

现代酶法分析

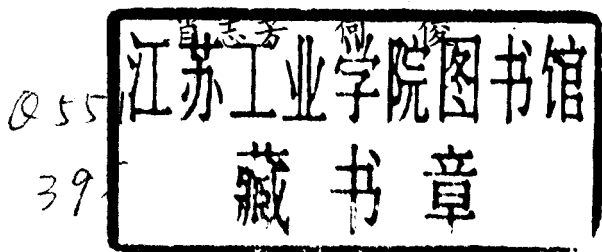
主编 / 李毓琦

北京医科大学
中国协和医科大学
联合出版社

现代酶法分析

主编 李毓琦

编写 李毓琦 魏素萱



北京医科大学
中国协和医科大学 联合出版社

[京]新登字 147 号

图书在版编目(CIP)数据

现代酶法分析/李毓琦主编. —北京:北京医科大学中
国协和医科大学联合出版社, 1994

ISBN 7-81034-426-9

I. 现… II. 李… III. 酶放射化学 IV. R372

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (94)第 07810 号

现代酶法分析
李毓琦 主编
责任编辑:蒋长亨

北京医科大学 联合出版社出版
中国协和医科大学

四方计算机照排中心排版

北京昌平精工印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行

787×1092 毫米 1/32 印张 7.5 十字 166

1994 年 12 月第 1 版 1994 年 12 月北京第 1 次印刷

印数:1—2000

ISBN 7-81034-426-9/R · 425

定价:11.90 元

前 言

酶法分析是近年发展迅速的一门学科,专家们利用酶的高度选择性和催化放大作用,巧妙地将其与一些灵敏度高的分析手段结合起来,以提高原有分析方法的灵敏度和特效性。在酶工程技术及其产品不断开发,酶的纯化、固定化技术日趋完善,商品酶日益增多的今天,酶法分析应用于临床检验、食品、环境等生物及其它样品的检测将越来越广泛。为使更多的同行掌握酶法分析技术,作者根据多年研究与教学工作的积累与体会,并参考了国内外的有关资料共同撰写了《现代酶法分析》一书。

全书共分8章。除第1、2章为酶法分析与酶学基础以外,其余各章分别较详细地叙述了酶联电化学、光度、荧光、化学发光、免疫、放射分析等的原理与技术。全书重视科学性、系统性与新颖性,遵循理论与实践相结合的原则,系统介绍各种方法的原理、仪器结构、应用实例与应用一览,以便读者使用。

本书可作为医药卫生、工农业、环境保护各领域中从事临床检验、药物、食品、生化免疫分析及酶工程技术的广大科技工作者的参考书与继续教育教材,并可作为医药院校、综合性大学生物、生物专业、轻化工学院食品专业以及农业院校相关专业的教材。

本书由华西医科大学李毓琦教授主编并编写第1、3、6章,第2章由魏素萱,4、5章由肖志芳,7、8章由何俊编写;华西医科大学刘秉文教授主审。

本书在编写过程中,得到华西医科大学化学部同仁们的

热情支持,陈开全同志曾参加部分工作,雷厚成、简锡贤、吴国正同志协助抄写与绘图,在此一并致谢。

限于编者水平,书中可能存在错误与不妥之处,衷心欢迎读者批评指正。

编 者

1993 年 10 月

目 录

1 酶法分析概述	(1)
1.1 酶法分析的特点及其应用	(1)
1.2 酶法分析的原理	(8)
2 酶学基础	(14)
2.1 酶的概念	(14)
2.2 酶的分类和命名	(20)
2.3 酶的催化机理	(22)
2.4 酶催化反应动力学	(26)
3 酶联电极法与酶电极法	(41)
3.1 酶联电极法	(41)
3.2 酶电极法	(53)
4 酶联分光光度分析法	(72)
4.1 光及物质对光的选择性吸收	(72)
4.2 光的吸收定律	(76)
4.3 分光光度计	(77)
4.4 光度定量分析方法	(78)
4.5 酶联分光光度法应用实例	(81)
5 酶联荧光分析法	(99)
5.1 荧光分析法的基本原理	(99)
5.2 荧光定量分析方法	(105)
5.3 荧光计	(114)
5.4 酶联荧光分析法应用实例	(118)
6 酶联发光分析法	(129)
6.1 发光分析法的基本原理	(129)

