

上海

分析法的原理和应用

清水祥一 小林 猛 奥田 润 杉本悦郎 著

上海科学技术文献出版社

酶分析法的原理和应用

[日] 清水祥一 小林 猛 著
奥田 潤 杉本悦郎

陈石根 译 胡学智 校

上海科学技术文献出版社

酵素分析法

—その原理と応用

〔日〕 清水祥一 小林 猛 著
奥田 潤 杉本悦郎
講談社 1977

酶分析法的原理和应用

〔日〕 清水祥一 小林 猛 著
奥田 潤 杉本悦郎
陈石根 译 胡学智 校

上海科学技术文献出版社出版
(上海高安路六弄一号)

新华书店上海发行所发行
宜兴南漕印刷厂印刷

开本 787×1092 1/32 印张 4.625 字数 107,000

1982年9月第1版 1982年9月第1次印刷

印数: 1—6,700

书号: 13192.44 定价: 0.59 元

科学出版社 32-269

内 容 简 介

本书对酶分析法的基本原理及应用中的有关问题作了深入浅出、简明扼要的阐述。全书共三章：酶分析法的基础理论和知识；酶分析中的某些实际问题；酶分析的应用。

本书可供工农业、医药卫生等有关科技人员及大专院校师生参考。

译 者 的 话

酶是高效、高度专一的生物催化剂，它和生命活动密切相关，因此酶(或者更正确地说酶学)在生产实践和基础理论研究中都起着非常重要的作用。酶分析法的应用就是一个十分突出的方面，也是目前发展颇为迅速的一个领域。

酶分析法包括两种类型：一是以酶作为分析工具或分析试剂，用以测定样品中用一般化学方法难于检测的物质，这些物质可以是酶的底物，也可以是酶的抑制剂或活化剂、或是酶的辅助因子，人们通常将这类酶分析称为“酶法分析”；另一则是以酶作为分析对象，即根据需要对样品进行酶含量或活力的测定，这类分析称为“酶活力测定”。由于这两类酶分析从原理到操作等基本上相同，因此，一般往往将它们结合在一起进行讨论。

本书作者在序言中列举了不少有关酶分析方面的大型专著。与此相比，本书的篇幅就少得多，只有三章，但都是由有经验的专家分别撰写的，第一章介绍了酶分析的基础理论和知识，第二章讨论了酶分析中的一些实际问题，第三章概述了酶分析的若干应用。本书的特点是它对酶分析的基本原理作了深入浅出、简明扼要的阐述，尤其出色的是它将这些原理和实际应用很好地融合在一起。这一点对于着手从事酶分析工作的同志来说，要使测定获得正确、有效的结果是十分重要的，而本书则很有参考价值，正是由于这个缘故，才驱使我将它译出来，希望它对读者有所帮助。全书短小精悍、条理清晰、点面兼顾、趣味盎然。

本书因篇幅的限制,没有对具体的酶分析方法一一列出,读者如有这种需要,可查阅作者在序言中所列举的大型专著以及分析化学(Analytical Chemistry)每两年一篇的总结。

译者水平有限,不足之处敬请批评指正。

一九八一年七月

序

本书的目的是为了对近年来在应用上骤然增加的“酶分析法”，从基础到应用作一通俗的介绍。

所谓“酶分析法”，通常是指“用酶进行的分析法”，但是本书中也包括“酶活性测定法”。这样做的理由有两点：一是这两者根据的原理完全相同，而且操作也几乎完全相同；二是从应用的角度看，二者有近乎同等的重要性。

关于“用酶进行的分析法”，H. U. Bergmeyer 已有名著“Methoden der Enzymatischen Analyse”（共 2 卷，1974），这本书的英译本“Methods of Enzymatic Analysis”也于同年问世。至于酶活性测定，在 O.H. Lowry 的优秀著作“A Flexible System of Enzymatic Analysis”（1972）中、以及 P. B. Boyer 编辑的“The Enzymes”（共 13 卷，1970~1974）、S. P. Colowick 和 N. O. Kaplan 合编的“Methods in Enzymology”（至本书发表时为止已达 45 卷，1954~1976）中都有很详细的介绍。尽管如此，我们仍然大胆地发表了本书，其主要原因也是两点，一是上述著作都是外文版，而且过于庞大，读者要求短小精悍的读物呼声很高；二是由于酶用高分子载体包埋或偶联技术的发展，促进了“固定化酶”的出现，而固定化酶在分析方面的利用也已经开始。……（下略）

