

工具酶的活力测定

蒋传葵 金承德 吴仁龙 陶东哲 编著

33

每科学技术出版社

内 容 简 介

本书着重介绍生化研究、临床生化、生化分析等工作中常用的五十五种工具酶和辅酶的活力测定方法,并收集了它们的某些物理化学数据,以供参考。本书偏重实用,书中罗列的方法大部分经作者多年实践检验,成熟可用,读者参照本书即能进行工具酶的活力测定。附录内有蛋白质浓度的测定方法和常用缓冲液的配方,为测定提供方便。

本书可供工业、农业、医药卫生、国防、环境保护各领域中从事临床化学、食品化学、药物化学、生物化学和免疫学等工作的有关科技人员及大专院校师生参考。

工具酶的活力测定

蒋传葵 金承德
吴仁龙 陶宗晋 编著

上海科学技术出版社出版

(上海瑞金二路450号)

新华书店上海发行所发行 无锡县人民印刷厂印刷

开本 787×1092 1/32 印张 5.5 字数 117,000

1982年11月第1版 1982年11月第1次印刷

印数 1—4,600

统一书号: 13119·1033 定价: (科五) 0.64元

缩 写 符 号

A	光吸收	EDTA	乙二胺四乙酸
AChE	乙酰胆碱酯酶	FAD	黄素腺嘌呤二核苷酸
ADH	醇脱氢酶	GAPDH	甘油醛-3-磷酸脱氢酶
ADP	腺苷二磷酸	GOD	葡萄糖氧化酶
Ald	醛缩酶	G-6-P	葡萄糖-6-磷酸
AMP	腺苷-磷酸	G-6-PDH	葡萄糖-6-磷酸脱氢酶
ATP	腺苷三磷酸		
BAEE	N-苯甲酰-L-精氨酸乙酯	GPT	谷丙转氨酶
BTEE	N-苯甲酰-L-酪氨酸乙酯	GTP	鸟苷三磷酸
CHL	碳酸酐酶	HAse	透明质酸酶
CK	肌酸激酶	HK	己糖激酶
Co I	辅酶 I	L-AOD	L-氨基酸氧化酶
Co II	辅酶 II	LAP	亮氨酸氨肽酶
CPA	羧肽酶 A	LDH	乳酸脱氢酶
CPB	羧肽酶 B	MAO	胺氧化酶
CS	柠檬酸合成酶	MDH	苹果酸脱氢酶
CTS	过氧化氢酶	NAD	辅酶 I
D-AOD	D-氨基酸氧化酶	NADH	还原辅酶 I
DNA	脱氧核糖核酸	NADP	辅酶 II
DNase	脱氧核糖核酸酶	NADPH	还原辅酶 II
DPN	辅酶 I	PK	丙酮酸激酶
DPNH	还原辅酶 I	POD	过氧化物酶
DTNB	二硫代双硝基苯甲酸	RNA	核糖核酸
		RNase	核糖核酸酶

TAME	对甲苯磺酰-L-精氨酸甲酯	TPP	氯化硫胺素焦磷酸盐 (辅羧酶)
TNBS	三硝基苯磺酸	Tris	三羟甲基氨基甲烷
TPI	胰蛋白酶抑制剂	UTP	尿苷三磷酸
TPN	辅酶II	XOD	黄嘌呤氧化酶
TPNH	还原辅酶II		

目 录

缩写符号

一、概说	1
1. 酶的定义和特性	1
2. 酶活力的定义和表示方式	2
3. 初速度	3
4. 测定酶活力的注意点	6
二、各种酶的活力测定	9
1. 醇脱氢酶(ADH) (EC 1.1.1.1)	9
2. 乳酸脱氢酶(LDH) (EC 1.1.1.27)	11
3. 苹果酸脱氢酶(MDH) (EC 1.1.1.37)	14
4. 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6-PDH) (EC 1.1.1.49)	16
5. 葡萄糖氧化酶(GOD) (EC 1.1.3.4)	19
6. 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (EC 1.2.1.12)	22
7. 黄嘌呤氧化酶(XOD) (EC 1.2.3.2)	25
8. L-氨基酸氧化酶(L-AOD) (EC 1.4.3.2)	27
9. D-氨基酸氧化酶(D-AOD) (EC 1.4.3.3)	29
10. 胺氧化酶(MAO) (EC 1.4.3.4)	31
11. 尿酸氧化酶(URICASE) (EC 1.7.3.3)	33
12. 过氧化氢酶(CTS) (EC 1.11.1.6)	36
13. 过氧化物酶(POD) (EC 1.11.1.7)	38
14. 谷丙转氨酶(GPT) (EC 2.6.1.2)	40
15. 己糖激酶(HK) (EC 2.7.1.1)	43
16. 丙酮酸激酶(PK) (EC 2.7.1.40)	46
17. 肌酸激酶(CK) (EC 2.7.3.2)	48

