

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2004)17-1551-04

在高于米氏常数的底物浓度下用积分法测定尿酸酶活性

廖 飞, 朱小云, 王咏梅, 曾昭淳, 左渝萍 (重庆医科大学生物化学教研室, 重庆 400016)

Assay of uricase activity by integrated method at substrate concentration higher than Michaelis-Menten constant

LIAO Fei, ZHU Xiao-Yun, WANG Yong-Mei, ZENG Zhao-Chun, ZUO Yu-Ping

Department of Biochemistry, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016

【Abstract】 AIM: To test the reliability of the integrated method for the assay of enzyme activity at substrate concentration above the Michaelis-Menten constant (K_m). **METHODS:** Uricase reaction curve was monitored by absorbance at 293 nm, and it was fit to the integrated Michaelis-Menten rate equation with the predictor variable of reaction time for irreversible, single substrate reaction with the background absorbance as a nonlinear parameter while K_m as a preset constant. **RESULTS:** V_m was sensitive to residual substrate concentration while it was resistant to the background absorbance. With residual uric acid below 2.5 $\mu\text{mol/L}$, there were no differences among V_m at initial substrate concentrations from 10 to 70 $\mu\text{mol/L}$. There were linear responses of both V_m and initial rates to the amount of uricase with initial substrate concentration at 25 or 70 $\mu\text{mol/L}$ if the residual substrate was below 2.5 $\mu\text{mol/L}$. The lower limits of V_m by this integrated method showed no difference at these two initial substrate concentrations and were comparable to those of initial rates. But the upper limit of V_m was twice above that of initial rate, and this difference was more pronounced at lower substrate concentrations. **CONCLUSION:** This integrated method with reaction time as the predictor variable in the integrated rate equation is reliable for enzyme activity assay at substrate concentration above the K_m .

【Keywords】 The integrated Method; uricase; initial rate; predictor variable; upper limit; substrate concentration; enzyme activity assay

【摘要】目的:以尿酸酶为模型,考察在底物浓度高于酶米氏常数(K_m)时用积分法测定酶活性(V_m)的可靠性。方法:用293 nm光吸收记录尿酸酶反应曲线,用以反应时间为自变量的积分速度方程,以尿酸酶 K_m 为常数而本底为非线性参数拟合尿酸酶反应曲线,搜寻对应最好拟合的 V_m 。结果:此积分法测定 V_m 主要受剩余底物浓度影响,本底基本没有干扰。剩余底物低于2.5 $\mu\text{mol/L}$ 时用10~70 $\mu\text{mol/L}$ 起始底物所得 V_m 无差异。用25和70 $\mu\text{mol/L}$ 起始底物浓度时初速度和 V_m 都与酶量呈正比。在此两种底物浓度下积分法的下限相同,且与初速度法下限无明显差异。但用积分法测定酶活性的上限明显高于初速度法,而且起始底物浓度越低则差异越显著。结论:在积分法中使用以反应时间为自变量的积分速度方程拟合酶反应曲线,在高于 K_m 的底物浓度下能可靠测定酶活性。

【关键词】 积分法;初速度;尿酸酶;自变量;上限;底物浓度;酶活性测定

【中图分类号】 Q55; Q555.8 **【文献标识码】** A

0 引言

底物浓度受成本、溶解度或仪器直接测定底物的范围限制时,测定酶反应初速度上限通常很低。用以反应时间为自变量的积分速度方程拟合酶反应曲线,可用很低浓度底物测定最大反应速度(V_m),而且上限很高^[1-4]。此积分法可用于单底物和双底物酶^[3],还可用于筛选酶抑制剂^[4]。理论上此积分法所测定 V_m 应和底物浓度无关^[2]。但当底物浓度高于芳香酯酶米氏常数(K_m)的25%^[2],或高于谷胱甘肽-S-转硫酶表观 K_m 一半^[3],积分法所得 V_m 随底物浓度升高而逐步降低。当酶 K_m 很低且定量灵敏度很低时,积分法需要较高底物浓度才能获得足够数据用于曲线拟合。但在较高底物浓度下此积分法是否可靠还未确定。尿酸酶反应曲线容易测定,动力学过程简单^[5]。我们用纯化的candida utilis尿酸酶为模型,考察在高于酶 K_m 的底物浓度下用积分法测定酶活性的可靠性。