作者 1977 年 7 月

目 录

第一章 酶分析法的基础

- 1.1 酶分析法的意义和特征.....(1)
- 1.2 酶分析法有关的动力学知.....(8)
 - 1.2.1 均相溶液反应的动力学.....(8)
 - 1.2.2 酶促反应的动力学.....(13)
 - 1.2.3 酶分析法的原理.....(21)
- 1.3 酶、试剂、样品的处理.....(33)
 - 1.3.1 酶的稳定性.....(33)
 - 1.3.2 酶试剂的处理方法.....(41)
 - 1.3.3 固定化酶.....(42)
 - 1.3.4 酶以外其它试剂的处理法.....(45)
 - 1.3.5 待测物质样品的处理法.....(46)

第二章 酶分析法中的某些实际问题

- 2.1 应用酶作为分析工具的酶分析法(酶法分析).....(49)
 - 2.1.1 终点测定法.....(49)
 - 2.1.2 终点测定法以外的分析法.....(67)
- 2.2 酶活性测定法.....(78)
 - 2.2.1 酶反应初速度的测定.....(79)
 - 2.2.2 酶反应过程曲线的制备.....(81)
- 2.3 测定仪器及其用法.....(83)
 - 2.3.1 光电光度计、分光光度计.....(84)
 - 2.3.2 荧光光度计.....(91)
 - 2.3.3 Warburg 测压计.....(93)
 - 2.3.4 氧电极.....(94)

2.3.5 酶电极(97)

2.3.6 放射性测定仪(98)

第三章 酶分析法的应用

3.1 酶分析法在医疗方面的应用.....(100)

3.1.1 在诊断上的应用.....(100)

3.1.2 在治疗上的应用.....(120)

3.2 酶分析法在工农业生产方面的应用.....(123)

3.2.1 在畜牧业上的应用.....(125)

3.2.2 在农业上的应用.....(131)

3.2.3 在水产方面的应用.....(137)

3.3 酶分析法在其它方面的应用.....(137)

3.3.1 在科研上的应用.....(137)

3.3.2 在环保方面的应用.....(138)

第一章 酶分析法的基础

1.1 酶分析法的意义和特征

酶是生物体产生、并在体内发挥作用的生物催化剂(biocatalyst)。但是近年来人们多将它们从机体中抽提出来,使之在体外进行催化反应。酶这类应用大体上可分为如下四个方面:

- (1) 用以制造某些产品;
- (2) 用以去除某些物质;
- (3) 用以识别某种化合物;
- (4) 用以测定某种物质。

其中(3)和(4)是本书讨论的主要内容,属于“酶分析法”范畴。从酶的应用面看,(1)或(2)最为广泛,例如纺织工业中用淀粉酶褪浆,皮革工业中用蛋白酶脱毛、用脂肪酶鞣革,食品工业中用凝乳酶制造乳酪、用淀粉酶糖化淀粉、果胶酶澄清果汁等,不胜枚举;估计这类应用今后还会日益增加。但是另一方面,(3)或(4)的应用也正在迅速扩大。其原因之一可能是由于酶工业的发展,许多种酶已经能够得到充分的供应。在过去,酶主要是从动物脏器和植物种子等得到,这样除了原料困难外,同时需要花费大量劳动力与时间进行分离精制,因而酶制品的价格十分昂贵,而且种类有限。但是近年来,随着微生物工业、它的基础学科微生物学、以及生化工程等的进步,作为酶的重要来源的微生物已能大量培养,特别是通过变异株和诱导物的应用,进而能大

