



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101793860 A

(43) 申请公布日 2010.08.04

(21) 申请号 200910312517.3

(22) 申请日 2009.12.29

(71) 申请人 中国科学院地球化学研究所

地址 550002 贵州省贵阳市观水路 46 号

申请人 江苏大学

(72) 发明人 吴沿友 施倩倩 王坤 李萍萍

朱咏莉 宋艳娇

(74) 专利代理机构 贵阳中新专利商标事务所

52100

代理人 吴无惧

(51) Int. Cl.

G01N 27/30 (2006.01)

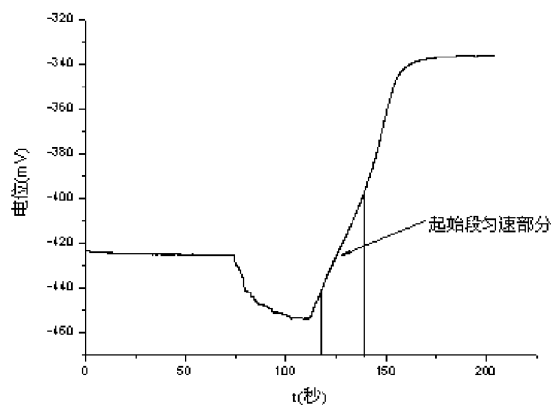
权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 3 页

(54) 发明名称

一种利用铈微电极测定植物碳酸酐酶活力的
电化学方法

(57) 摘要

本发明公开了一种利用铈微电极测定植物碳酸酐酶活力的电化学方法,其过程为:第一,制作铈微电极;第二,将预冷(0~2℃)的饱和CO₂的蒸馏水加入到有碳酸酐酶的巴比妥缓冲体系和无碳酸酐酶的巴比妥缓冲体系;第三,将电化学工作站与铈微电极及参比电极相连,采用开路电位法分别对上述两个体系的整个反应过程进行监测,分别记录下有碳酸酐酶和无碳酸酐酶的反应体系中整个反应过程电位值的变化,保存电位变化过程曲线;第四,依据电位变化过程曲线图选择起始段匀速部分,分别计算出两个体系中相当于一个pH单位的电位值变化所需时间,再根据这两种体系下降一个pH单位的所需时间计算酶活力。本发明比传统的pH计法精确度高,碳酸酐酶活力测定范围大。



1. 一种利用铈微电极测定植物碳酸酐酶活力的电化学方法,其特征在于:它包括以下过程:第一,制作铈微电极;第二,将预冷(0~2℃)的饱和CO₂的蒸馏水加入到有碳酸酐酶的巴比妥缓冲体系和无碳酸酐酶的巴比妥缓冲体系;第三,将电化学工作站与铈微电极及参比电极相连,采用开路电位法分别对上述两个体系的整个反应过程进行监测,分别记录下有碳酸酐酶和无碳酸酐酶的反应体系中整个反应过程的电位值的变化,保存电位变化过程曲线;第四,依据电位变化过程曲线图选择起始段匀速部分,分别计算出两个体系中相当于一个pH单位的电位值变化所需时间,再根据这两种体系下降一个pH单位的所需时间计算酶活力。

2. 根据权利要求1所述的利用铈微电极测定植物碳酸酐酶活力的电化学方法,其特征在于:在第四过程中,依据电位变化过程曲线图选择起始段的匀速部分,提取出这部分的电位与时间数据,进行直线回归方程的拟合,方程为 $Y = kX + b$,其中Y为电位值,X为时间,k为方程的斜率,b为常数;依据两个体系中方程的斜率以及经多次测定获得的该铈微电极在巴比妥钠缓冲液中的pH电位关系的能斯特斜率,分别计算出这两个体系中相当于一个pH单位的电位值变化的所需时间,再根据这两种体系下降一个pH单位的所需时间,进行酶活力的计算。

3. 根据权利要求1所述的利用铈微电极测定植物碳酸酐酶活力的电化学方法,其特征在于:在第一过程中,用铜丝进行电镀,在铜丝表面形成一层细致光滑的铈金属层,制成铈微电极。

4. 根据权利要求3所述的利用铈微电极测定植物碳酸酐酶活力的电化学方法,其特征在于:制备好的铈微电极在使用前需要在相应缓冲液中活化至少两小时。

一种利用铈微电极测定植物碳酸酐酶活力的电化学方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种利用铈微电极测定植物碳酸酐酶活力的电化学方法,属于生化分析领域。