1 材料和方法

1.1 材料 尿酸和candida utilis尿酸酶(EC 1.7.3.3)购自ICN, candida species尿酸酶购自Sigma。其余试剂为分析纯。

收稿日期 2003-10-08; 修回日期 2004-07-18

基金项目 国家自然科学基金(30200266)

通讯作者 廖 飞(1969-)男(汉族)四川省盐亭县人。理学硕士,副教授。Tel.(023)68485073; Fax.(023)68485111 Email. liaofeish@vip.sina.com

1.2 方法

1.2.1 反应曲线记录 缓冲液为 50 mmol/L 硼酸钠 (pH 9.2, 含 50 mol/L 铁离子络合剂二乙基三氨基五乙酸)^[5,6]. 测定体系含 1.0 mL 缓冲液, 及适量底物和酶液共 1.20 mL. 用 Shimadzu UV 265 在 (25 ± 1)°C 记录启动反应 30 s 后的吸收变化曲线, 间隔为 10 s, 直到光吸收变化降低到刚开始阶段的 10% 以下. 初速度为从对应起点开始反应半分钟的平均速度.

1.2.2 测定 V_m 取尿酸在 293 nm 的消光系数 (ϵ) 为 11.5 (mmol/L)⁻¹ · cm⁻¹. 对于存在恒定本底的反应体系, 任意反应时刻 (t_i) 的吸收 (A_i) 同尿酸浓度 (S_i) 关系为 Eq(1).

$$A_i = \epsilon \times S_i + A_b \quad (1)$$

设初始尿酸浓度为 S_0 , 将其单底物不可逆反应速度方程积分得 Eq(2)^[1-3,7-9].

$$\ln(S_0/S_i) + (S_0 - S_i)/K_m = (V_m/K_m) \times t_i \quad (2)$$

以启动反应 40 s 的数据点 ($t_i, A_{i,0}$) 为起点 (其吸收 A_0 , 为起点吸收而反应时间为零, 即 $t'_i = t_i - t_s$). 双倒数分析独立测定 *candida utilis* 尿酸酶 K_m 为 12.5 $\mu\text{mol/L}$ (未发表数据). 把被分析酶的 K_m 设为对应的固定常数, 则根据 Eq(1) 可将 Eq(2) 左边转变成 y_i .

$$y_i = \ln(A_{0,0} - A_b) + A_{0,0}/(\epsilon \times K_m) - \ln(A_i - A_b) - A_i/(\epsilon \times K_m) \quad (3)$$

取 A_b 为非线性参数 (从比被分析的最小吸收低 0.002 开始恒定步长下调到 -0.020), 据误差传递确定 y_i 的误差, 以其误差平方的倒数加权, 方差分析为判据, 用 Eq^[4] 非线性拟合反应曲线^[1-6],

$$y_i = a + b \times t'_i \quad (4)$$

或同时以 K_m 为非线性参数拟合反应曲线, 对应最好拟合的参数 $A_b, V_m/K_m$ [Eq(4) 中的斜率] 组合为所需参数, 根据预设常数 K_m 计算得 V_m ^[1-3]. 用经典积分法时数据转换同文献, 仍然用本底为非线性参数在相同范围调节搜寻对应最好拟合的参数^[7].

1.2.3 程序设计 参照以前用 Qbasic 4.5 编写, 数据转换和加权因子相应按上述方程确定^[1-3,8,9].

统计学处理: 用决定系数 (R^2) 判断用 Eq^[4] 拟合反应曲线及酶活性对酶量响应曲线的线性程度, 用单因素方差分析比较均值的差异.

