

酶 法 分 析

〔美〕 G. G. 吉尔鲍特 著

科学出版社

内 容 简 介

本书对现代酶法分析所涉及的各个方面进行了综合与概括,内容比较简明扼要,并搜集了大量有关文献资料。全书共分为八章:概论、测定方法、酶的测定、底物的测定、激活剂与辅酶的测定、抑制剂的测定、固相酶、自动化在酶法分析中的应用。书后附有1972年和1974年的两期《分析化学》中的各种酶分析测定综合一览表。

本书可供工业、农业、医药卫生、国防、环境保护等方面的科技人员及大专院校有关专业的师生参考。

George G. Guilbault

ENZYMATIC METHODS OF ANALYSIS

Pergamon Press

1970

酶 法 分 析

〔美〕 G. G. 吉尔鲍特 著

缪 辉 南 译

*

科 学 出 版 社 出 版

北京朝阳门内大街137号

西安新华印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1977年3月第 一 版 开本: 787×1092 1/32

1977年3月第一次印刷 印张: 12 7/8

印数: 0001—10,920 字数: 289,000

统一书号: 13031·504

本社书号: 745·13—10

定 价: 1.30 元

译 者 的 话

在毛主席的无产阶级革命路线指引下，在无产阶级文化大革命和批林批孔运动推动下，我国社会主义建设各条战线呈现出一派热气腾腾的景象。广大工农兵和革命科技人员意气风发，群众性的技术革新活动蓬勃开展。

随着新工艺、新技术发展的要求，以及大搞综合利用的需要，近年来，我国酶制剂的生产与应用亦和其它各项工作一样突飞猛进，它在工业、农业、医药卫生、国防事业等方面的应用日渐扩大。同样，酶作为一种分析试剂的应用也随之日益增长，酶法分析能解决某些特定物质的极其微量之测定，它具有灵敏度高、特效性好诸优点。随着现代最新技术的发展与邻近学科的渗透，酶法分析亦越来越受到有关方面的广泛重视，并业已成为一种行之有效的分析技术。为了适应这方面工作发展的需要，遵照毛主席关于“洋为中用”的教导，特将《酶法分析》一书译出，以供有关部门参考。

本书著者虽对现代酶法分析所涉及的各个方面进行了综合性概括，搜集了大量有关文献资料。内容叙述尚较简明扼要；但是也存在一些错误。译者对一些不妥之处作了力所能及的更正与适当的删除，有的加了译注。希望读者在参阅过程中，以辩证唯物主义的观点加以分析，批判地吸收。

酶学发展日新月异，利用各种酶对各式各样的物质进行分析测定的文章和专著已有大量发表。为了便于读者了解近来的一些资料，译者又选译了一九七二年与一九七四年的两期《分析化学》(Analytical Chemistry)中的各种酶分析

测定综合一览表，作为本书的附录。

译稿经丁前星、周镜谭等同志分别作了勘阅；邹承鲁同志指出了原著中的差错；张龙翔同志对动力学部分作了审阅；最后，又惠承沈昭文同志热情指导，对全文进行了校正。在此，谨向这些同志表示衷心感谢。

由于译者水平有限，经验不足，加之挤于工作之暇，时间所限，诚然主观上尽了最大努力，但译文中难免还会有这样或那样的缺点与错误，恳切地盼望广大工农兵读者和从事这方面应用与研究的科技工作者给予批评指正。

缪辉南

一九七四年五月一日于北京

前 言

酶在分析化学中的应用大有潜力。酶的专一性能解决大多数分析化学工作者极为首要的问题：即当分析中混杂有各种同类的物质时，尚能测定出其中某一物质，而不受干扰。酶法灵敏度可测定到 10^{-10} 克这样微量的物质。

多年来，酶催化反应已被用于分析测定底物、激活剂、抑制剂以及酶本身。然而，直止不久之前，由于酶在应用上所伴有的缺点，严重地限制了它的有效用途。酶用于分析上常被列举的缺点有：酶源补给困难、稳定性差、精密度低以及操作繁琐。这些缺点在早先是无可否认的，但现在，很多酶已被制成纯品，有很高的比活力，而且价格亦合理。当然，酶的不稳定性总会带来一定的风险，但是，如果了解了这种不稳定性并采取适当的预防措施，那么这种困难是能够减少到最小限度的。至于，精密度差、速度缓慢以及操作费事这些缺点，曾使得酶催化反应作为一种分析方法来说不那么引人注目，这主要的仍是由于方法与技术上的缘故，并非酶本身的缺陷。