背景技术

[0002] 碳酸酐酶 (Carbonicanhydrase, CA ;carbonatehydrolyase, EC 4. 2. 1. 1) 是催化二氧化碳的可逆水合反应的一种含锌金属酶,广泛地分布在植物和动物中,甚至有些微生物中也存在. 它的主要生理作用涉及到离子交换、酸碱平衡、羧化 / 脱羧反应及无机碳的利用。它催化的 $\text{CO}_2+\text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}^++\text{HCO}_3^-$ 反应,在无碳酸酐酶催化的条件下,平衡需要 1 分钟,在有碳酸酐酶作用下,平衡只需 10^{-6} 秒。

[0003] 目前,对碳酸酐酶活力测定主要有以下几种方法。1. 放射免疫分析法 ;2. pH 计法 ;3. 同位素 CO_2 质谱分析法 ;4. 比色法 ;5. 荧光光度法 ;6. mRNA 测定法 ;7. 凝胶电泳法等等。每种方法都有优缺点。放射免疫分析法有较高的灵敏度,重现性好,但操作复杂 ;同位素 CO_2 质谱分析法有较高的灵敏度,操作简单,重现性好,但设备昂贵 ;比色法和荧光光度法的精确度较高,但测试成本较高。mRNA 测定法和凝胶电泳法灵敏度高,但操作烦琐 ;pH 计法操作简单,便利快速,设备便宜,用得较广泛,但由于灵敏度较低,在一些活力范围内线性较好,但超出该范围,线性较差。目前的很多研究者大都采用 pH 计法来测定酶活力。

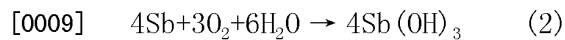
[0004] 传统的测定植物体内碳酸酐酶的 pH 计法 :将预冷 ($0 \sim 2^\circ\text{C}$) 的饱和 CO_2 的蒸馏水分别加到有碳酸酐酶和无碳酸酐酶的巴比妥缓冲体系中,用玻璃电极分别记录这两个体系下降一个 pH 单位的时间,根据这两种体系下降一个 pH 单位的时间,来计算酶活力。常用的 pH 玻璃电极是一支端部吹成泡状的对于 pH 敏感的玻璃膜的玻璃管。管内充填有零电位下 pH 为 7 的内参比溶液,是中性磷酸盐和氯化钾的混合溶液,外参比溶液为氯化钾溶液或氯化钾凝胶电解质。内外参比电极均为 Ag/AgCl 参比电极,内参比电极主要作用是引出电极电位,外参比电极主要作用是提供与保持一个固定的参比电势。这种方法有一些缺点 :首先,常规用来测量 pH 变化的商业化玻璃电极,因为玻璃膜的脆弱而不能被微型化,因此对 pH 变化的响应较迟缓,限制了其测量碳酸酐酶活力的范围。当被测样品的碳酸酐酶活力过小时,由于玻璃电极响应缓慢而测量不准。而当被测样品的碳酸酐酶活力过大时, pH 计显示数据变化过快,由于人的眼睛的视觉暂留时间为 0. 1-0. 4 秒,人的动作又滞后于人眼,这样势必会造成较大的误差,并且不同的实验操作人员会有不同的记录结果。其次,碳酸酐酶催化的 $\text{CO}_2+\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}^++\text{HCO}_3^-$ 反应,反应速度并不都是匀速的 (如图 1)。此外,传统测量方法仅能依靠秒表记录开始和结束时的两点数据,这两个时间点之间的 pH 变化过程是否为匀速无法得知。碳酸酐酶催化的巴比妥钠缓冲系统中 $\text{CO}_2+\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}^++\text{HCO}_3^-$ 反应过程的 pH 值随时间变化曲线如图 1 所示。

[0005] 许多金属氧化物可以用来在不同的系统中检测 pH,如 PtO_2 、 IrO_2 、 RuO_2 、 TiO_2 、 Sb_2O_3 和 Bi_2O_3 。pH 传感的机制依靠于接触被测介质中金属与金属氧化物表面平衡的建立 :

[0006] $\text{MO}_x+2x\text{H}^+ \rightleftharpoons \text{M}+x\text{H}_2\text{O} \quad (1)$

[0007] 既然平衡体系中包含氢离子,那么在零电流条件下,电极电位将和 pH 值有一种线性关系,可以用能斯特方程来表达。因此,用开路电位法测量金属氧化物电极相对于参比电极的关系,能够知道被测介质的 pH 值。