18. 脂肪酶(EC 3.1.1.3)	51
19. 乙酰胆碱酯酶(AChE) (EC 3.1.1.7)	54
20. 果胶酶(EC 3.1.1.11)	57
21. 碱性磷酸酶(EC 3.1.3.1)	60
22. 酸性磷酸酶(EC 3.1.3.2)	62
23. 磷酸二酯酶 I (EC 3.1.4.1)	65
24. 脱氧核糖核酸酶 I (DNase I) (EC 3.1.21.1)	67
25. 核糖核酸酶 T ₁ (RNase T ₁) (EC 3.1.27.3)	69
26. 核糖核酸酶 A (RNase A) (EC 3.1.27.5)	72
27. α -淀粉酶(EC 3.2.1.1)	74
28. β -淀粉酶(EC 3.2.1.2)	76
29. 纤维素酶(EC 3.2.1.4)	79
30. 溶菌酶(EC 3.2.1.17)	82
31. 神经氨酸苷酶(唾液酸酶)(EC 3.2.1.18)	84
32. β -葡萄糖醛酸苷酶(EC 3.2.1.31)	87
33. 透明质酸酶(HAse) (EC 3.2.1.35)	89
34. 氨肽酶(胞浆) (EC 3.4.11.1)	92
35. 氨肽酶(微粒体) (EC 3.4.11.2)	94
36. 羧肽酶 A (CPA) (EC 3.4.17.1)	97
37. 羧肽酶 B (CPB) (EC 3.4.17.2)	99
38. 胰凝乳蛋白酶(EC 3.4.21.1)	101
39. 胰蛋白酶(EC 3.4.21.4)	104
40. 激肽释放酶(EC 3.4.21.8)	107
41. 枯草杆菌蛋白水解酶(EC 3.4.21.14)	110
42. 木瓜蛋白酶(EC 3.4.22.2)	112
43. 胃蛋白酶(A)(EC 3.4.23.1)	114
44. 尿素酶(脲酶) (EC 3.5.1.5)	117
45. 氨基酰化酶(EC 3.5.1.14)	119
46. 精氨酸酶(EC 3.5.3.1)	125

47. 醛缩酶(ALD) (EC 4.1.2.13)	128
48. 柠檬酸合成酶(CS) (EC 4.1.3.7).....	131
49. 碳酸酐酶(CHL) (EC 4.2.1.1).....	133
50. 胰蛋白酶抑制剂(TPI)	135
51. 辅酶 I (NAD) (DPN)	138
52. 还原辅酶 I (NADH) (DPNH)	141
53. 辅酶II(NADP) (TPN)	143
54. 还原辅酶II (NADPH) (TPNH)	146
55. 氯化硫胺素焦磷酸盐(辅羧酶) (TPP)	149
三、附录	152
(一)蛋白质浓度的测定方法	152
(二)常用缓冲液的配置	155
四、英文索引	163

一、概 说

1. 酶的定义和特性^[1]

酶普遍存在于生物体(动物、植物和微生物)中,是生物体内起催化作用的蛋白质。由于酶的存在使生命赖以存在的很多化学反应能在生理条件(常温、常压和中性的环境)下迅速完成。酶具有一般催化剂的共性,即只改变化学反应达到平衡的时间,而不改变平衡点。此外,酶还有其本身的特点:(1)酶有很高的催化效率。生物体内的许多化学反应,在体外没有酶存在的情况下,几乎都不能进行,然而在体内有酶催化的情况下可以在常温、常压和中性的环境下迅速完成。例如:碳酸酐酶催化水和二氧化碳的水合反应,在一秒钟内一个碳酸酐酶分子可以使 10^5 个二氧化碳分子与水分子发生水合反应,其效率之高是惊人的。(2)酶具有高度的专一性。一种酶只能作用于某一种底物或某一类底物。例如:脲酶只能作用于脲,其他化合物一概不能作用,这是绝对专一性。此外,还有作用于某一类化合物的。例如:L-氨基酸氧化酶,它能作用于所有L-型的氨基酸,但不能作用于D-型的氨基酸,这叫做族专一性。(3)酶作为一种蛋白质,它具有一般蛋白质的共性,即容易变性和失活。紫外线、强酸、强碱、高温、有机溶剂