由于有了新的、更灵敏的酶法分析技术：诸如固相酶的出现，使酶的成本与供应有所改善，以及快速而准确的酶法分析自动化系统的进展。因而酶正在成为分析工作者常用而满意的试剂。过去几年中，在这个领域里所发表的科学论文大幅度增加，亦就清楚地说明了这一点。

写这本书的目的，在于概括现代酶法分析的各个方面。第二章介绍酶作为试剂与酶催化反应分析方法的普遍性问题。下面四章论述各种特定的酶有关测定方法以及用酶来测定底

物、激活剂与抑制剂。最后二章讨论酶的固相化方法与酶促反应的自动化分析。我期望：本书所提供的资料将使所有从事于这方面研究与发展的工作者引起关注，并有所促进。

G.G. 吉尔鲍特

目 录

译者的话	(ix)
前 言	(xi)

第一章 概 论

一、酶法分析原理	(1)
二、酶的性质	(2)
三、影响酶反应速度诸因素	(4)
1. 酶浓度的影响	(5)
2. 底物浓度的影响	(5)
3. 激活剂的影响	(6)
4. 抑制剂的影响	(7)
(1) 可逆抑制	(8)
(2) 不可逆抑制	(9)
5. 温度的影响	(11)
6. pH的影响	(11)
7. 离子强度的影响	(13)
四、浓度测定	(13)
1. 总变化法或平衡法	(14)
2. 动力学法	(15)
五、生化试剂处理	(16)
六、酶活性	(17)
参考文献	(18)

第二章 测定方法

一、化学方法	(20)
--------------	------

二、仪器方法	(20)
1.测压法	(21)
2.分光光度法	(21)
3.旋光测定法	(24)
4.电化学法	(25)
(1) 离子选择性电极	(25)
(2) 微电流电位法	(26)
(3) 电流法	(26)
(4) 电量法	(28)
(5) 极谱法	(28)
5.荧光法	(29)
6.放射化学法	(31)
参考文献	(32)

第三章 酶的测定

一、概述	(35)
二、水解酶	(35)
1.淀粉酶	(35)
2.胆碱酯酶	(36)
(1) 测压法与pH法	(36)
(2) 比色法	(37)
(3) 电化学法	(38)
(4) 荧光法	(39)
(5) 放射测量法	(45)
3.纤维素酶	(45)
4.胰凝乳蛋白酶	(47)
5. β -葡萄糖苷酶与半乳糖苷酶	(49)
6. β -葡萄糖醛酸苷酶	(51)
7.透明质酸酶	(51)
8.脂肪酶	(53)
9.磷酸酯酶	(53)

10. 尿素酶	(62)
三、氧化酶	(63)
1. 氨基酸氧化酶	(63)
2. 过氧化氢酶	(65)
3. 葡萄糖氧化酶	(68)
4. 过氧化物酶	(72)
5. 黄嘌呤氧化酶	(73)
四、脱氢酶	(76)
1. 概述	(76)
2. 乳酸脱氢酶	(80)
3. 6-磷酸葡萄糖脱氢酶	(81)
4. 谷氨酸脱氢酶	(81)
5. α -羟基丁酸脱氢酶	(82)
6. 醇脱氢酶和甘油脱氢酶	(83)
7. 苹果酸脱氢酶	(83)
五、激酶与转氨酶	(84)
六、其它酶	(87)
参考文献	(87)

第四章 底物的测定

一、概述	(99)
二、糖类	(99)
1. 葡萄糖	(99)
(1) 用己糖激酶测定	(99)
(2) 用葡萄糖氧化酶测定	(100)
(i) 测量耗氧量	(101)
(ii) 用过氧化物酶测定	(102)
(iii) 其它方法	(103)
(3) 用其它酶测定	(104)
2. 半乳糖	(104)