[0008] 在众多被用来研究测量 pH 的固态金属氧化物中,氧化锑是迄今为止使用最为广泛的。它比经常用来测量 pH 的铂系家族的金属氧化物例如铌、铂、钨等成本低很多且容易得到。裸金属锑在接触空气或样本溶液时能很快形成一层氢氧化物层:



[0010] 电极的电位响应来自于氢氧化物层和其下的金属基底的反应平衡。

[0011] 因此,能否利用锑微电极测定较大范围的植物碳酸酐酶活力,成为本发明所要解决的关键问题。

发明内容

[0012] 本发明要解决的技术问题是,提供一种利用锑微电极测定植物碳酸酐酶活力的电化学方法,以克服传统的 pH 计法中存在的测定范围小、精确度低以及人为误差大的不足。

[0013] 本发明采取以下技术方案:它包括以下过程:第一,制作锑微电极;第二,将预冷(0~2℃)的饱和 CO₂ 的蒸馏水加入到有碳酸酐酶的巴比妥缓冲体系和无碳酸酐酶的巴比妥缓冲体系;第三,将电化学工作站与锑微电极及参比电极相连,采用开路电位法分别对上述两个体系的整个反应过程进行监测,分别记录下有碳酸酐酶和无碳酸酐酶的反应体系中整个反应过程的电位值的变化,保存电位变化过程曲线;第四,依据电位变化过程曲线图选择起始段匀速部分,分别计算出两个体系中相当于一个 pH 单位的电位值变化所需时间,再根据这两种体系下降一个 pH 单位的所需时间计算酶活力。

[0014] 在第四过程中,依据电位变化过程曲线图选择起始段的匀速部分,提取出这部分的数据与时间数据,进行直线回归方程的拟合,方程为 $Y = kX + b$,其中 Y 为电位值, X 为时间, k 为方程的斜率, b 为常数;依据两个体系中方程的斜率以及经多次测定获得的该锑微电极在巴比妥钠缓冲液中的 pH 电位关系的能斯特斜率,分别计算出这两个体系中相当于一个 pH 单位的电位值变化的所需时间,再根据这两种体系下降一个 pH 单位的所需时间,进行酶活力的计算。

[0015] 在第一过程中,用铜丝进行电镀,在铜丝表面形成一层细致光滑的锑金属层,制成锑微电极。

[0016] 制备好的锑微电极在使用前需要在相应缓冲液中活化时间至少为两小时。

[0017] 本发明的优点如下:

[0018] 1) 本方法通过多点数据、统计获得反应体系中相当于一个 pH 单位的电位值变化所需时间,因此比传统的 pH 计法用两点数据计算一个 pH 单位变化所需时间,测出的植物的碳酸酐酶活力可信度高。

[0019] 2) 本方法依据电位变化过程曲线图的匀速部分来计算植物的碳酸酐酶活力,因此,它比传统的 pH 计法精确度高。

[0020] 3) 由于锑微电极的针状形貌,因此它可以使测量体系的体积大大缩小,减少植物材料的使用。

[0021] 4) 本方法可以对碳酸酐酶活力过大或过小的植物进行测定。

附图说明

[0022] 图 1 为碳酸酐酶催化的巴比妥钠缓冲系统中 $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$ 反应过程的 pH 值随时间变化曲线。

[0023] 图 2 为本发明的开路电位法监测的无碳酸酐酶体系整个反应过程 pH 值的变化曲线。

[0024] 图 3 为本发明的开路电位法监测的有碳酸酐酶体系整个反应过程 pH 值的变化曲线。

[0025] 图 4 为用本发明测定的纯碳酸酐酶的活力与体积之间的关系图。

[0026] 图 5 为用传统 pH 玻璃电极测定的纯碳酸酐酶的活力与体积之间的关系图。

具体实施方式

[0027] 本发明的实施例：它包括以下过程：第一，制作铈微电极；第二，将预冷 ($0 \sim 2^\circ\text{C}$) 的饱和 CO_2 的蒸馏水加入到有碳酸酐酶的巴比妥缓冲体系和无碳酸酐酶的巴比妥缓冲体系；第三，将电化学工作站与铈微电极及参比电极相连，采用开路电位法分别对上述两个体系的整个反应过程进行监测，分别记录下有碳酸酐酶和无碳酸酐酶的反应体系中整个反应过程任意时间点的电位值的变化，保存电位变化过程曲线；第四，依据电位变化过程曲线图选择起始段的匀速部分，提取出这部分电位与时间数据，进行直线回归方程的拟合；方程为 $Y = kX + b$ ，其中 Y 为电位值， X 为时间， k 为方程的斜率， b 为常数；依据两个体系中方程的斜率以及经多次测定获得的该铈微电极在巴比妥钠缓冲液中的 pH 电位关系的能斯特斜率，分别计算出这两个体系中相当于一个 pH 单位的电位值变化的所需时间，再根据这两种体系下降一个 pH 单位的所需时间，来计算酶活力。

