

· 研究简报 ·

简化磺胺乙酰化测定 CoA

丁兆坤 许友卿 黄溢明

(生物学系)

摘 要 本文报道测定辅酶A(CoA)活力的简化磺胺乙酰化法。该法用鲜鸽肝酶液代替鸽肝丙酮粉,设计了一简单装置贮存鲜酶液,简化了操作程序,测定准确,重现性好。

关键词 磺胺乙酰化, 乙酰化酶, 辅酶A

CoA是机体内调节糖、脂肪和蛋白质代谢之重要因子^[1]。对CoA的活力测定,中国药典规定用磺胺乙酰化法^[2]。磺胺乙酰化法有许多优点,但因制备此法所用的鸽肝丙酮粉需要-20℃冰冻条件,一般基层单位难以进行。此外,该法冗长,对大批样品难以同时测定。因此,我们参考有关文献^[3~5]对原法进行了改进。

1 材料与方 法

1.1 试剂与材料 CoA标准品由广州药检所和上海生物化学制药厂提供,用瑞典标准品校正。鸽子是市售健康活鸽,买回后饲养数天。其他试剂均为AR或CP规格,购自广州化学试剂商店。

1.2 试剂配制 按上海市药品检验标准规定^[2]。

1.3 新鲜乙酰化酶的制备 取活鸽数只杀头放血,剖腹迅速取出鸽肝,剪去脂肪,用滤纸吸去血液,放入装有预冷的0.01mol/L KHCO₃溶液的研钵(冰冻)中称重,每4g肝重共加预冷的0.01mol/L KHCO₃溶液10ml。迅速剪碎鸽肝并研磨成匀浆状。将匀浆液装入试管中,于30℃恒温水浴4h,破坏抽提液中原有的CoA,再经2500rpm离心10min,得鲜红澄明酶液,即用或依下述方法保存。

1.4 鲜酶液的保存 于冰壶内装入碎冰块,用适量粗食盐混匀。在冰壶软塞底部安一小钩。把要贮存的酶液装入试管中,用塑料薄膜封口扎好,吊于软木小钩,放入冰壶中间,再添加碎冰块至酶液全部被包围为止,加适量粗食盐,塞好软木塞,加盖。冰壶可在室温下内存酶液,放入普通冰箱内冷藏则更佳。

1.5 CoA之测定步骤 基本步骤如药典所述。但是,作了如下简化:省去原法中标准品和各样品的低剂量;不用公式计算,而用标准CoA配制0.5~2.5u的系列浓度,用

本文1991年5月18日收到

721一分光光度计于545nm处测定OD值, 绘出标准曲线(图1), 根据标准曲线确定被测CoA之活力。

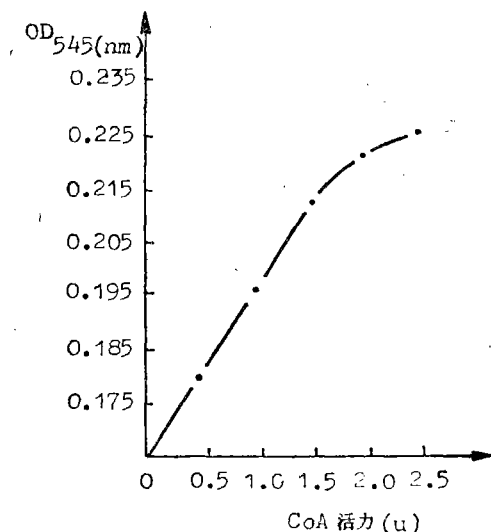


图1 用鲜酶液测定CoA活力标准曲线

Fig.1 The standard curve of determining CoA activity by fresh enzymes

2 结果与讨论

2.1 用鲜酶液与丙酮粉测定结果的比较 用这两种酶分别测定规定用的2u和1u于545nm处的OD值, 分别是0.185和0.187, 0.165和0.165。先后重复15次, 结果都相似。再将自己制备的同一批号的CoA针剂用新鲜鸽肝酶液测定后, 送请上海生物化学制药厂用鸽肝丙酮粉按药典规定^[2]进行测定, 结果分别是56.0u和57.0u。重复5次, 相差甚少。可见, 尽管鸽子来源不同, 酶的制法不同, 操作人员不同, 测得之结果也极相近。说明用鸽肝鲜酶液代替鸽肝丙酮粉是可行的, 而且还解决了制备鸽肝丙酮粉时往往因低温(-20℃)和减压抽干等条件不易控制而致酶失活的问题。