2 结果

以 K_m 为常数时此积分法测定 *candida utilis* 尿酸酶 V_m 受剩余底物浓度影响, 但不受本底干扰. 初始

尿酸为 70 $\mu\text{mol/L}$ 时, 剩余底物从 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 升高到 10 $\mu\text{mol/L}$ 使 V_m 增加 50%; 但剩余底物浓度在 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 以下变化所引起的 V_m 变化 < 2%. 用 10 ~ 70 $\mu\text{mol/L}$ 尿酸测定 V_m 的变异系数都 < 5%, 数据转换后用 Eq(4) 拟合反应曲线的决定系数都 > 0.995 ($n = 5$). 剩余底物低于 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 时用 10 ~ 70 $\mu\text{mol/L}$ 底物所得 V_m 无显著差异而初速度随底物浓度呈显著变化 (Tab 1). 用此积分法在 70 或 25 $\mu\text{mol/L}$ 底物时所得 V_m 对尿酸酶量都成正比 (Fig 1, 回归分析决定系数 > 0.998). 以偏离响应直线小于回归估计标准差的两倍为界限, 在 25 $\mu\text{mol/L}$ 尿酸时此积分法测定 V_m 的上限同用 70 $\mu\text{mol/L}$ 尿酸时相比无差异. 以回归估计标准差两倍为下限, 只要剩余底物低于 2.5 $\mu\text{mol/L}$, 在上述两种底物浓度下测定 V_m 的下限也无差异. 但初始底物为 70 $\mu\text{mol/L}$ 时需要更长的反应时间才能达到所要求的剩余底物浓度.

表 1 初始底物浓度对不同方法测定尿酸酶活性的影响

Tab 1 Effects of substrate concentrations on uricase activity assayed by different methods ($n = 11, \bar{x} \pm s$)

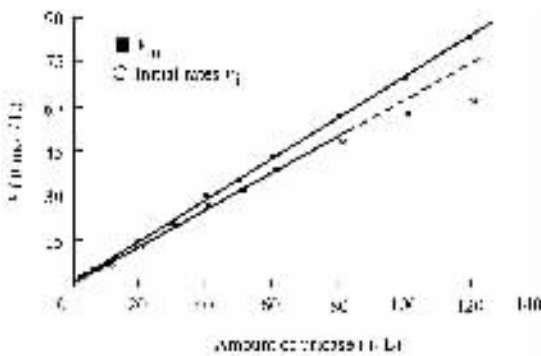
Method	Substrate concentration ($\mu\text{mol/L}$)			
	10	20	30	50
Initial rates *	5.4 ± 0.4	7.7 ± 0.4	8.8 ± 0.4	9.9 ± 0.4
V_m by this integrated method **	14.0 ± 0.6	13.5 ± 0.5	13.6 ± 0.4	13.8 ± 0.4
V_m by classical integrated method *	2.5 ± 0.4	9.4 ± 0.6	10.4 ± 0.6	13.6 ± 0.6

All reaction rates were in ($\mu\text{mol/L}$)/min. For comparison, the same reaction curve was analyzed by different methods. Specified point in the reaction curve with indicated substrate concentration (S_0) was selected as the initiating point, and it was combined to the same ending point with residual uric acid below 2.5 $\mu\text{mol/L}$ for analysis by different integrated methods to get enzyme activity (V_m). Initial rates at the indicated substrate concentrations were the average of reaction rate within 30 s. There were 11 independent reaction curves for analysis and the effects of substrate concentrations on uricase activity were analyzed by F test. * There were significant effects of substrate concentrations on both initial rates and V_m by the classical integrated method as described in reference^[7] ($P < 0.01$). ** There were no differences among V_m at different substrate concentrations ($P = 0.0892$).

