ChE活力测定为本法调试范例和探讨影响本法的种种因素。反应池中放入25ml含有0.4mg/ml AcSChI的pH7.4, 0.1M Tris-HCl缓冲液。搅拌下控温于31°C。接通电源,控制输出直流电压为135V。用W₁调恒电流为25μA。接通数字电压表与记录仪,调W₂使记录笔处中心位置(0.45V左右)。调纸速为6000mm/h。此时记录纸上应绘出一直线。半分钟后,加入一定量的ChE溶液(用pH7.4, 0.1M Tris-HCl缓冲液配制)。由于如下反应使AcSChI分解为能引起铂电极去极化的硫代胆碱,从而系统的电压下降,直到酶反应恒定为止。



所记录的曲线如图3实线所示。作图得 $\Delta E/\Delta t$ (图3虚线)。以不同酶浓度(0.004—0.024mg/ml)重复上述实验,所得一系列 $\Delta E/\Delta t$ 值与酶浓度作图,即得一条可求未知酶浓度的标准曲线。

结 果

1. ChE 浓度与其相应 $\Delta E/\Delta t$ 值呈线性关

系 一系列浓度的ChE分别与等量底物在同条件下反应,所得一系列 $\Delta E/\Delta t$ 值与其相应酶浓度作图,二者呈线性关系(图4a)。由此标准曲线可求未知酶浓度。就ChE而言,可测浓度范围在0.016—0.096活力单位/毫升。十几次重复实验表明,本法重现性极好,因此用新鲜酶液最初测得之标准曲线不需要每日更换。

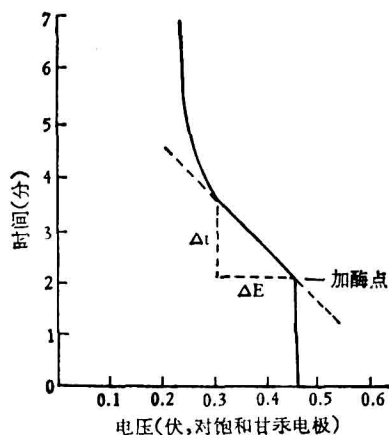


图3 ChE 水解 AcSChI 的电压-时间曲线

2. 底物浓度的影响 当ChE浓度恒定在0.2mg/ml,其它条件与绘制标准曲线相同而只改变AcSChI浓度时,可得图4b所示结果。在低浓度下底物水解速率呈线性变化,随其浓度的继续增加逐渐达最大值。与著名的Michaelis方程符合。图4b也可作为测定未知浓度的AcSChI的标准曲线,测定范围为0.04—0.40mg/ml。

3. 反应液pH的影响 当酶浓度恒定在0.08活力单位/ml,其它条件除反应液pH外均同绘制标准曲线时,所得 $\Delta E/\Delta t$ 与反应液的pH关系曲线(图4c)和Kramer等人的结果相同^[2]。底物的水解速率在碱性环境下相当快。他们认为这是由于底物在碱性溶液中自发水解的结果,认为只有在近中性处所测的水解速率才取决于底物和酶浓度^[2]。我们的实验表明,pH7.4, 0.1M Tris-HCl缓冲液中悬浮之红细胞不会破裂,这对测定完整红细胞表面的AChE活力是有利的(细节另文发表)。