6.2	发光值的测量与测量仪器	(141)
6.3	酶联发光分析法应用实例	(145)
7	酶联免疫分析法	(156)
7.1	酶联免疫分析法的基本原理	(156)
7.2	酶联免疫分析法的特点	(157)
7.3	标记酶的种类与酶标记方法	(157)
7.4	材料与试剂	(165)
7.5	各种酶联免疫分析法	(168)
8	其它酶联分析方法	(206)
8.1	酶联测压法	(206)
8.2	酶联旋光测定法	(210)
8.3	酶联放射分析法	(216)
中英文索引		(221)

1 酶法分析概述

酶是高效、专一的生物催化剂,以其高度选择性及在低浓度下能催化底物反应的能力,在分析化学中具有广泛的应用价值。

酶的催化反应早已应用于工农业生产及医药、卫生、食品等检验中。Osann 于 1845 年首先应用从麦芽提取的过氧化物酶以愈创木酚作指示剂来测定过氧化氢的含量。随后有人采用酵母提取液中的转化酶作为试剂,测定蔗糖的含量。本世纪 40 年代,Warbury 曾介绍一项基于使辅酶还原,以光度法测量辅酶 I (NAD)与辅酶 I (NADP)的方法,这就是早期的酶法分析。以后,随着现代仪器分析方法的日益发展,酶法分析不仅与光度法结合,也与电化学法、荧光法、化学发光法、免疫分析法及放射性同位素法等结合,从而形成了现代酶法分析这一独立的学科。随着各种生物制剂分离提纯工艺的日趋完善,大量价格合理的商品酶已进入市场,酶法分析将逐渐成为常规的分析手段。目前,酶法分析与微机结合组装的酶法自动生化分析仪,已有数十种进入临床检验与工业生产在线分析。

1.1 酶法分析的特点及其应用

酶法分析通常包含两方面的内容:即酶的活性测定与采用酶作为分析试剂测定其它物质。

1.1.1 酶法分析的特点

酶法分析较非酶分析技术有两个主要的优点,即专一性

与灵敏性。所谓专一性是指酶往往仅对同系物中的一种或少数几种化合物具有催化活性,对其余共存物质则无作用。这就可以避免生物试样中众多共存物质对分析的干扰,减少了繁杂的预处理或分离过程。在排除与被测物质结构紧密相关的化合物,例如对映体对分析的干扰上,此一优点就显得更为突出。酶促反应的专一性,同时也体现在其催化反应很少引起副反应发生,从而使分析结果更为准确可靠。例如,氧化法测定葡萄糖含量时,若应用无机试剂过氯酸铈作催化剂,将同时产生较多的副反应;改用葡萄糖氧化酶作催化剂,则热力学上其它可能发生的反应均可忽略不计。此外,酶法分析中还常采用多酶偶联定量法,以进一步提高其专一性。例如,使用己糖激酶与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶偶联,可专一检出葡萄糖,而使果糖等己糖不干扰葡萄糖的测定。酶法分析的另一特点是灵敏度高,能检测 $\text{pg}(10^{-12}\text{g})$ 至 $\text{ng}(10^{-9}\text{g})$ 级的底物、激活剂或抑制剂。酶法分析之所以具有较高的灵敏度主要是由于酶的催化放大作用较强。

1.1.2 酶法分析的应用

酶法分析主要应用在以下两个方面。

1.1.2.1 底物激活剂与抑制剂的测定 以酶作为分析试剂以测定不同的底物激活剂与抑制剂;目前,在生化分析、临床检验、环境卫生、制药及食品工业等方面均已广泛应用。例如,应用葡萄糖氧化酶测定血糖,应用多胺氧化酶测定癌标物质多胺,应用 β -半乳糖苷酶测定乳糖食品中的乳糖等。医药及食品工业上,为了在线分析监控产品质量,往往将酶固定化,制成酶膜或酶柱,以便反复使用。例如将青霉素 β -内酰胺酶制成酶膜,固定在pH电极上,用作药厂生产青霉素的质控在线监测;应用固定化转化酶-变旋酶-葡萄糖氧化酶测定蔗糖等。图