[0028] 采用直径 0.6mm，长 5cm 左右的铜丝，用金相砂纸打磨光滑后，使用电化学工作站进行电镀，在铜丝表面形成一层细致光滑的铈金属层，镀上铈的铜丝在烘箱中 120°C 烘干过夜。制备好的铈微电极在使用前需要在相应缓冲液中活化时间至少为两小时。

[0029] 用滴加稀硫酸 (20mmol/L) 的方式改变巴比妥钠缓冲液 (20mmol/L, pH8.30) 的 pH 值，来测试电极在不同 pH 值溶液中的电位变化。铈微电极的电位随溶液 pH 值的升高而降低，经多次测试结果，铈微电极对 pH 表现出良好的电位响应，响应范围 pH2-9，其能斯特斜率为 $41.7 \pm 0.46\text{mV/pH}$ 。

[0030] 取植物叶片 0.3 ~ 0.5g，放到预冷的研钵中，迅速加入液氮，再加入 3mL 巴比妥缓冲液 (10mmol/L，含巯基乙醇 50mmol/L, pH8.30) 进行研磨，取研磨液倒入 5mL 离心管中，离心管置于冰浴中 20min 后，在 13000r/min 下离心 5min，取上清液，冷藏待测。

[0031] 保持反应系统在 $0 \sim 2^\circ\text{C}$ ，取待测样品溶液 10 ~ 1000 μL ，加入到含 3mL 的巴比妥缓冲液 (20mmol/L, pH8.30) 的反应容器中，然后迅速加入 2mL 预冷的 ($0 \sim 2^\circ\text{C}$) 饱和 CO_2 蒸馏水，铈微电极及参比电极与电化学工作站相连采用开路电位法监测该反应体系 pH 值变化，保存下电位变化过程曲线。

[0032] 保持反应系统在 $0 \sim 2^\circ\text{C}$ ，取提取碳酸酐酶的巴比妥缓冲液 (10mmol/L，含巯基乙醇 50mmol/L, pH8.30) 10 ~ 1000 μL ，加入到含 3mL 的巴比妥缓冲液 (20mmol/L, pH8.30) 的反应容器中，然后迅速加入 2mL 预冷的 ($0 \sim 2^\circ\text{C}$) 饱和 CO_2 蒸馏水，铈微电极及参比电极与电

化学工作站相连采用开路电位法监测该反应体系 pH 值变化,保存下电位变化过程曲线。

[0033] 将上述保存好的电位变化过程曲线以 origin 软件将数据导出,取反应开始后电位匀速变化的一段数据进行线性拟合,获得电位随时间变化的直线方程。

[0034] 依据上述的直线方程,获得方程的斜率。有碳酸酐酶的反应体系的直线方程的斜率记为 k_1 ,相当于一个 pH 单位的电位值变化的所需时间记为 t_1 则为 $41.7/k_1$ 。无碳酸酐酶的反应体系的直线方程的斜率记为 k_2 ,相当于一个 pH 单位的电位值变化的所需时间记为 t_0 则为 $41.7/k_2$,酶的相对活力 = $t_0/t_1 - 1$,单位为 WAU。

[0035] 实施例 1

[0036] 为了证明本发明的实施效果,分别用本发明和传统玻璃 pH 电极测定了 Sigma 公司生产的纯碳酸酐酶的活力(酶活力标定为 4860WAU/mg 蛋白质)。表 1、图 4 和图 5 显示了本发明和传统玻璃 pH 电极对商品碳酸酐酶活力的测定效果差异。

[0037] 表 1 本发明和传统玻璃 pH 电极对商品碳酸酐酶(Sigma 公司产品)活力的测定效果比较

[0038]

