

6 酵素活性測定：

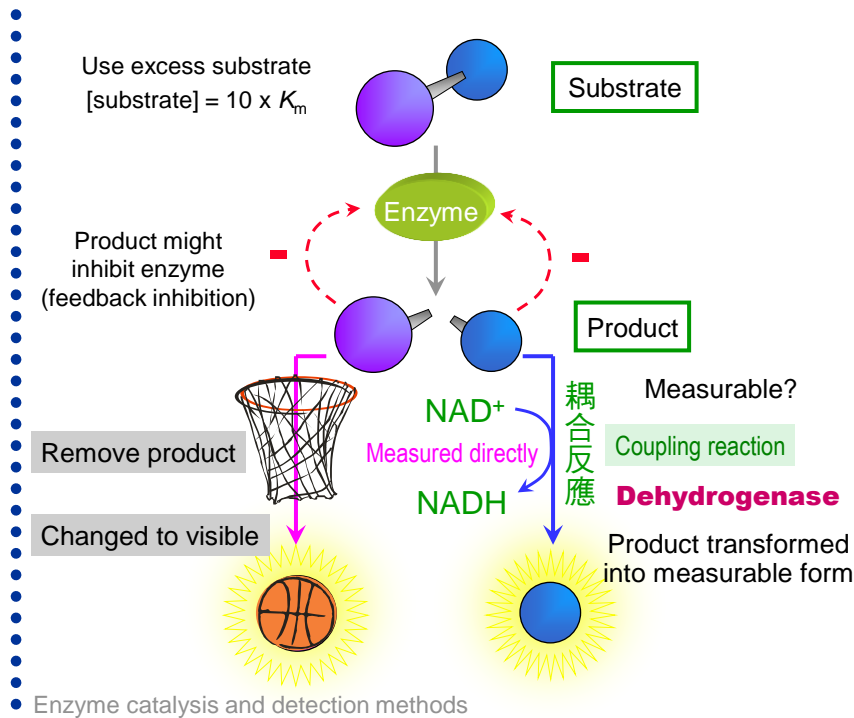
6.1 催化反應：

a. 反應設計原則：

大部分酵素反應方式，都可包括在圖 6.1 的大綱中。建立酵素活性測定步驟時，請注意以下原則：

- (1) 測定生成物的產生量，比測基質(反應物)的消失量，更方便且靈敏。除非不得已，儘量避免測定反應物。
- (2) 反應流程儘量簡單，太複雜的操作過程，增加工作量及成本，且容易造成失誤。
- (3) 複雜的反應，可能產生某些意外的生成物(或 pH 改變)，回饋抑制酵素反應(圖 6.1 中以負號表示)。
- (4) 反應條件必須有利於指定反應方向，可以移除生成物(以籃框表示)或連上耦合反應。
- (5) 小心樣本中有無其他酵素(或抑制劑)干擾，會因為消耗反應物或生成物，加強或減弱目標酵素的活性，造成假象而誤判。

圖 6.1 酵素反應及偵測方法



b. 反應基質及酵素濃度：

在試管中進行的酵素活性分析，與生物體內的酵素反應，有相當差距。為使反應達最大活性 (V_{max})，或往指定方向進行，所使用基質濃度為十倍 K_m 。反應的最適 pH、溫度、時間等條件，均需以實驗求得，尤其酵素的用量影響結果甚鉅，要事先找出最適當的使用濃度。

c. 不要忘了基本的酵素動力學：

本課程的主旨是在探討酵素的純化技術與分析方法，對於酵素的催化行為以及所衍生的基礎知識，並沒有討論很多。但是，不要忘了後者才是研究酵素的最終目的，由簡單的動力學分析，就可以得知許多酵素與其基質間的作用關係，以及酵素催化的分子機制，請務必要體會這一點提醒，也要隨時回顧基本的酵素動力學。

6.2 酵素活性分析：

酵素活性的偵測，通常是固定在一段時間 (t) 內，觀察生成物的產量 (P)。因此反應進行一定時間後需中止反應，再進行生成物的定量。而 P/t 即為此酵素的反應速率 (v₀)，也就是酵素活性。但若可以連續記錄反應過程，則有無中止反應並不重要。