在初始底物为 50 $\mu\text{mol/L}$ 时, 以 K_m 为参数拟合剩余底物在 5 $\mu\text{mol/L}$ 以下的反应曲线测定 V_m 的变化 < 6% ($n = 8$). 以 K_m 为参数分析剩余底物 < 10% 的反应曲线, 底物浓度在 15 ~ 70 $\mu\text{mol/L}$ 之间变化时所得 V_m 也无显著差异 (数据未给). 在竞争性抑制剂黄嘌呤 (10 $\mu\text{mol/L}$) 存在下, 只要初始底物浓度高于表观 K_m 而剩余底物低于 2.5 $\mu\text{mol/L}$, 所得 V_m 也无明显变化. 但对来自 *candida species* 尿酸酶的反应体系, 只有剩余底物低于 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 且初始底物浓度

在较小范围内变化所得 V_m 才无变化. 把本底作为非线性参数, 用经典的积分速度方程经过数据转换后拟合分析相同的 *candida utilis* 尿酸酶反应曲线^[7], 当分析包含启动反应 30 s 前的数据, 或被分析反应曲线数据中含有本底, 或初始底物浓度低于 12 $\mu\text{mol/L}$ 时, 所得 V_m 中都有接近 30% 为无意义的负值.

测定尿酸酶初速度 (V_i) 的变异系数也 < 5%. 在一定范围内初速度同 *candida utilis* 尿酸酶量成正比 (Fig 1). 用 70 或 25 $\mu\text{mol/L}$ 尿酸测定初速度的下限没有差异, 但用 25 $\mu\text{mol/L}$ 尿酸时初速度的上限仅为用 70 $\mu\text{mol/L}$ 底物的一半. 在初始底物为 25 $\mu\text{mol/L}$ 时此积分法测定的酶活性与酶量成正比, 其测定上限可达到相同底物浓度下初速度上限的两倍. 用 70 $\mu\text{mol/L}$ 底物时积分法上限仍然接近初速度法上限的两倍 (Fig 1). 只要剩余底物低于 2.5 $\mu\text{mol/L}$, 在 70 $\mu\text{mol/L}$ 或 25 $\mu\text{mol/L}$ 底物时此积分法和初速度法下限都没有差异. 如被分析尿酸酶反应曲线只记录到 10 min, 则初速度的下限为积分法的一半. 根据初速度法和积分法所得酶活性的关系 (见 Ref 1 附录), 可计算得出 *candida utilis* 尿酸酶的 K_m 为 (11.7 \pm 0.5) $\mu\text{mol/L}$, 与双倒数法无差异 ($P < 0.05$). 对 *candida species* 尿酸酶, 在 70 $\mu\text{mol/L}$ 和 25 $\mu\text{mol/L}$ 底物时初速度上限的差异很小, 在 70 $\mu\text{mol/L}$ 底物时积分法和初速度法上限无明显差异, 而在底物浓度为 25 $\mu\text{mol/L}$ 时, 积分法上限仍然接近于初速度法的两倍.



The response plot of uricase activity (V_m) to the amount of uricase solution (X from 2 to 120 μL) was $V_m = 0.05 + 0.073 \times X$, with determination coefficient $R^2 > 0.999$ and standard error of estimate $s = 0.34$, respectively.

Fig 1 Responses of reaction rates (V) at 70 $\mu\text{mol/L}$ uric acid to the amount of uricase

图 1 在 70 $\mu\text{mol/L}$ 尿酸时反应速度对尿酸酶量的响应

3 讨论

Eq (4) 只能描述稳态反应过程, 分析启动反应 40 s 后的数据有利于保障结果的可靠性. 用 *candida uti-*

lis 尿酸酶表明, 底物浓度从接近于 K_m 上升到 K_m 的五倍也不改变 V_m ; 且所得 V_m 都对酶量为线性响应; 据初速度和 V_m 关系计算所得 K_m 也和双倒数法结果一致. 可见在高于酶 K_m 的底物浓度下用此积分法测定 V_m 仍是可靠的. 在底物浓度远低于 K_m 时此积分法的可靠性已证实^[1-4]. 因此, 此积分法所测定的酶活性与底物浓度无明显联系, 需要时就可用于高于 K_m 的底物浓度测定酶活性. 芳香酯酶在底物浓度高于 K_m 的 25% 以后下降, 谷胱甘肽-S-转硫酶在底物浓度高于 50% K_m 以后也下降, 可能是酶样品纯度低, 所用积分速度方程和真实速度方程有差异造成的^[2,3]. *Candida species* 尿酸酶的 K_m 接近 6 $\mu\text{mol/L}$ ^[10]. 底物浓度相对于 K_m 足够高后初速度上限难以再提高. 而测定 K_m 为 12.5 $\mu\text{mol/L}$ 的 *candida utilis* 尿酸酶表明, 积分法在低浓度底物时上限仍然比用底物浓度五倍于 K_m 的初速度上限高. 比较以 K_m 为常数和 K_m 为参数测定酶活性表明, 以 K_m 为常数用此积分法测定酶活性更有利. 因此, 此积分法测定酶活性对底物浓度无依赖, 可根据定量灵敏度和测定上限的需要使用低于或略高于酶 K_m 的底物浓度, 从而用方便的定量方法和较低底物浓度就达到所需要的测定上限. 但此积分法测定低活性的样品时需要很长反应时间是其明显缺陷.