和变性剂等都会引起酶的变性。酶变性以后,生物活性丧失,因而在制备和保存酶制剂时要特别注意这一点。在使用酶时一般首先要了解一下酶是否已经失活,这就需要对酶进行活力测定。

2. 酶活力的定义和表示方式^[2]

大多数酶都不象常用的无机或有机催化剂那样用百分比或克分子来表示酶的含量。酶存在的量是通过测定它所催化的反应速度来定量的,在适当条件下,酶所催化的反应速度正比于酶量。

酶量常用酶活力单位表示。所谓酶的活力单位(简称酶单位 U),就是酶在一定的作用条件下,单位时间内作用物的消耗量或产物的生成量。酶含量可以用每克酶制剂或每毫升酶制剂含有多少酶单位来表示(U/g 或 U/ml)。

在实际测定中,酶单位往往与所用的测定方法、底物的特性和反应条件等因素有关,因此对同一种酶由于采用不同的测定方法而有不同的单位。为了避免混乱,经过各国科学家的努力已使各种酶的活力单位得以标准化。1959 年国际生物化学协会酶学委员会和国际纯化学与应用化学协会临床化学委员会接受了 Racker 等人的建议,采用了“国际单位”表示酶活力。“国际单位”的定义为:在 25℃,以最适底物浓度,最适缓冲液的离子强度,以及最适 pH 值等条件下,每分钟能催化消耗一微克分子(μ mole)底物的酶量定为一个活力单位。由于制订了“国际单位”,就有可能将各种酶制剂或来源不同的同种酶制剂加以比较。

为了比较酶制剂的纯度,往往采用比活力作为一个指标,所谓比活力是表示每毫克酶蛋白所具有的酶活力单位,用 U/

mg 蛋白表示。比活力是酶的生产和研究过程中经常使用的基本数据，用来比较每单位重量酶蛋白的催化能力。比活力越高，表示酶越纯。

Katal (Kat) 单位是 1972 年国际酶学委员会推荐的一个新的酶活力国际单位。1 Kat 单位定义为：在最适条件下，每秒钟能使 1 mole 底物转化的酶量；同样能使 1 micromole 底物转化的酶量为 microkatal (μ Kat) 单位；以此类推，有 nano Katal (n Kat) 和 pico Katal (p Kat) 等。

Kat 单位与国际单位的换算如下：

$$\begin{aligned} 1 \text{ Kat} &= 1 \text{ mole/秒} = 60 \text{ mole/分} \\ &= 60 \times 10^6 \mu \text{ mole/分} = 6 \times 10^7 \text{ U} \end{aligned}$$

$$1 \text{ U} = 1 \mu \text{ mole/分} = \frac{1}{60} \mu \text{ mole/秒}$$

$$= \frac{1}{60} \mu \text{ Kat} = 16.67 \text{ n Kat}$$

3. 初 速 度^[3]

酶的活力是用酶所催化的化学反应的速度来表示的，因此测定酶活力实际上就是测定为酶所催化的化学反应的速度。与一般催化反应相同，酶促反应速度可以用单位时间内底物的减少或产物的增加来表示。酶反应的过程若用产物生成和时间的关系作图（图 1），反应速度即为图 1 中曲线的斜率，在反应开始时反应速度可以保持一定值，可是随着时间的增加，反应速度逐渐降低，造成这一现象的可能因素很多，如：底物浓度的降低和产物浓度的增加而加速了逆反应的进行；产物的抑制作用；酶的失活等等。因此为了准确表示酶活力，就必须采用图 1 中曲线的直线部分即反应的初速度。在一定