1-1 是制药及食品工业的在线酶法分析示意,表 1-1 为酶作为分析试剂的应用。

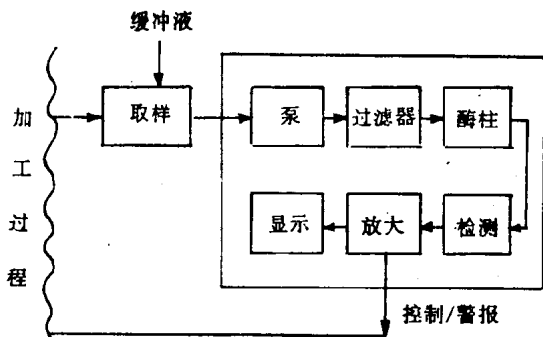


图 1-1 固定化酶应用于药品及食品工业在线分析示意

表 1-1 酶作为分析试剂的应用

被测物质	酶试剂	常用方法
乙醛	醛脱氢酶	光度法
乙酸(乙酰磷酸)	乙酸激酶	光度法、电位法
氨基酸类	氨基酸氧化酶	电极法
	氨基酸脱氢酶	光度法
	氨基酸脱羧酶	荧光法
	胆碱脂酶	荧光法
乙酰胆碱和胆碱	胆碱脂酶	荧光法
单胺类	单胺氧化酶	电极法、荧光法
肉毒碱	肉毒碱乙酰基转移酶	酶偶联光度法
	转移酶	
尿素	尿素酶	酶电极法
亚硝酸盐	亚硝酸还原酶	电极法
过氧化物	过氧化物酶	化学发光法
腺嘌呤	黄嘌呤氧化酶	酶偶联荧光法
	过氧化物酶	
腺苷	腺苷脱氨酶	电极法、光度法
青霉素	青霉素 β -内酰胺酶	电极法

续表

被测物质	酶试剂	常用方法
氧自由基	超氧化物歧化酶	光度法、荧光法
抗原类	辣根过氧化物酶	酶联免疫吸附分析法
Mn^{2+} 、 Mg^{2+} (激活剂)	异柠檬酸脱氢酶	光度法
Mg^{2+} (激活剂)	荧光素酶	化学发光法
Zn^{2+} (激活剂)	氨基肽酶	光度法
有机磷化物(抑制剂)	乙酰胆碱脂酶	恒 pH 值法
葡萄糖	葡萄糖氧化酶	光度法、电极法
果糖	ATP、磷酸己糖异构酶	光度法、电极法
蔗糖	转化酶、变旋酶	光度法、电极法、旋光法
半乳糖	β -半乳糖苷酶	光度法、电极法
葡萄糖酸	ATP、葡萄糖酸-6-磷酸脱氢酶	光度法、电极法
淀粉	葡萄糖淀粉酶	光度法、电极法
甘油三酯	ATP、磷酸烯醇式丙酮酸激酶	光度法
醇	乙醇脱氢酶	电极法、光度法
乳酸	乳酸脱氢酶	电极法、光度法
柠檬酸	柠檬酸裂解酶、丙酮酸脱氢酶	电极法、光度法
苹果酸	苹果酸脱氢酶	电极法、光度法
氨基酸	脱氢酶或脱羧酶	电极法
肌酸	肌酸脱氢酶	电极法、免疫法
H_2O_2	过氧化氢酶	光度法、化学发光法、电极法

1.1.2.2 酶活性的测定 酶法分析用于测定酶自身的活性主要应用于临床诊断。体内各脏器含有各种类型的酶,其活性的变化,往往导致体内代谢失调,并可提示各种病变的发生。反之,体内组织或器官一旦发生损伤或机能失调,亦可使某种酶急剧释放至血液中,或使体内某种酶活性降低。