经典积分速度方程所用自变量含有误差且分布范围窄^[7], 用于分析实验曲线给出无意义 V_m , 表明其不能用于实践. 我们所述积分法所用积分速度方程以反应时间为自变量, 无随机误差但有反应起点不确定造成的系统误差. 选择所记录曲线上达到稳态反应的反应时刻对反应时间进行转换, 可降低反应起点误差的干扰. 实际上此积分法所需参数都和反应起点无关, 所测参数受起点误差的干扰肯定很小. 这种自变量性质的差异可能是两种积分法的可靠性存在差异的主要原因. 已发现在积分法中用以反应时间为自变量的积分速度方程拟合分析反应曲线还可预测最大产物生成量^[8-9] 或预测本底进行动力学法测定底物量, 也可测定不高于初始底物浓度的 K_m (未发表数据). 综上所述, 只要所用微分速度方程有效, 用其对应的以反应时间为自变量的积分速度方程拟合分析酶反应曲线有望可靠测定酶活性等参数.

致谢 兰州大学生命科学院钟其顶、李士勇在重庆医科大学完成了 *candida species* 尿酸酶的实验.

【参考文献】

[1] Liao F, Liu WL, Zhou QX, et al. Assay of serum arylesterase activi-

- ty by fitting to the reaction curve with an integrated rate equation [J]. *Clin Chim Acta* , 2001 ; 314(1/2) : 67 - 76.
- [2] 廖飞, 王继红, 曾昭淳, 等. 用积分法测定血清芳香酯酶活性 [J]. 第三军医大学学报, 2004 26(10) : 923 - 925.
Liao F, Wang JH, Zeng ZC, et al. Assay of serum arylesterase by the integrated method [J]. *Acta Acad Med Mil Tert* , 2004 26(10) : 923 - 925.
- [3] Liao F, Li JC, Kang GF, et al. Measurement of mouse liver glutathione S-transferase activity by the integrated method [J]. *J Med Coll PLA* , 2003 ; 18(5) : 295 - 300.
- [4] Meyer-Almes FJ, Auer M. Enzyme inhibition assay using fluorescence correlation spectroscopy : A new algorithm for the derivation of $K_{cat}/K(M)$ and $K(i)$ values at substrate concentration much lower than the Michaelis constant [J]. *Biochemistry* , 2000 ; 39(43) : 13261 - 13268.
- [5] Hamilton SD, Pardue HL. Kinetic method having a linear range for substrate concentration that exceed Michaelis-Menten constants [J]. *Clin Chem* , 1982 ; 28(12) : 2359 - 2365.
- [6] Haliwell B. Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron chelates : Is it a mechanism for hydroxyl radical production in biochemical systems [J]. *FEBS Lett* , 1978 ; 92(2) : 321 - 326.
- [7] Atkins GL, Nimmo IA. The reliability of Michaelis-Menten constants and maximum velocities estimated by using the integrated Michaelis-Menten equation [J]. *Biochem J* , 1973 ; 135(3) : 779 - 784.
- [8] Liao F, Tian KC, Yang X, et al. Kinetic substrate quantification by nonlinear fitting reaction curve to integrated Michaelis-Menten equation [J]. *Anal Bioanal Chem* , 2003 ; 375(6) : 756 - 762.
- [9] 廖飞, 曾昭淳, 王继红, 等. 酶法分析新方法 : 用积分速度方程拟合酶反应曲线测定底物浓度 [A]. 见《中国科协第四届青年学术年会重庆卫星会议暨重庆市第二届青年学术年会论文集》 [C]. 重庆 : 西南师范大学出版社, 2001 : 602 - 606.
- [10] Liu J, Li G, Liu H, et al. Purification and properties of uricase from candida sp. and its application in uric acid analysis in serum [J]. *Appl Biochem Biotechnol* , 1994 ; 47(1) : 57 - 63.