幅度促进所需酶的合成,再有酶的各种新的精制技术的开发,酶的供应无论从质、从量以及从品种上都有了飞跃的提高和增加,同时价格也显著下降。第二个原因可能是由于酶应用形式的发展,如上所述,酶的价格近年来已急剧下降,但是大部分酶无论如何应该说还是相当昂贵的,如只使用一次后就将其废弃,实为可惜。近年来,酶的固定化技术有了很快的进展,现在酶的反复应用和连续使用已经成为可能,固定化酶的品种也已不少,它们一方面和自动化测定技术相结合,促进了酶自动化分析法的迅速普及;另一方面也正在进一步简便化,或者作成含酶的试纸,或者作成酶试剂包出售,一般只需要加一定量的水就可直接使用。

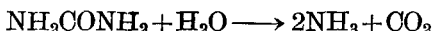
但是,无论各种酶如何丰富、无论它们现在能以何种适于应用的形式供应,酶分析法如果没有它固有的某些优点,也不可能这样广泛地为人们所乐用,换言之,和别的方法相比,酶分析法还有其独特的优点。当然和所有方法一样也有它的缺点。为了更好地应用酶分析法,应该对这两方面都有充分的了解。表 1-1 列举了酶分析法的主要特征。

表 1-1 酶分析法的特征

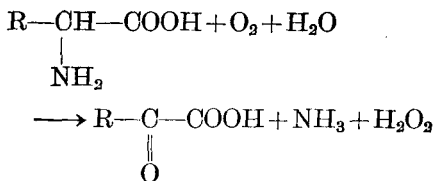
适用范围	酶,底物,辅酶,活化剂和抑制剂。
专一性	很高,原则上容许类似物同时存在。
灵敏度	很高,可达 10^{-7} 克分子以下;如果和荧光法组合在一起,也可达 10^{-9} 克分子左右。
精确度	一般,根据微量吸管误差决定;也取决于组合的方法。
迅速程度	一般,酶反应本身多在 30 分钟以下;通常不需要进行预处理。
简便程度	较差,必需有酶的操作训练(温度、pH 等的确定很重要)。
经济方面	一般,由于酶用量甚微,故不会太贵。


酶分析法何以有这些特征呢？是因为酶和一般催化剂不同，它具有以下一些基本特性：

i) 表现高度的作用专一性 在原则上一种酶一般仅担负一种反应，也就是说，酶是一种仅能促进特定化合物、特定化学键、特定化学变化的催化剂。例如脲酶是一种促进下述尿素水解反应的催化剂，它不作用尿素以外的化合物，也不能催化尿素水解以外的其它类型的反应：



这种性质称为底物专一性、底物选择性或反应专一性。但是，在各种酶中这种性质并不都是这样严格的，例如，D-氨基酸氧化酶催化反应：



其中 R 可以是 CH_3 (丙氨酸)、 C_2H_5 (α -氨基丁酸)，也可以是 - CH_2 (苯丙氨酸) 或 $\text{CH}_3\text{SCH}_2\text{CH}_2$ (甲硫氨酸) 等各种不同结构的物质。不过所有被作用的物质 (底物) 仅限于 D 型氨基酸，对 L 型氨基酸完全不作用。反之 L 型氨基酸氧化酶却只能以 L 型者为底物。现在已经知道，显示这种立体专一性 (stereo-specificity) 的酶是普遍的。

ii) 在温和条件下进行反应 酶催化的反应——酶 (促) 反应——通常在近中性 pH、近常温的温度以及近常压的压力条件下有很高的反应速度。当然也有些极端的情况，例如象碱性磷酸酯酶，只有当反应 pH 条件接近 9 时才有明显的活性；又例如

有一种 β -半乳糖苷酶即使在 70°C 左右也显示催化能力。但是,无论如何,它们一般都不需要强酸、数以百度计的温度、几十个大气压之类的非常激烈的反应条件。所以对那些用化学分析法在进行处理时就被分解的不稳定化合物来说,酶分析法却往往可行。

iii) 有一个最适的作用条件 由于酶反应也是一种化学反应,因此反应速度随温度升高而相应增大;但是,另一方面酶的化学本质是蛋白质,而且仅在具有特定的立体结构时才表现活性;如果它处的环境温度很高,那么它就会由于转变为无活性构象而使活力降低,因此对于每一个酶反应来说都有它相应的特有的活性-温度关系,并在某种温度条件下显出最大的活性(图 1-1),这一温度称为最适温度。同样,对于 pH 也有这样的最适范围或最适点(图 1-2)。因此根据这一特征,即使当反应系统中混有其它酶时,通过选择适当的作用条件,往往可以排除它们的干扰。