3.果糖	(106)
4.蔗糖	(107)
5.糖原	(108)
6.其它糖类	(109)
三、胺类	(111)
1.用二胺氧化酶测定	(111)
2.用单胺氧化酶测定	(112)
3.用尿素酶测定尿素	(113)
四、氨基酸	(115)
1.用D-氨基酸氧化酶测定D-氨基酸	(115)
2.用L-氨基酸氧化酶测定L-氨基酸	(116)
3.用L-氨基酸脱羧酶测定L-氨基酸	(119)
4.L-谷氨酸的测定	(121)
(1) 用谷氨酸脱氢酶测定	(121)
(2) 用谷氨酸-丙酮酸转氨酶测定	(122)
5.L-丙氨酸的测定	(122)
6.L-门冬氨酸的测定	(123)
7.肌酸的测定	(123)
五、有机酸	(124)
1.乙酸	(124)
2.丁酸及其羟基衍生物	(125)
3.DL-柠檬酸与D-异柠檬酸	(126)
4.甲酸	(131)
5.延胡索酸	(133)
6.透明质酸	(133)
7.L-乳酸	(134)
(1) 用Ⅰ型乳酸脱氢酶和辅酶Ⅰ(NAD)测定	(134)
(2) 用酵母乳酸脱氢酶(Ⅳ型)测定	(135)
8.L-苹果酸	(135)
9.琥珀酸	(136)

六、羟基化合物、酯类及醛类	(137)
1.乙醇与脂肪族醇	(137)
(1) 用醇脱氢酶测定	(137)
(2) 用醇氧化酶测定	(137)
2.甘油与二羟基丙酮	(138)
(1) 用甘油脱氢酶测定	(138)
(2) 用甘油激酶测定甘油	(140)
3.羟基丙酮酸	(140)
4.丁二醇	(141)
5.山梨糖醇	(141)
6.甘油三酸酯	(142)
7.苯酚类	(142)
8.黄嘌呤与次黄嘌呤	(142)
9.类固醇	(144)
(1) 3 α -羟基类固醇脱氢酶	(144)
(2) 3 β -, 17 β -羟基类固醇脱氢酶	(144)
(3) 11 β -羟基类固醇脱氢酶	(144)
(4) 20 β -羟基类固醇脱氢酶	(144)
10.酯类的检定与测定	(145)
七、无机物质	(146)
1.过氧化物	(146)
2.氨	(146)
3.硝酸盐	(147)
4.羟胺	(147)
5.二氧化碳	(147)
6.磷酸盐	(148)
7.焦磷酸盐	(148)
参考文献	(149)

第五章 激活剂与辅酶的测定

一、概述	(158)
------------	-------

二、无机物质的测定	(158)
1. 镁、锰及锌的测定	(158)
2. 钡的测定	(161)
3. 氧的测定	(162)
4. 氰化物、硫化物及碘化物的测定	(163)
5. 其它物质的测定	(163)
三、辅酶的测定	(165)
1. 概述	(165)
2. 黄素单核苷酸	(165)
3. 黄素腺嘌呤二核苷酸	(165)
4. 辅酶 I * (NAD) 与还原型辅酶 I (NADH)	(167)
5. 辅酶 II * (NADP) 与还原型辅酶 II (NADPH)	(168)
6. 用酶促循环法测定辅酶 I (NAD) 与辅酶 II (NADP)	
.....	(169)
7. 5'-三磷酸腺苷 (ATP)	(171)
(1) 用荧光素酶测定	(171)
(2) 用己糖激酶与 6-磷酸葡萄糖脱氢酶测定	(172)
(3) 用磷酸甘油酸激酶测定	(172)
8. 5'-二磷酸腺苷 (ADP) 与 5'-单磷酸腺苷 (AMP)	
.....	(173)
9. 磷酸肌酸	(174)
(1) 用己糖激酶测定	(174)
(2) 用荧光素酶测定	(174)
参考文献	(175)

第六章 抑制剂的测定

一、概述	(178)
二、无机物质的测定	(180)
1. 概述	(180)
2. 葡萄糖氧化酶	(182)