编辑 王小仲

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2004)17-1554-01

胆源性胰腺炎 134 例的腹腔镜治疗

袁志林, 王克成, 谢昊玲, 冯建龙

(解放军 451 医院腹腔镜治疗中心, 陕西 西安 710054)

【关键词】胆源性胰腺炎 腹腔镜 手术

【中图分类号】R657.5 【文献标识码】B

1 临床资料 1998/2003 收治胆源性胰腺炎患者 134(男 59, 女 75)例, 年龄 27 ~ 71 岁。胆囊结石合并胆总管结石 92 例, 单纯胆囊结石伴急性胆囊炎 39 例, 单纯胆囊炎、胆总管无结石但明显增宽 3 例。轻中型 118 例, 重症 16 例。轻中型患者行急诊手术, 从入院到手术时间为(18 ± 5)h。重症患者经保守治疗无好转或加重即行手术, 入院到手术时间为(88 ± 26)h。均行腹腔镜下胆囊切除, 胆总管结石和胆总管增宽者行胆总管切开探查 T 型管引流 95 例。其中 83 例探查有结石, 12 例术前胆总管结石和胆总管增宽者探查阴性, 可能探查中结石进入十二指肠所致。单纯胆囊结石伴急性胆囊炎患者仅行

LC 手术 39 例。全部患者分别于小网膜孔和盆腔放置引流管。46 例患者打开胃结肠韧带于胰腺上下缘放置两根引流管, 16 例重症胆源性胰腺炎患者仅用剪刀剪开部分胰腺包膜未行局部坏死组织清除, 在胰腺上下缘及表面放置引流管。术后禁食、胃肠减压、抑制胰酶分泌, 控制感染及胃肠外营养。待腹痛消失, 体温正常, 血、尿淀粉酶正常, 腹腔引流管无液体引出, 可拔除引流管。盆腔小网膜孔引流管术后 3 ~ 4 d 拔除, 胃后壁引流管冲洗时间 3 ~ 6 d, 术后 8 ~ 20 d 出院, 平均住院时间 11.8 d。轻中型患者全部顺利恢复, 重症患者死亡 1 例, 出院后随访 4 mo 以上 132 例无复发, 无二次手术。

2 讨论 胆源性胰腺炎主张个体化治疗, 对轻、中型急性胆源性胰腺炎, 我们认为可以积极手术治疗, 给予有效的引流^[1-3], 很快改善了患者的病情。对于重症患者手术要慎重, 仅在保守治疗无效并经过充分的术前准备后再行手术。

【参考文献】

- [1] 张肇达, 田伯东. 急性胆源性胰腺炎 [J]. 中华肝胆外科杂志, 2002 ; 8(2) : 93.
- [2] 周总光, 袁朝新, 孙 炜, 等. 急性重症胰腺炎腹腔镜手术治疗的临床研究 [J]. 中华外科杂志, 2001 39(4) : 272 - 274.
- [3] 周永高, 扬建辉, 唐一飞, 等. 急性重症胰腺炎的早期诊断及手术时机的选择 [J]. 肝胆外科杂志, 2003 ; 11(1) : 18 - 19.

编辑 潘伯荣

收稿日期 2004-06-07 ; 修回日期 2004-06-17

作者简介 : 袁志林 (1963-), 男 (汉族), 江苏省南通市人。主治医师。

Tel. (029) 87448359 Email. lq0320@163.com