碳酸酐酶体积 (微升)	本发明		玻璃电极	
	酶相对活力 WUA	酶活力 WAU/mg蛋白质	酶相对活 力 WUA	酶活力 WAU/mg蛋白质
10	0.64	4267	0.45	3000
20	1.34	4467		
30			1.46	3244
40	2.79	4650		
50	4.86	6480	3.84	5120
100	7.66	5107	9.07	6406
200	17.48	5826	16.52	5507
300	21.96	4880	22.70	5044
400	29.4	4900	29.35	4891
500	33.11	4415	33.00	4400
700	47.90	4561		
750			42.67	3792
1000	68.1	4540	55.03	3669
平均值±标准偏差		4918±203		4646±342

[0039] 从图 4 可以看出,用本发明测定的纯碳酸酐酶的活力与体积之间的关系的线性较好,方程为 $y = 0.0673x + 1.0677$ ($R^2 = 0.9963$, $n = 11$)。从图 5 可以看出,用传统 pH 玻璃

电极测定的纯碳酸酐酶的活力与体积之间的关系的线性方程为 $y = 0.0550x + 3.0378$ ($R^2 = 0.9752$, $n = 10$), 明显劣于用本发明测定的纯碳酸酐酶的活力与体积之间的线性关系, 因此本发明测定的结果更具为精确、可信。

[0040] 实施例 2

[0041] 为了证明本发明的实施效果, 将桑树、椿树、甘蓝型油菜分成两份, 分别用本发明和传统 pH 玻璃电极测定了它们的碳酸酐酶活力。取植物叶片 0.3 ~ 0.5g, 放到预冷的研钵中, 迅速加入液氮, 再加入 3mL 巴比妥缓冲液 (10mmol/L, 含巯基乙醇 50mmol/L, pH8.30) 进行研磨, 取研磨液倒入 5mL 离心管中, 离心管置于冰浴中 20min 后, 在 13000r/min 下离心 5min, 取上清液, 冷藏待测。表 2 显示了本发明和传统玻璃 pH 电极对几种植物碳酸酐酶活力的测定效果差异。

[0042] 表 2 用本发明和传统 pH 玻璃电极对几种植物叶片的碳酸酐酶的测定效果比较。

[0043]

植物材料	植物碳酸酐酶提取液的 体积 (微升)	本发明		玻璃电极		
		酶相对活力	酶活力	酶相对活力	酶活力	
		WUA	WUA/g鲜重	WUA	WUA/g鲜重	
桑树	10	0.19	190	测不出	测不出	
	30	0.36	120	0.32	107	
	50	0.86	172	0.50	100	
	100	1.06	106	1.87	187	
	200	1.86	84	2.52	126	
	300	3.27	112	3.06	102	
	400	4.26	106	3.56	89	
	平均值±标准偏差		127±15		119±15	
椿树	平均值±标准偏差		679±38		610±19	
甘蓝型油菜	平均值±标准偏差		490±9		547±22	

[0044] 从表 2 中可以看出, 本发明的测定范围更大, 结果更可靠, 而传统 pH 玻璃电极对 10 微升体积的桑树叶片的碳酸酐酶提取液则难以测出活力。对中等碳酸酐酶活力的测定效果, 本发明与传统 pH 玻璃电极测定结果无显著差异。

[0045] 实施例 3

[0046] 为了验证本发明的实施效果, 分别用本发明和传统 pH 玻璃电极测定桑树和构树叶片的碳酸酐酶胞外酶的活力。由于乙酰唑胺 (Acetazolamide, AZ) 能够抑制碳酸酐酶活力, 本身又不能通过细胞膜, 因此可以通过比较不加乙酰唑胺前处理的叶片碳酸酐酶活力

与加乙酰唑胺前处理的叶片碳酸酐酶活力来获得碳酸酐酶胞外酶活力。本实验采用的乙酰唑胺的浓度约为 30mmol/L。碳酸酐酶胞外酶活力为不加乙酰唑胺前处理的叶片碳酸酐酶活力与加乙酰唑胺前处理的叶片碳酸酐酶活力之差值。

[0047] 本发明和传统玻璃 pH 电极测定碳酸酐酶胞外酶活力分别需要构树叶片 6 份、桑树叶片 6 份。其中 3 份不加乙酰唑胺处理,另外 3 份用乙酰唑胺进行前处理。从每份中取植物叶片 0.3 ~ 0.5g,放到预冷的研钵中,迅速加入液氮,再加入 3mL 巴比妥缓冲液 (10mmol/L, 含巯基乙醇 50mmol/L, pH8.30) 进行研磨,取研磨液倒入 5mL 离心管中,离心管置于冰浴中 20min 后,在 13000r/min 下离心 5min,取上清液,冷藏待测。表 3 显示了本发明和传统玻璃 pH 电极对构树和桑树的碳酸酐酶胞外酶活力的测定效果差异。