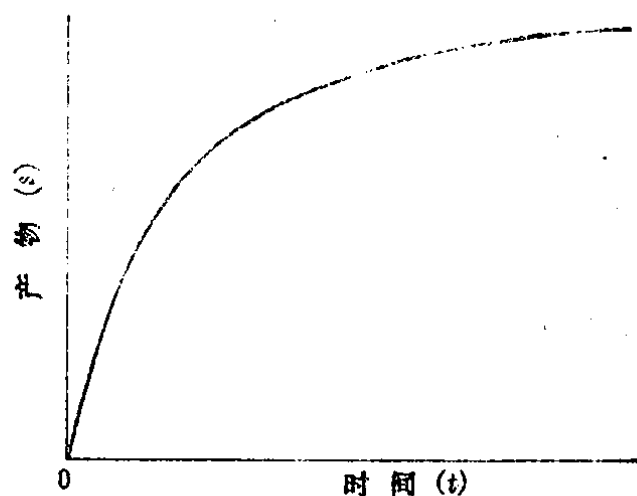
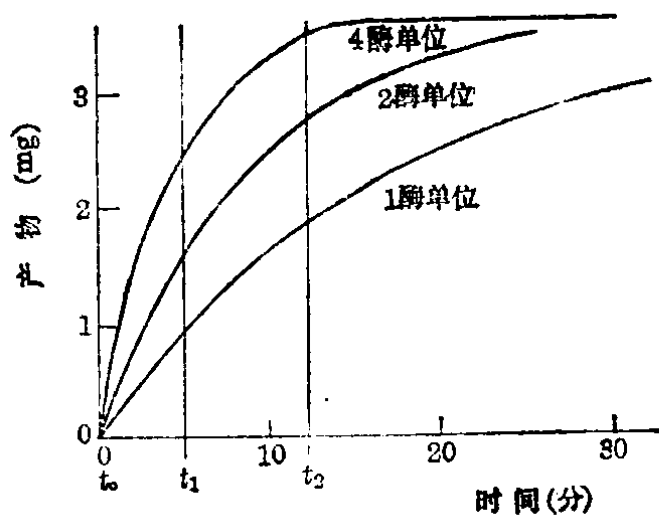


图 1 酶反应过程

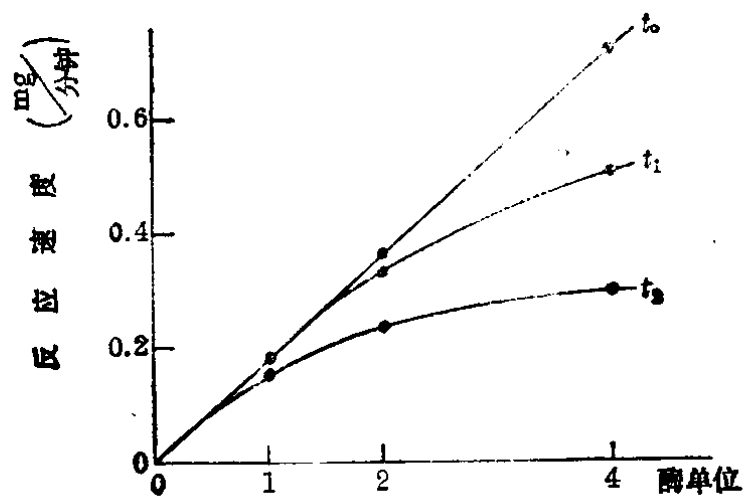
条件下, 只有用初速度表示反应速度时, 反应速度和酶量才可能有正比例的关系。

图 2, a 是不同酶量的酶反应过程曲线, 图 2, b 是不同时间的反应速度和酶量的关系曲线。可以看出, 只有在反应的初速度阶段, 反应速度才正比于酶量, 因此只有用初速度表示酶活力才能准确地代表酶制剂中酶的含量。但是并不是所有情况下用初速度表示酶单位都一定正比于酶量的, 例如图 3 中举出的是属于在初速度阶段速度与酶量不成正比的例子。因此, 为了得到正确的测量结果, 一般取三个酶浓度来测定反应初速度。以初速度对酶浓度作图, 如果是线性关系, 这说明你选择的条件是合适的, 这样计算得到的酶活力才正确, 如果初速度与酶浓度不成线性关系, 那么酶样必须进一步稀释或找其他原因。总之在后面诸酶的测定中酶样必须稀释成“适当浓度”, 这个“适当浓度”的含意即在这个浓度范围内取三个酶浓度测得的反应速度和酶浓度成正比。

在实际测定过程中, 为了保证测得的是初速度, 往往使底物浓度足够大, 把酶完全饱和。这样整个酶反应对于底物来说



a



b

图 2 不同酶量的酶反应过程

a. 不同酶量的酶反应过程曲线; b. 反应速度与酶量的关系曲线

是零级反应，而对于酶来说是一级反应。这样测得的初速度可以比较可靠地反映酶的含量，但是对某些会受过量底物抑制的酶就不能这样做，因此底物也要选择最合适的浓度。一般说来，测酶活力时，酶要稀一些，底物要适当地过量一些。