iv) 某些酶需要辅助因子才能表现活性 已知的酶中有的仅需要

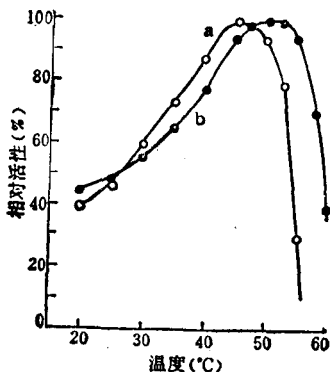


图 1-1 温度-活性关系

(a) β -半乳糖苷酶 (b) LDH

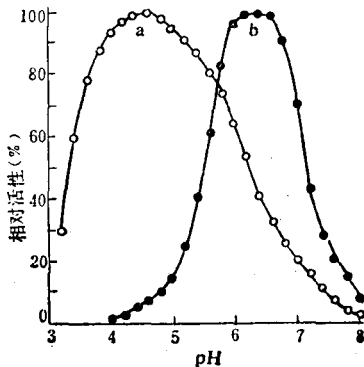


图 1-2 pH-活性关系

(a) β -半乳糖苷酶 (b) 烯醇酶

所谓的酶蛋白就能发挥作用，但是也有的只有在特定的有机化合物(其中多数是B族维生素的衍生物，称为辅酶)或金属离子(称为活化剂)共存时才显示催化活性。对于需要辅酶的酶，如果在它的催化系统中使用过量的酶蛋白和底物，那么辅酶就将成为反应的限制因子，通过测定酶反应就可对它进行定量检定。同样，利用那些活性由金属离子量决定的酶也可进行相应金属离子的微量检定。

v) 抑制剂能阻止酶活性的表现 许多称为毒物的物质，往往就是因为它们能抑制机体中酶的活性而表现出毒性的。而且酶和抑制剂之间的对应关系也是专一的，因此，将抑制剂加到特定的完全的酶反应系统后，根据活性降低的程度就可以对抑制剂进行定量测定。

vi) 大多数酶反应是可逆的 因而也可通过反应条件的选择，利用逆反应进行分析。

对于酶来说，除了上述6个方面外，还有许多其它特性，但是因为与酶分析的关系较远，故此处从略。

在构造与性质上相似的化合物混合存在的情况下，为了确定待测样品中某特定化合物是否存在，或者为了测定其含量，通常可采用以下两种方法：

(1) 根据被检化合物所特有、而共存的其它化合物所没有的特性来进行分析检测；

(2) 将被检化合物从共存的其它化合物中分离出来后，再根据它所具有的某种(当然最好是二种以上)性质进行分析检测。

不过，实际上当待测样品中含有的共存物其结构与性质和被检化合物十分相似或者“面貌不清”时，要找到被检化合物特有的特征性质，或者要将被检化合物分离纯化出来，往往是非常

困难的。近年来，虽然用来测定各种化合物物理性质和物理化学性质的方法已经取得了很大进展，精巧的测定仪器也出现了，而且各种层析方法等又已开发，然而无法进行分析的情况仍然屡见不鲜。

酶分析法虽然不是万能的，甚至可以说，到现在为止它的适用范围仍然相当有限，但是无论如何，酶具有“一种酶仅对应一种反应”的特征，作为分析手段这是很有吸引力的，换言之，根据上述(1)提到的角度进行分析，这的确是一种极为适合的性质。假如能找到仅作用被检化合物的酶，那末基本上就有可能着手直接分析了。

用酶进行定性分析时，其主要点是应使待测物和能专一地催化被检化合物进行反应的酶接触，使之反应，然后再确证是否有预期的化合物生成。当然这里必须有确证产物的适当方法，换言之，这种酶分析法和化学直接分析法相比，不同之处只是酶分析法先改变了分析对象。可是仅仅由于这种改变，就使很多情况可能采用上述(1)和(2)的分析原理来进行检定了。