3. 葡萄糖苷酶	(182)
4. 透明质酸酶	(184)
5. 转化酶	(185)
6. 异柠檬酸脱氢酶	(186)
7. 肝酯酶	(188)
8. 过氧化物酶	(189)
9. 碱性磷酸酯酶	(192)
10. 尿素酶	(193)
11. 黄嘌呤氧化酶	(194)
12. 其它酶系	(195)
三、杀虫剂的测定	(195)
1. 抗胆碱酯酶化合物 (有机磷化合物与氨基甲酸酯化合物) 的测定	(195)
2. 根据碳酸酐酶的抑制测定 DDT	(201)
3. 根据脂肪酶的抑制, 测定含氯杀虫剂与其它杀虫剂	(202)
4. 用磷酸酯酶测定杀虫剂	(205)
四、其它有机化合物的测定	(206)
1. 与巯基结合的化合物	(206)
2. 肝素	(206)
3. 抗坏血酸	(207)
4. 中性去污剂——三通 X-100	(207)
5. 其它化合物	(207)
参考文献	(208)

第七章 固相酶

一、概述	(213)
二、淀粉凝胶固相法	(214)
1. 概述	(214)
2. 固相胆碱酯酶的制备	(214)

3. 凝胶固相酶的性质与 应用	(215)
4. 抑制剂的自动 检测	(217)
(1) 电化学法	(217)
(2) 荧光法	(219)
三、聚丙烯酰胺凝胶固相法	(221)
1. 概 述	(221)
2. 凝胶的制备 (Hicks 和 Updike 法)	(221)
3. 凝胶的 性 质	(222)
4. 尿素电极的 制 备	(226)
5. 其它的 研 究	(227)
四、酶的其它固相法	(228)
1. 概 述	(228)
2. 与高聚物骨架 (Polymeric Lattices) 的共价键结合	(229)
(1) 不溶性的胰蛋白酶与胰凝乳蛋白酶	(229)
(2) 不溶性的木瓜蛋白酶	(230)
五、未来的应用	(231)
参 考 文 献	(232)

第八章 自动化在酶法分析中的应用

一、概述	(235)
二、起始斜率法	(236)
三、固定浓度 (变化时间) 法	(237)
四、固定时间法	(240)
参 考 文 献	(254)

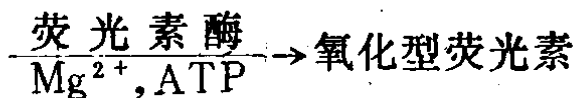
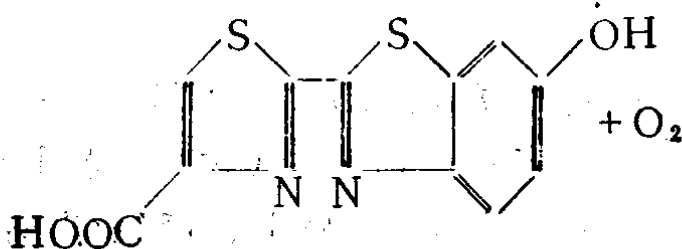
附录 各种酶的分析测定综合一览表	(256)
------------------------	-------

第一章 概 论

一、酶法分析原理

酶乃是一种生物催化剂,它能够催化赖以维持生命,而且系在常温下进行的许多复杂的化学反应。由于酶是在复杂的生命体系里进行工作的,所以其显著的特性之一,即是反应的专一性。一种酶惟能催化特定的底物进行特定的反应,即使存在该底物的异构体,或者结构类似的其它化合物也不起反应。

以荧光素酶为例,由此说明酶对特定底物的选择性,此酶能催化荧光素(I)起氧化作用,从而生成氧化型荧光素⁽¹⁾。经对结构类似荧光素的许多化合物进行全面的研究后,实验证明,此酶仅与荧光素起催化氧化反应,于是,此反应才出现绿色的荧光。倘若在荧光素分子内增添另一个羟基,或者取代一个氨基,则会导致酶促反应发生改变,因而却观察不到绿色荧光的出现。