[0048] 表 3 用本发明和传统 pH 玻璃电极对桑树和构树叶片的碳酸酐酶胞外酶活力的测定效果比较。

[0049]

测定方法	植物材料	酶活力 (不加乙酰唑胺) (WAU/gFW)	酶活力 (加乙酰唑胺) (WAU/gFW)	胞外酶活力和比例
本发明	构树叶片	1478	919	559 (38%)
		1485	1163	322 (22%)
		1738	1140	598 (34%)
	桑树叶片	150	111	49 (26%)
		212	138	74 (35%)
		159	108	51 (32%)
传统 pH 玻璃电极		1041	854	187 (18%)
	构树叶片	1196	909	287 (24%)

[0050]

		1586	983	603 (38%)
		187	136	51 (27%)
	桑树叶片	143	152	-9 (-6%)
		132	108	24 (18%)

[0051] 从表 3 中可以看出,本发明测定的构树和桑树的碳酸酐酶胞外酶活力以及比例的变异性明显小于传统 pH 玻璃电极的测定;用传统 pH 玻璃电极的测定桑树叶片的碳酸酐酶胞外酶活力甚至出现负值。目前很少有胞外酶活力的比例的资料记录,这可能与用传统 pH 玻璃电极测定精度度不高有关。因此可以看出,本发明测定植物的碳酸酐酶尤其是碳酸酐酶胞外酶活力具有较高的可信度。从表 3 中还可以看出,本发明测活力较大的植物如构树能够获得可信的结果,因为,只有获得误差较小的不加乙酰唑胺前处理和加乙酰唑胺前处