用酶进行定量分析时也同样地要进行反应，然后测定反应的产物量。这里仍然是改变分析对象，不过，对于复杂的混合物系统来说，在许多情况下这种处理是必要的。用酶法定量分析时，可以检定产物量、也可以检定反应速度。特别是用后一方法检定时，不需要等反应完全结束；而且不限于测定产物的增加，也可测定底物的减少。另外，很多情况下还可测定参与反应的其它化合物(如辅酶等)的变化量或反应系统的物理化学性质的变化。

某些情况下，酶法分析和其它一般的分析法相似，在分析前往往要对待测样品进行前处理，例如，如果样品中包含抑制酶反应的物质，那么必须设法将它去除，或者采取某种措施，使它的

抑制效应不能表现；又如，当样品中存在着和产物难以区别的化合物时，那么应该在酶反应前用某种方法将它们移去。考虑到这些限制，酶分析法似乎也并不那么优越，但是在实际上它的应用仍然是很广的。

如前所述，酶分析法的对象不限于酶的底物，也可用于抑制剂、辅酶等的定性和定量。

另一方面，“酶活性测定法”，它和上述“用酶进行的定量分析法”（“酶法分析”）在操作上几乎完全相同，即将被检酶作成溶液，然后加入该酶的底物、以及反应需要的其它成分，进行反应，最后再测定底物的减少量或产物的生成量。但是“用酶进行的定量分析”中，被检化合物（例如底物）应该是反应的限制因素；而在“酶活性测定法”中，使用的底物却应该过量。值得一提的是，对于在酶的活性测定中也有使用酶抑制剂的方法。

最后，关于酶单位问题。所谓酶活性，在所有情况下，实际上都是指酶显示的催化能力的大小，但是必须注意，这不是指酶的重量（毫克或克分子等）。酶的单位可定义为，一定条件下，使酶反应达到某特定反应速度所需要的酶量。

根据 1961 年国际酶委员会提出的建议，一个酶单位 (1U) 定义为：一分钟内催化一微克分子底物产生变化所需要的酶量；在 1972 年该会又提出了一种称为 katal (kat) 的新单位，1kat 表示一秒钟内引起一克分子底物变化的酶量。两者有如下关系：

$$1 \text{ U} = \frac{1}{60} \mu\text{kat} \quad 1 \text{ kat} = 60 \times 10^6 \text{ U}$$

这里应该注意的是测定条件。不用说，酶是一种高分子量的化合物，如果能将它们分离得到纯粹状态，那么它的 1 毫克应该能显示确定的酶活性单位数。但是，由上述讨论可以知道，如果测定条件改变，酶的活性值也会显然不同。因而在进行酶活性

测定时，应将底物浓度、pH、温度等条件调整至最适；如果在实际工作中，不能明确知道最适条件、或者不能严格加以控制，那末在表示酶活性时应附记测定条件。

表示酶活性的另一种衍生形式是比活性，它表示单位物理量中酶活性的大小，所谓物理量通常采用蛋白质的定量值。

1.2 酶分析法有关的动力学知识

为了正确有效地进行酶分析，应该对酶反应动力学的有关知识有一定程度的了解，但这里只拟介绍一些最起码的知识。在进行酶分析时，有人认为，为了简便，只要将酶这种催化剂象一种试剂一样大大过量地加到反应系统中就行了。但是，实际上如果酶样品中含有杂质，则产生的副反应就可能使我们不能得到正确的定量结果，因而必须考虑反应终止时间和底物浓度等因素，然后再确定使用适当的酶量。对于这种情况，有关酶反应动力学的知识就具有十分重要的作用。

1.2.1 均相溶液反应的动力学

在介绍酶反应动力学以前，首先让我们回顾一下均相溶液反应动力学，因为它可作为我们以后讨论的基础。首先考虑下式所示的反应：



为简便起见，式中 A 表示反应物 A 的浓度，反应开始时，产物 B 的浓度为 0， k_1 为反应速度常数。

该反应如果为 0 级反应，那末反应速度方程就可以用式 (1.2) 表示：

$$-dA/dt = k_1 \quad (1.2)$$