6.2.1 酵素活性測定方法：

反應一段時間 (t) 後中止反應，測生成物量 (P) 即得活性 (P/t)。以下為各種測定生成物的方法，任何物理、化學甚或生物方法都可使用。

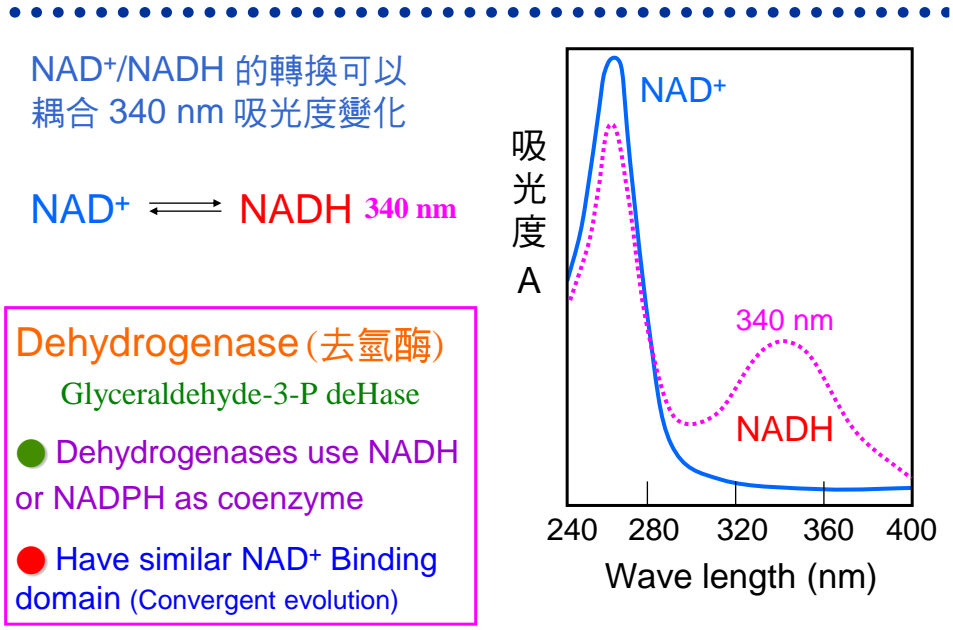
a. 直接測定生成物：

所有去氫酶均可測定 NAD⁺ 與 NADH 間的變化量，即為去氫酶的活性。例如酒精去氫酶催化下式之正反向反應：



反應液中 NADH 在 340 nm 波長有吸光變化 (如圖 6.2)。

圖 6.2 Coenzyme NADH



b. 耦合反應法：

若生成物 (P) 無法直接測得，設法把生成物再進行耦合反應，變成可測量的產物 (Q)。很多酵素可耦合到上述去氫酶的反應，則可測 340 nm 波長變化。



c. 化學測定法：

若生成物具有化學活性，則可直接進行化學反應，例如蔗糖以轉化酶 (invertase, IT) 水解成果糖及葡萄糖，兩個單糖產物都是還原糖，可測定所生成還原糖之還原力。

d. 放射線測定法：

若基質分子中含放射性核種，酵素反應後追蹤生成物的放射線量，即可知酵素活性。麻煩的是，要分離反應物及生成物，有時不太容易，可用 HPLC、濾紙色析法 (PPC) 或離子交換法等。

e. 測壓法 (manometry)：

若生成物為氣體，則可測定氣體體積之增加量。尤其有氧氣生成時，可用 Warburg 氏呼吸計測之。

f. 電極：

有些電極可直接測定反應的變化，例如若有 pH 或氧濃度的改變，則可用 pH 計或氧電極。酵素電極把酵素固定在薄膜上進行反應，然後直接測定反應物的改變，相當方便，但多用在工業或醫療界有大量樣本時。

g. HPLC 檢定法：

若產物無法以其他任何方便的方法檢測時，最終可用 HPLC 來分析產物，但相當費時且需要較昂貴的設備。

6.2.2 中止酵素反應方法：

注意任何中止反應的方法均不得破壞生成物，或干擾儀器測定。

- (1) 最常用急速加熱 (100°C 水浴) 10 min，注意有些蛋白質 (如 RNase) 仍然無恙。
- (2) 以 3~5% TCA (三氯乙酸) 改變 pH，使酵素變性沉澱，再離心去除沉澱取上清。
- (3) 用 1% SDS 中止反應，注意 protease K 等在 SDS 下仍有活性。
- (4) 若該酵素需二價離子，則加入 EDTA 中止反應。
- (5) 若該酵素有專一性抑制劑，則可加入抑制劑。
- (6) 若使用放射性基質，可加入大量不具放射性 (cold) 的基質，看來具有放射性的生成物不再產生了，但實際上酵素反應並沒有停止。