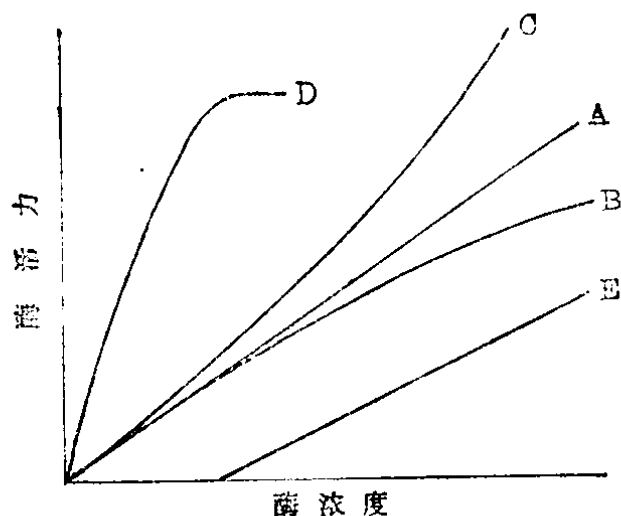


图 3 酶活力和酶浓度的关系

A. 表示正常的反应曲线; B. 有两种情况: (1)以非线性部分来计算酶活力; (2)酶制剂中含有酶的抑制剂; C. 酶制剂中含有激活剂; D. 底物不够, 在反应过程中耗尽; E. 体系中存在着一一定量的失活剂如重金属离子等

4. 测定酶活力的注意点^[4]

(1) 必须将影响酶反应速度的因素恒定在最适当的数值

影响酶反应速度的因素很多, 前面谈到的底物浓度是一个因素, 温度对反应速度影响也很大, 酶促反应速度的温度系数 $\geq 10\%/1^{\circ}\text{C}$ 即温度变化 10°C 就要引起反应速度测定中的 100% 的误差。所有的酶的活力都受 pH 影响, 因此都要选择最适当的 pH 范围, 某些酶的 pH 范围可能很窄。pH、温度等反应条件对底物浓度的选择也有影响。总之, 应将这些因素综合考虑, 选择最佳测定条件。

(2) 酶空白 要测准酶活力, 扣除正确的空白值是重要的。空白值往往通过底物中杂质、酶制剂中杂质或其他参加反应的试剂引起的。如果测定过程中要终止反应, 那么空白的做法可先加终止反应的试剂后加酶, 这样扣除的空白较全面。如果测定中不终止反应, 则可做多种空白, 其他试剂都和

样品管相同, 只缺底物的“酶空白”或其他试剂都和样品管相同而只缺酶样的“底物空白”等等, 这些空白都应扣除, 但在某些空白值很小的情况下可忽略不计。

(3) 酶浓度的选择 通常测定时, 酶样要充分稀释, 使反应很慢地进行, 这样有利于测定反应速度, 反应速度慢可使过程中底物浓度的变化小到可以忽略不计。酶样品稀释到怎样的程度才叫适当呢? 取 3 个不同酶量测得的初速度和酶量之间为正比关系, 这样的酶浓度范围就是适当的。

(4) 偶联酶反应 第一个酶反应产物为第二个酶反应的底物, 这样两个酶系统在一起反应即为酶的偶联反应。如果第二个反应过程中引起参与反应的物质发生光吸收的变化 (例如 NAD 和 NADP 的还原或 NADH 和 NADPH 的氧化), 则第一个反应速度的测定就可以用第二个反应中引起的光吸收的变化来表示, 利用偶联反应简化测定工作是酶分析中常用的手段。例如:



以上两个反应如果偶联起来, 第一反应中的 GPT (谷丙转氨酶) 就可以用紫外分光光度法来测定其活力, 但是有一个必要的前提, 第二个反应速度必须比第一个反应快很多倍, 以 K_1 表示第一反应的反应速度常数, K_2 表示第二个反应的反应速度常数, 理论上讲当 $K_2:K_1=1000:1$ 时, 测得的速度才能真正表示第一反应的速度, 当 $K_2=1000 K_1$ 时, $V_{\text{偶联酶}}=0.993 V_{\text{第一反应}}$ 则误差为 0.7%。