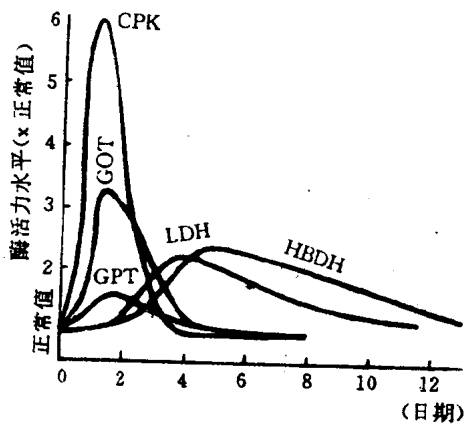


图 1-2 心肌梗塞后血清酶的水平

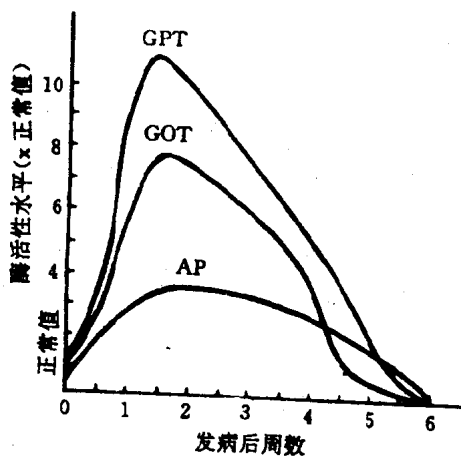


图 1-3 患急性肝炎期间血清酶水平

如血清中谷草转氨酶(GOT)和磷酸肌酸激酶(CPK)活性迅速增高,24~26h 达到峰值,即可确诊为心肌梗塞(图 1-2)。若血清中谷草转氨酶和谷丙转氨酶(GPT)同时升高达一定值时,即可诊断为病毒性肝炎(图 1-3)。其次,工业上可以利用测定酶活性来评价药用及食品加工工业酶制剂产品的质量,并对药用酶制剂的吸收、代谢、药理作用进行研究。临床诊断与医学研究中常测定的酶见表 1-2。

表 1-2 临床诊断与医学研究中常测定的酶

酶	底物	疾病时活性的变化	测定方法
醇脱氢酶(ADH)	乙醇	病毒性肝炎时增高	光度法、电极法
山梨醇脱氢酶(SDH)	L-山梨醇	肝损伤时增高	光度法、电极法
乳酸脱氢酶(LDH)	丙酮酸	进行性肌萎缩、心肌梗塞、癌、肝疾患、溶血性贫血等升高	光度法、电极法
苹果酸脱氢酶(MDH)	L-苹果酸	进行性肌萎缩、肝疾患、心肌损伤、癌、甲亢等升高	光度法、电极法
葡萄糖-6-磷酸脱氢酶	6-磷酸葡萄糖	肝炎,传染性单核细胞增多症时升高	光度法、电极法
谷氨酸脱氢酶	L-谷氨酸	肝炎时增加	光度法
铜蓝蛋白酶	还原型对苯二胺	妊娠时升高,病毒感染时降低	光度法
单胺氧化酶(MAO)	苄胺	肝硬化时升高	光度法、电极法
二胺氧化酶(DAO)	丁二胺	胎儿发育不良时降低	同位素法
谷草转氨酶(GOT)	L-谷氨酸、草酰乙酸	心肌梗塞及心肌疾患时升高	光度法

续表

酶	底物	疾病时活性的变化	测定方法
谷丙转氨酶 (GPT)	L-谷氨酸、丙酮酸	肝、肌肉疾患时升高	光度法
丙酮酸激酶 (PK)	磷酸烯醇丙酮酸	肝炎、肝癌、心肌梗塞时升高	光度法
磷酸肌酸激酶 (CPK)	肌酸	肌肉疾患及心肌梗塞时升高	光度法
胆碱酯酶 (ChE)	苯甲酰胆碱	肝损伤、有机磷中毒、遗传性胆碱酶缺失等降低	光度法、电极法
碱性磷酸酶 (AKP)	对硝基苯磷酸	肝、胆、骨疾患时升高	光度法
酸性磷酸酶 (ACP)	对硝基苯磷酸	前列腺癌转移时升高	光度法
5'-核苷酸酶 (5'-NPD)	5'-核苷酸	某些肝病时升高	光度法
腺苷脱氨酶 (ADA)	腺苷	遗传性缺失, 免疫缺陷症时降低	光度法、电极法
α -淀粉酶	α -淀粉	胰腺炎、腮腺炎时升高	光度法、电极法
脂肪酶	橄榄油	胰腺炎时升高	滴定法、电极法
醛缩酶 (Ald)	果糖-1,6-二磷酸	肝炎、心肌梗塞、肌肉萎缩、癌症时升高	光度法
谷胱甘肽脱氢酶 (GSH)	还原型谷胱甘肽	肝疾患、恶性肿瘤时升高	光度法、荧光法
超氧化物歧化酶 (SOD)	邻苯三酚	癌症、衰老、幅射损伤时降低	光度法
过氧化氢酶 (CAT)	H_2O_2	急性胰腺炎时升高, 癌症、衰老时降低	化学发光法、光度法

1.2 酶法分析的原理

1.2.1 终点法测定原理

终点法系酶促反应进行完全(即底物已变化 99%左右)时,测定底物、产物、激活剂、抑制剂、或辅酶等的物理性或化学性变化量的方法。终点法又可分为:单酶反应定量法与指示酶偶联定量法两类。

1.2.1.1 单酶反应定量法原理 在单底物的情况下,酶促反应方程可写为:



式中 S 为底物, E 为酶, P 为产物。根据酶促反应动力学推导,若底物浓度大大小于米氏常数 K_m 时,其速度方程式应为一级反应方程式(参见本书第二章),即:

$$V = \frac{V_m}{K_m} S \quad (1-2)$$

式中, V 为测定时的反应速度, V_m 为最大反应速度, S 为底物浓度。

按反应速度定义,

$$-\frac{dS}{dt} = kS \quad (1-3)$$

式中, t 为反应时间, k 为正反应的速度常数。

将(1-3)式积分,得:

$$S = S_0 e^{-kt} \quad (1-4)$$

$$t = \frac{1}{k} \ln \frac{S_0}{S} = \frac{2.3}{k} \lg \frac{S_0}{S} \quad (1-5)$$

(1-4)与(1-5)式中, S_0 为初始底物浓度。在半对数坐标纸

上, S 与 t 之间呈现直线关系。已知 t 与 S , 即可求得 S_0 , 并可按(1-5)式计算速度常数 k 。

酶促反应接近完全的所需时间为:

$$t = \frac{2.3}{k} \lg \frac{99}{1} = \frac{4.6}{k} \quad (1-6)$$

一般酶促反应时间较快, 2~10min 即可完成, 设反应完全的时间为 5min, 则:

$$k = \frac{4.6}{5} = 0.92/\text{min} \quad (1-7)$$

由(1-2)与(1-3)式, 得:

$$k = \frac{V_m}{K_m} \quad (1-8)$$

$$V_m = 0.92 K_m \quad (1-9)$$

通过(1-8)和(1-9)可计算该项酶促反应必须使用的酶活性单位(酶活性单位数值等于 V_m)。例如, 己糖激酶对葡萄糖催化作用的 K_m 为 0.1mmol/L, 按(1-9)式, 必须使用的己糖激酶活性应达到 0.092 单位。

1.2.1.2 指示酶反应偶联定量法 在某些酶促反应过程中, 由于底物和产物的理化性质不易区分, 因而仅用单酶反应往往难于定量, 必须借助于与另一种酶及其辅酶偶联反应来测定最终产物含量。此时, 偶联的酶及辅酶的改变, 可作为酶反应完成的定量指示剂, 故又称指示酶。酶法分析中常用的指示酶有辅酶 I 与辅酶 II, 二者还原后在 340nm 处均有特殊的吸光度变化。

指示酶偶联反应过程可表述如下:



中间产物 B 由于在指示酶 E_2 的作用下进一步反应, 故其浓度较小, 因而指示酶反应亦可近似地应用一级反应速度方程, 其

S 、 S_0 、 t 、 k_1 、 k_2 的计算均类似单酶反应定量法,必须加入的指示酶的活性单位可按式计算。

$$V_m = 1.84 K_m (u/ml) \quad (1-11)$$

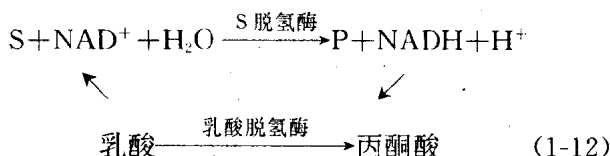
式中系数 1.84 是按照 k_2/k_1 必须大于 2 计算的。

采用终点法应注意下列问题:

a. 酶的底物专一性。虽然酶通常均具有底物专一性,但也有一些酶,如前面提到的己糖激酶与醇脱氢酶等却呈族专一性。在应用此类酶进行定量测定时,必须清除同族物质对待测物质的干扰。

b. 反应液中的酶应足量。这是保证酶促反应完全,即底物被作用 99% 以上的必要条件。为此,在测定前应对所需的酶量及反应时间进行计算或试验。

c. 酶促反应平衡常数应较大。若酶促反应平衡常数过小,则反应不完全,也就不可能按终点法进行定量。但可采用下列措施促进正反应的进行:对于双底物反应,应尽可能提高第二底物的浓度;对与氢离子有关的反应,应选择适宜的 pH;设法除去酶促反应产物,使平衡正向进行;或以较大平衡常数的类似辅酶代替原有辅酶,例如用 3-乙酰吡啶-NAD 代替 NAD,可使平衡常数增大 20~100 倍;与不可逆的酶促反应偶联;与第二底物的再生系统偶联,使第一底物尽可能完全地转变为反应产物等,如:



d. 除去产物对酶促反应的抑制。若产物对酶促反应本身有抑制作用,反应将不能完全进行,此时可采用除去该产物或