6.2.3 連續測定法 (continuous-reaction)：

連續測定法可不用刻意中止酵素反應，但通常要使用儀器即時監控生成物。

a. 連續測定法：

若酵素反應，在其反應過程中可以一邊進行觀察，則可連續測定反應的情形，不須中止反應，上述酒精去氫酶即可連續監視 340 nm 波長的變化。若生成物無法直接觀測，也可連接某一耦合反應，把生成物轉變為容易觀察的物質。

b. 連續的耦合反應：

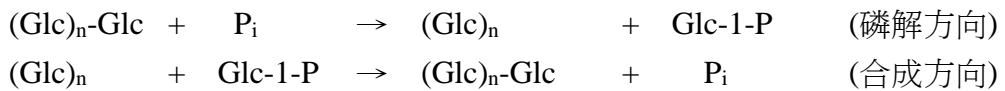
耦合反應在連續測定法應用相當多，但由於耦合反應更複雜，甚至成為一個迷你的代謝途徑。這種複雜的反應中有較多試劑與產物，許多不必要的副反應可能出現，干擾反應結果，因此要作好對照的控制組，以免有假結果出現。

6.2.4 澱粉磷解酶活性分析：

以澱粉磷解酶 (starch phosphorylase, SP; EC 2.4.1.1) 為例，說明如何以生物化學方法偵測其活性，並提醒活性分析如何受其他物質干擾而造成假象。

a. 澱粉磷解與合成：

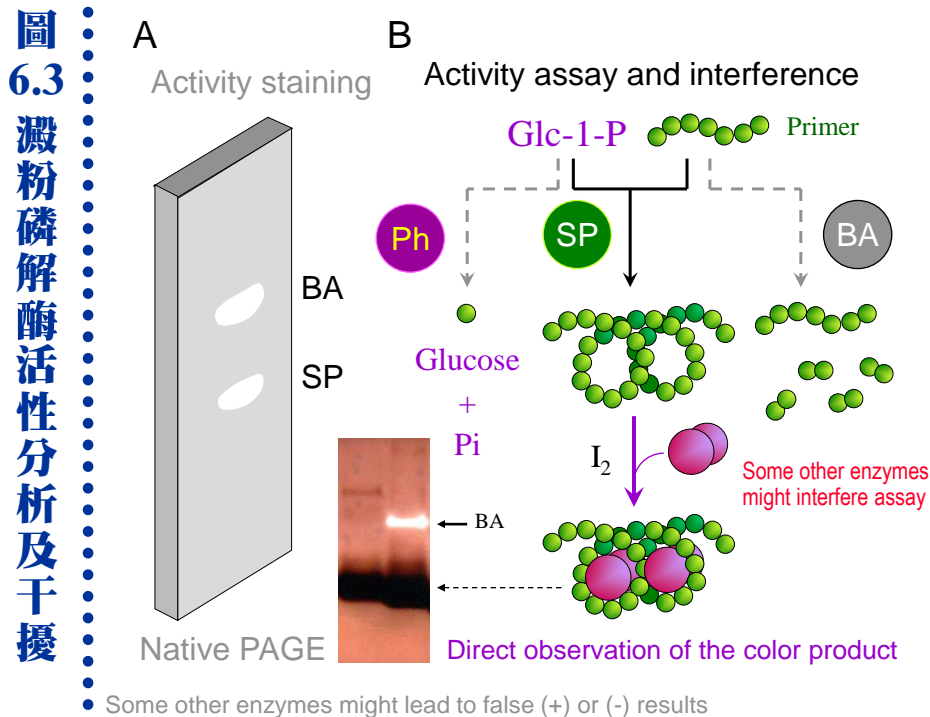
注意磷解 (加磷酸分解) 不是水解 (加水分解)，此反應為可逆 (Pi 為無機磷)：



合成方向反應可測無機磷 (Pi) 生成，而 Pi 的檢定有方便的化學呈色反應。反之，磷解方向應如何設計方便的活性分析方法？

b. 延長澱粉鏈：

澱粉磷解酶以可溶性澱粉 (Glc)_n 作為引子 (primer)，催化 Glc-1-P 連接到此引子上，成為較長的直鏈澱粉 (amylose)，因此可用碘液呈色觀察。在原態電泳膠片，澱粉磷解酶活性可利用此法染色，直接在膠片上看到酵素活性 (如圖 6.3 A)。



c. 小心其它干擾物質：

澱粉磷解酶的兩種基質很容易受到其它酵素的作用：可溶性澱粉受到 β-amylase (BA) 澱粉酶快速水解，澱粉磷解酶活性會被抑制。而 Glc-1-P 受 phosphatase (Ph) 磷酸酶的水解，產生游離的磷酸，會誤判為澱粉磷解酶的活性 (圖 6.3 B)。