葡糖氧化酶能催化 β -D-葡萄糖氧化成葡糖酸,这种酶具有更高的选择性。在所研究过的 60 种可氧化的糖类及其衍生物中,一些研究工作者⁽²⁾发现只有 β -D-葡萄糖、2-脱氧-D-

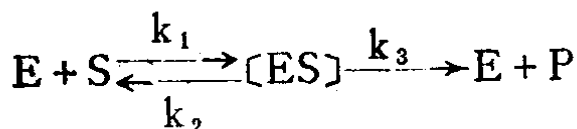
葡萄糖与6-脱氧-氟代-D-葡萄糖能以明显的速度被氧化。D-葡萄糖的 α -型异构体催化氧化的速度较之 β -型异构体催化氧化速度的0.6%还要小⁽²⁾。

酶还表现出对于某一特定反应具有选择性。若是不用生物催化的途径来测定葡萄糖，而是将葡萄糖溶液同过氯酸铈之类的氧化剂一起加热，则将会出现许多副反应，除了葡糖酸之外，还会得到其它的副产物。然而，若用葡糖氧化酶的话，于是，仅在室温与pH7的条件下，催化作用将是如此有效，以至于其它热力学上可能发生的反应速度皆可被忽略不计。

酶的这种选择性及其在低浓度下催化底物反应的能力，这在分析化学中乃是大有用途的。酶的催化反应早已用于对底物、激活剂、抑制剂以及酶本身的测定。Osann⁽³⁾在1845年就应用过氧化物酶来测定过氧化氢的含量。在19世纪已采用酶法来测定糖类。早在四十年代，Warburg⁽⁴⁾曾介绍了一种基于使辅酶还原而以光度法来测量辅酶I (NAD) 和辅酶II (NADP) 的方法。加之新近发展的电化学法和荧光法，于是，酶法分析业已成为公认的一项分析技术。

二、酶的性质

酶与其底物反应的基本方程式乃是由Michaelis与Menten二氏所提出的。此反应机理是：底物S与酶E结合形成中间络合物[ES]，随之，分解出产物P，并释放出酶。



由于酶仅使底物转化为产物，而本身在反应过程中并不消耗，所以酶乃是一种真正的催化剂。

形成络合物[ES]的平衡常数 K_m 称之为Michaelis氏

常数(简称米氏常数)。它的定义为 $(k_2 + k_3)/k_1$ 。于是,反应初速度 V_0 为酶与底物浓度的函数(等式 1):

$$V_0 = V_{\text{最大}}[S]_0 / (K_m + [S]_0) \quad (1)$$

式中 $[S]_0$ 系底物的初始浓度,而 $V_{\text{最大}}$ 则为最大反应速度。

当酶的浓度固定时,则反应速度随之底物浓度的增加而增加,直至底物浓度过剩到不再影响反应速度的范围为止(图 1-1)。此后,增添更多的底物,却也不使速度再增加(此时的浓度在下文中简称为非限速过量底物浓度*)。设 $V = V_{\text{最大}}/2$, $[S] = K_m$, 则可求出 K_m 。

等式(1)的倒数是:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\text{最大}}[S]} + \frac{1}{V_{\text{最大}}} \quad (2)$$

$1/V_0$ 对 $1/[S]$ 作坐标图应得一直线(图 1-2),其截距为

$\frac{1}{V_{\text{最大}}}$, 斜率为 $K_m/V_{\text{最大}}$ 。这坐标图系由 Line weaver 与

Burk(5) 二氏提出的图解法,乃是测定 K_m 值最常用的方法。

米氏常数——酶和底物形成的络合物的一种歧化常数**,即是酶反应程度的一项可佳的定量指标。 K_m 值越小,则表示酶和底物的反应亦就越趋于完全。

另一项作为酶反应速度的指标乃谓之 k_3 常数,即酶-底物的络合物转化为产物的一种常数。它跟 V 成线性关系,并与酶浓度相关:

$$V_{\text{最大}} = k_3[E] \quad (3)$$

因此,知道了酶浓度与最大反应速度($V_{\text{最大}}$),就能够计

* 此俗语在下文中出现多处,但往往因简称而使其含意尚欠明确,故在此加以引注。——译者

** 一般应认为是一种解离常数。——译者