(5) 杂酶分析 有些很难提纯的酶制剂往往会有一些杂酶存在。对于特定的实验要求, 某些杂酶可能有害, 另一些杂

酶可能无害或害处很小, 因此只要杂酶不影响实验的进行或把酶量控制在一定的范围内使用时, 杂酶的影响不显著, 这样的酶制剂还是可以用的。这就要求对酶进行杂酶的分析, 一般进行杂酶分析主要是测定一些有害杂酶的含量。例如: 蛇毒磷酸二酯酶制剂, 往往含有一些磷酸单酯酶, 因此在测定二酯酶活力后, 一般也测一下制剂中磷酸单酯酶的活力。这两种数据都表示酶的质量情况。杂酶含量一般也以每毫克酶蛋白含有多少活力单位来表示, 也有人用相对于主酶活力的百分比来表示的。

(6) 其他 测定酶活力的反应除特别规定外, 一般在 25°C 进行, 酶样应放在 4°C 或更低温度保存。反应之前, 酶和底物应预先在反应温度下平衡, 这样使试样一混合即达到反应温度。实验中应全部用重蒸水, 避免其他离子对酶反应的影响。

参 考 文 献

- [1] Dixon, M. and Webb, E. C. (1979), *Enzymes*, 3rd ed.
- [2] CRC Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, 3rd ed.
- [3] Plummer, D. T. (1978), *An Introduction to Practical Biochemistry*, 2nd ed.
- [4] Bergmeyer, H. U. (1963), *Methods of Enzymatic Analysis* Academic Press, N. Y.

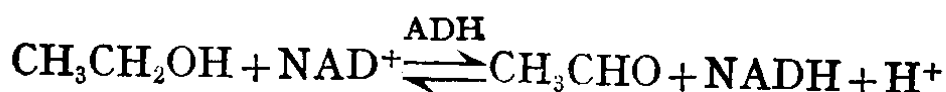
二、各种酶的活力测定

1. 醇脱氢酶

ALCOHOL DEHYDROGENASE (ADH)

EC 1. 1. 1.1 Alcohol: NAD⁺ oxidoreductase

催化反应



存在和性质

醇脱氢酶在哺乳动物的组织内,以肝和肾中含量较高;在微生物中以酵母中含量最丰富,一般从面包酵母提取。

每个醇脱氢酶分子含有四个 NAD⁺ 分子和四个锌原子及约三十六个游离的巯基。

〔溶解度〕 溶解于水和稀缓冲液中,一般溶解于 pH 7.5 的 0.01 M 磷酸盐缓冲液。

〔稳定性〕 此酶的冷冻干粉在 -20℃ 贮存,可稳定一年。干粉状态加入蔗糖可增加其稳定性;溶液状态加入 0.1% 牛血清白蛋白可增加其稳定性。

〔分子量〕 148,000(面包酵母); 80,000(马肝)

〔最适 pH〕 7.9(0.05 M Na⁺)

〔等电点〕 pH 5.4(酵母); pH 4.0(鼠肝微粒体)

pH 8.5(鼠肝细胞浆); pH 5.6(鼠肝线粒体)

〔激活剂〕 Na⁺

〔抑制剂〕 重金属离子、NADP、ADP、AMP

〔光谱性质〕 $A_{280nm}^{1\%} = 12.6$ (1 cm 光径)(酵母)

活力测定

〔原理〕 醇脱氢酶催化乙醇氧化为乙醛, 同时辅酶 I 被还原。还原辅酶 I 在 340nm 处有一吸收峰值, 用紫外分光光度计测定反应过程中 340nm 处光吸收的增加, 以还原辅酶 I 在 340nm 处克分子消光系数计算出每分钟还原辅酶 I 量的变化来表示酶活力。

〔单位定义〕 在 25℃, 每分钟能催化产生 1 微克分子产物的酶量为 1 单位。

〔试剂〕

① 底物溶液: 95% 乙醇溶液。

② 0.05 M pH 8.8 焦磷酸盐缓冲液。

③ 0.01 M pH 7.5 磷酸盐缓冲液, 内含 0.1% 牛血清白蛋白(4℃)。

④ 0.015 M 辅酶 I 溶液。

⑤ 待测酶溶液: 将待测的酶用试剂③溶解, 并稀释至适当的浓度。

〔测定方法〕

在 25℃ 恒温条件下, 取二支试管, 按下表操作步骤加入试剂, 反应总体积为 3.0ml。然后, 使用紫外分光光度计, 选择波长为 340 nm, 用 1cm 光径的比色杯测定光吸收值: 以重