6.3 維持酵素活性：

酵素是有活性的分子，因而可能隨時失去活性，應該考慮各種最佳的環境與條件，以便使酵素保持在最安定的狀態，其中酵素的緩衝液是最關鍵的因素。

6.3.1 緩衝液：

緩衝液可維持酵素溶液的恆定酸鹼度及離子濃度，兩者都會影響酵素的活性，請複習生物化學中緩衝液的作用原理。

a. 緩衝液有其使用範圍：

各種緩衝液都有其適用的 pH 範圍，表 6.1 列出常用的緩衝液。

表 6.1 各種常用緩衝液及其使用範圍：

緩衝液	適用 pH	使用上注意
Formate	3.0 ~ 4.5	容易揮發，可用冷凍乾燥除去
Citrate	3.0 ~ 6.2	小心會與二價金屬離子結合
Acetate	3.7 ~ 5.5	容易揮發，可用冷凍乾燥除去
◎ Phosphate	5.8 ~ 8.0	小心會與鈣離子結合沉澱，低溫下易結晶
HEPES	6.5 ~ 8.5	毒性較小，多用在細胞培養
◎ Tris	7.1 ~ 8.9	pH 受溫度影響很大，要用特殊電極
Borate	8.1 ~ 9.0	
Carbonate	9.7 ~ 10.7	小心會與金屬結合沉澱
Universal	2 ~ 12	數種不同 pH 範圍的緩衝液混合而成

◎ 兩種最常用的緩衝液，注意其使用上的特性。

b. 添加物都有作用：

經常在緩衝液中加入一些物質，以增加酵素安定以保持活性(表 6.2)，要小心這些添加物是否影響活性分析，是否影響下一步實驗。(參考 6.3.3)

表 6.2 緩衝液常用的添加物：

添加物質	作用	一般使用濃度
NaN ₃ (sodium azide)	抑菌劑	0.01%
EDTA, EGTA	除去二價離子	0.1~1 mM
β-Mercaptoethanol	抗氧化劑	1~10 mM
Dithiothreitol (DTT or DTE)	抗氧化劑	1~5 mM
BSA (bovine serum albumin)	安定劑	0.1~10 mg/mL
Tween-20, Triton X-100	界面活性劑	0.5~0.05%
Glycerol, glucose	防凍劑	50%
Urea 尿素	變性劑	6~8 M
PMSF, TPCK, TLCK, benzamidine 等	蛋白酶抑制劑	通常微量使用

c. 溫度的影響：

緩衝液用來維持溶液恆定 pH，請注意有些緩衝液的 pH 受溫度影響很大(如 Tris)。故

製備緩衝液時，要考慮此緩衝液將要在何種溫度下使用。

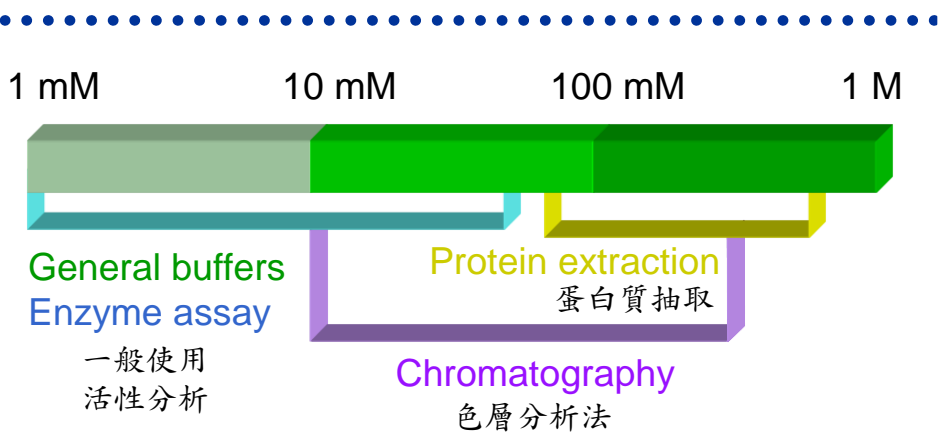
d. 濃度的影響：

改變緩衝液的濃度，可能會影響其 pH。使用不同緩衝液，酵素活性表現也會有差異，有些酵素甚至失去活性。通常若環境的 pH 變化較大，則需要使用較濃的緩衝液，圖 6.4 列出各種實驗情況下，緩衝液的使用濃度範圍。

e. Stock solution：

緩衝液可以十倍濃度貯存，高濃度可防止微生物生長，並保持每次實驗所使用藥品的穩定度與一致性。注意在稀釋後，溶液的 pH 也許會有改變，尤其是磷酸緩衝液很容易受到濃度改變而影響其 pH。