理的碳酸酐酶数据,才能获得可信的碳酸酐酶胞外酶的数据。同理,本发明测活力较小的植物如桑树也能够获得可信的结果。

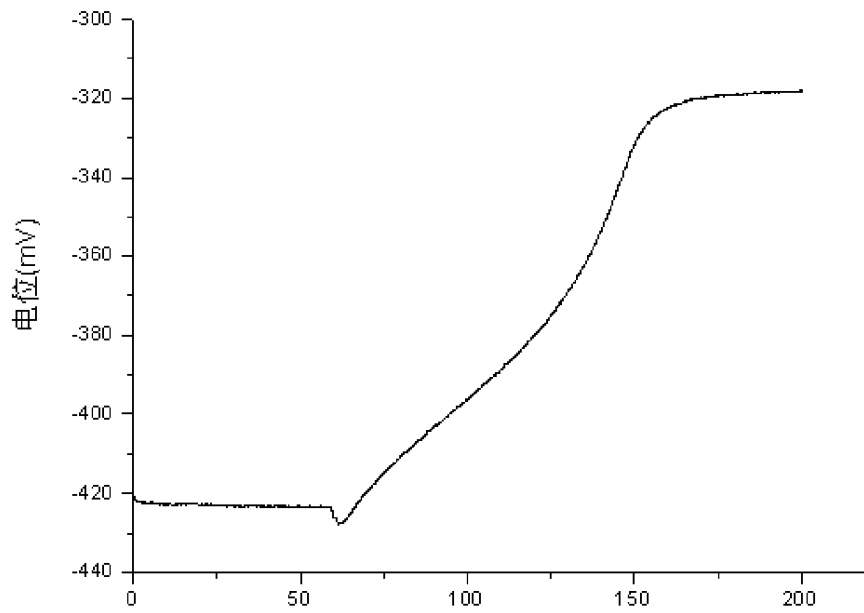


图 1

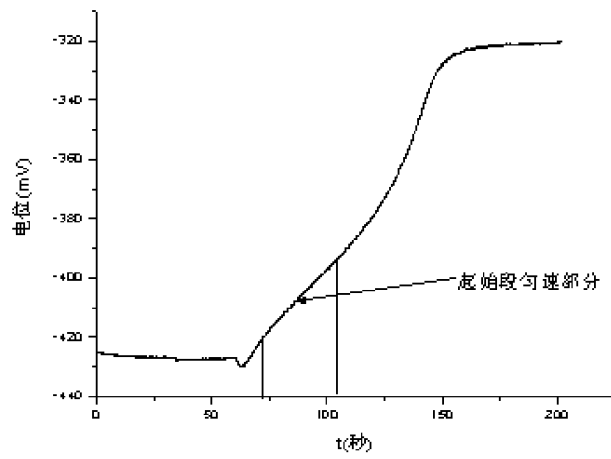


图 2

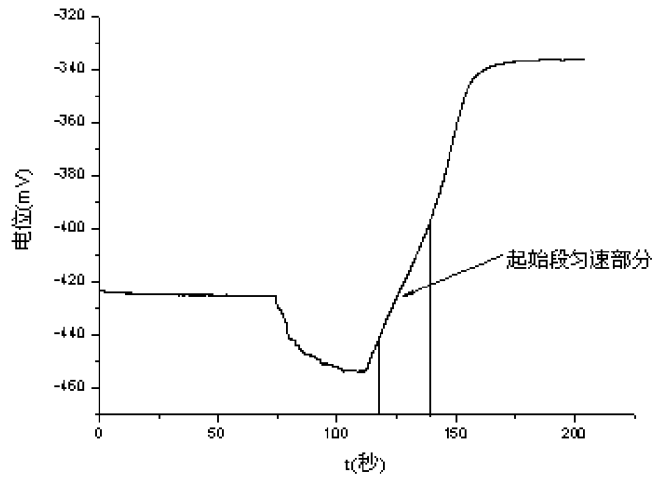


图 3

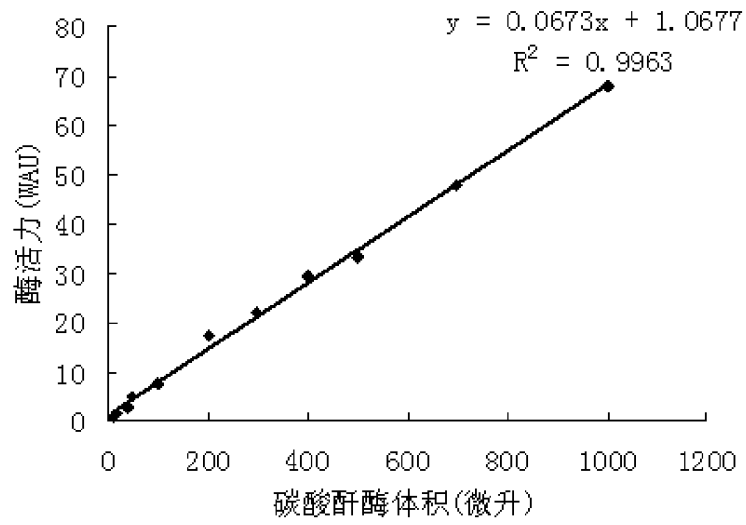


图 4

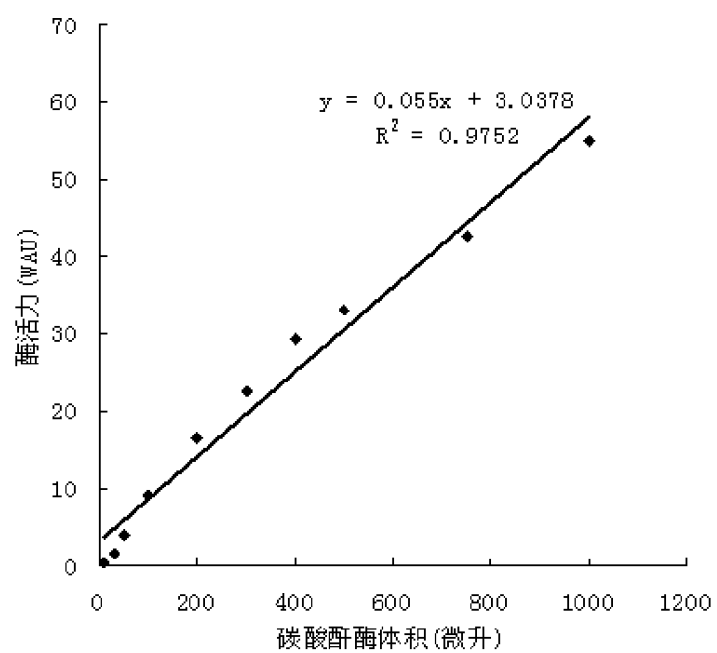


图 5