2.2 新鲜鸽肝酶液的贮存 鸽肝丙酮粉的主要优点是利于贮存, 鲜酶液也能贮存一定时间。我们用上述简易装置贮存鲜酶液20天(每隔5天向室温放置的冰壶内加碎冰块和粗食盐一次, 若冰壶是置于冰箱内的则可省去此步), 仍保持鲜酶液原有的活力和颜色。分别用贮存1、3、5、10、15、20天的鲜酶液测定同一批号的CoA针剂, 结果分别是56.0u, 54.0u, 55.0u, 53.0u, 54.0u, 54.0u, 差异很少。

2.3 用鲜酶液测定的重现性 我们曾5次(每次隔一个月)对同一批号的CoA针剂进行测定, 结果分别是56.0u, 56.2u, 56.0u, 55.5u, 55.0u, 表现出很好的重现性。

2.4 结果的计算 原法冗长, 工作量大, 易出差错, 计算麻烦。我们经过反复的测定比较后, 改用标准曲线查结果, 省去原法的低剂量。改良后只测高剂量查标准曲线所得的结果, 和原法测定高低剂量按公式计算的结果很接近(表1)。

表1 标准曲线法和公式法计算的结果比较 (CoA单位为u)
Tab.1 Comparison of results calculated by the standard curve and formula

序号	标准曲线法	公式法	相差率* (%)	序号	标准曲线法	公式法	相差率* (%)
1	16.7	17.0	-1.76	13	254.4	254.5	-0.04
2	30.0	30.0	0	14	225.0	224.5	+0.22
3	28.8	28.7	+0.35	15	160.0	160.4	-0.25
4	17.7	17.8	-0.56	16	155.6	155.8	-0.13
5	28.8	28.8	0	17	221.0	220.9	+0.04
6	231.0	231.2	-0.09	18	182.0	182.1	-0.05
7	83.5	83.7	-0.24	19	185.0	185.6	-0.32
8	150.0	150.0	0	20	153.0	152.8	+0.13
9	180.0	180.1	-0.06	21	254.4	254.2	+0.04
10	190.0	190.3	-0.16	22	40.4	40.6	-0.49
11	40.0	40.2	-0.50	23	56.0	56.1	-0.18
12	170.0	170.5	-0.29	24	56.0	56.0	0

*以公式法的结果为100%计算

可见,标准曲线法和公式法计算的结果相差率绝对值最高不超过1.76%,相差率绝对值平均为0.25%。因此,改用标准曲线法不但可以,而且大大地减少了工作量,提高了工效。

原法用高低剂量之主要目的是为了消除样品中的有色成分的干扰。用我们的改良方法,略去低剂量时,可在一批测定中增加一支空白管的办法,消去样品中有色物质的干扰。

参 考 文 献

- 1 丁兆坤等. 广东生化通讯, 1985, 2(1): 7
- 2 上海市卫生局. 上海市药品检验标准. 上海: 上海人民出版社, 1974. 425~427
- 3 Noveli G D. Method of Analysis, 1955(2):189~213
- 4 Wakil S J, Hibscher G. J Biol Chem, 1960, 235: 1554
- 5 Abiko Y. Method in Enzymology, 1970, 18:314

Determining CoA by Simplification Sulfocylation

Ding Zhaokun* Xu Youqing Huang Yiming

Abstract This paper is about a simply sulfocylation way to determine coenzyme A (CoA) activity. The acetone pigeon liver powder was replaced by fresh pigeon liver enzymes fluid in the new way; a simply apparatus was designed to reserve fresh enzymes fluid; the operation process was simplified; the determination exactitude was kept and well done again.

Keywords sulfocylation, acetylase, coenzyme A

* Department of Biology