4. 反应池温度及其它因素的影响 除温度外,其它条件和绘制标准曲线时相同(酶浓度恒

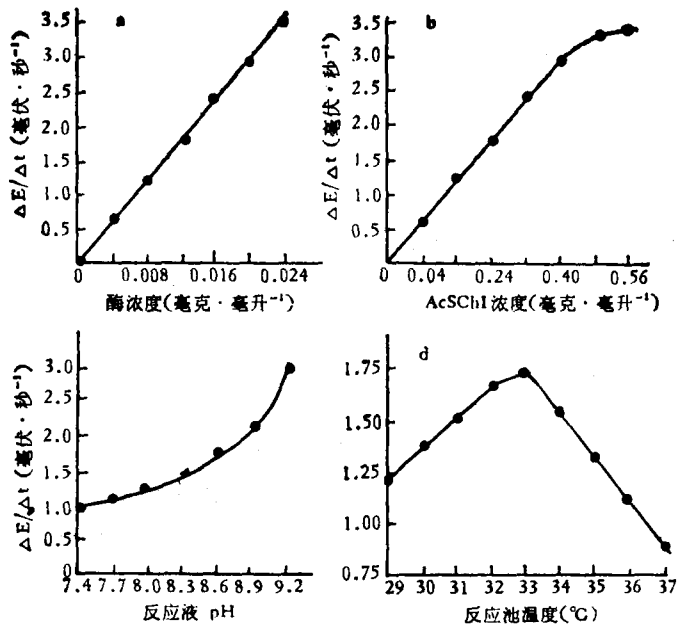


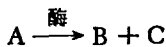
图4 ChE浓度(a)、AcSChI浓度(b)、反应液pH(c)和反应池温度(d)对ChE酶反应的影响

定在0.12mg/ml)。图4d表明,酶反应速率随反应池温度升高而增加,33°C时达最大值,此后随温度的继续升高而迅速的下降。据此,反应最适温度宜选在31°C。此时不仅反应速率较高,且温差若为 $\pm 1^\circ\text{C}$,误差也只在2%内。

又曾试验了一对铂电极间距离,以及对其所供恒电流值对反应之影响。结果表明,铂对电极间距1—2cm内对实验没有影响。至于所供恒电流(试验范围10—100 μA)的实验结果和Kramer所述相同^[2],以选取25 μA 为好。

讨 论

自制的测定酶活性的电化学装置,能用于多种酶或底物之测定^[2-7]。Guilbault曾断言^[6],此法适用于



这类酶促反应,只要产物B和C之任一种具有比底物A有着更大或更小的电活性,或者A是电活性的,而B和C不是者均可^[6]。

本装置曾在不同室温下反复使用达半年之久,各次绘制的标准曲线结果相同,表明本法是稳定的,有良好的再现性。就ChE活力测定而言,最小检出量为4ng/ml(相当于0.016活力单位)。说明本法的灵敏度高于同种酶活测定的

试纸法^[9]和比色法^[9,10],但不及同位素法^[11]。

根据一系列影响因素的试验,用本法测定ChE活力的最适条件应是,pH7.4,0.1M Tris-HCl缓冲液,AcSChI浓度为在0.04—0.4mg/ml反应池温度31°C,铂对电极间距1—2cm,恒电流25 μA 。一次操作仅费时5分钟。需要注意的是每次工作后,铂电极需用滤纸擦净,或用硝酸液清洗。限于本实验室条件,我们制作了可装25ml反应液的反应池。Guilbault曾报道过一种仅装3ml反应液的微量反应池^[6],这样可测更微量的酶溶液。

参 考 文 献

- [1] 范培昌等,《生物化学与生物物理进展》,1982年,第4期,第59页。
- [2] Kramer, D. N. et al.: *Anal. Chem.*, 34, 842, 1962.
- [3] Guilbault, G. G. et al.: *ibid.*, 34, 1437, 1962.
- [4] Guilbault, G. G. et al.: *ibid.*, 35, 582, 1963.
- [5] Guilbault, G. G. et al.: *ibid.*, 36, 606, 1964.
- [6] Guilbault, G. G.: *Anal. Biochem.*, 14, 61, 1966.
- [7] Blaedel, W. J. et al.: *Anat. Chem.*, 36, 343, 1964.
- [8] 上海市医学化验所:《临床生化检验》,人民卫生出版社,第343页,1979年。
- [9] Ellmen, G.: *Biochem. Pharmacol.*, 7, 88, 1961.
- [10] Garum, V. et al.: *Anal. Biochem.*, 86, 324, 1978.
- [11] Reed, D. J. et al.: *ibid.*, 16, 59, 1966.

[本文于1983年9月19日收到]