圖 6.4 緩衝液使用濃度範圍 Concentration ranges



6.3.2 試劑的保存：

試劑的適當保存非常重要，要依照廠商所指示的溫度貯存。

a. 避免潮解：

注意每當試劑由冷藏庫取出時，要等它回到室溫後才能打開，否則水氣會附在藥品的表面，進而潮解或破壞之。

b. 分裝凍藏：

常用的冷藏藥品以小量分裝 (aliquot) 後凍藏，是最好的貯藏方式，尤其是溶液狀態的生物活性試劑 (如酵素)，切勿反復凍結-解凍。有些酵素經不起凍藏，一旦結冰後再解凍，活性快速下降 (為什麼?)。例如上述澱粉磷解酶請勿凍藏，放在 4°C 即可。

c. 甘油凍藏：

於低溫 (-20°C) 貯藏的酵素溶液，若保存在 50% 甘油就不會凍結，隨時取用。但請注意所含的甘油，對下一步反應有無影響。

d. 避光防菌：

很多試劑要避光貯存，或須放在乾燥器中，避免長霉長菌。

6.3.3 酵素活性之維持：

a. 酵素的安定性不同：

酵素在細胞中合成後，有的分泌到細胞外，有的運送到細胞器官中貯存或應用。前者(分泌性酵素)因為要在細胞外的惡劣環境中生存，因此較為堅韌，不易受到破壞；反之，細胞內的酵素，都以較濃的濃度集中在保護良好的胞器內或胞膜上，一旦抽離細胞暴露在氧氣中，可能很容易失去活性。

b. 酵素失活的原因：

可歸類成如下的物理性或化學性原因。

(1) 蛋白質變性：

離開細胞的生理環境後，蛋白質可能遇到極端的 pH 條件、不適的溫度、冰凍時被冰晶破壞，或使用變性劑(如 SDS、尿素)，均會使蛋白質的構形破壞。

(2) 酵素活性區破壞：

在抽取過程中，若失去 cofactor，或者活性區的關鍵胺基酸被修飾，均可造成。最常見的影響是氧化，尤其是 cysteine 上的 -SH 基很容易被氧化。一般加入 EDTA 除去可活化氧分子的二價離子，或加入抗氧化劑以其自身氧化防止 -SH 基氧化。

(3) 蛋白酶水解：

細胞內有許多蛋白酶，細胞被打破後即釋放到酵素溶液中，很快水解酵素。可用蛋白酶的抑制劑防止之，但蛋白酶有數大類，各有不同類的抑制劑。一般使用 PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) 是 Ser 型蛋白酶的抑制劑，但也抑制部分其它類型者，注意 PMSF 在水溶液中很快就會降解，每次使用都要重新補充。

(4) 酵素抑制劑：

在自然界中或以人工合成，發現許多酵素有抑制劑，可以專一性地抑制酵素活性；有可逆性的，也有不可逆的，通常不可逆抑制劑的效果都很強烈。

c. 如何保持活性：

若你的酵素不太穩定，活性不易保持，請參考下列處理方式：

- (1) 儘快進行純化及各項分析，隨時保持在 4°C 或冰浴中。
- (2) 讓酵素保存在硫酸銨固體沉澱中，要比溶液狀態安定得多。
- (3) 勿讓高純度的酵素，保存在稀濃度溶液中，否則要加 BSA 當安定劑。
- (4) 勿隨意凍結或解凍酵素液，可加防凍劑(如甘油或糖類)以液態保存。
- (5) 冷凍乾燥雖可長期保存酵素，但有些酵素活性可能會因而下降。
- (6) 若容易受微生物污染，可經無菌過濾後保存(當然也會損失一些酵素)。

6.3.4 酵素活性單位：

- a. 活性單位 (activity unit, U) 是酵素活性高低的指標。一個活性單位的標準定義，是在固定溫及 pH 下，每分鐘可催化 1 μmole 基質的活性。但很多情況下，為了操作或計算的方便，直接用測定產物所得的吸光值，除以單位時間來表示活性，因此各種活性單位的定義可能不同，請特別注意。
- b. 在提到酵素活性單位時，通常有兩種意思，一是指該酵素的總活性，單位就是 unit。

另外，因為酵素本身大多為蛋白質，因此有蛋白質的質量 (mg)，而 unit/mg 就是該酵素的比活性 (specific activity)。比活性當然越高越好，表示在比較少量的蛋白質中，擁有比較多活性，比活性高者其酵素的純度也比較好。

- c. 有關酵素活性及其基本背景，請複習生物化學中的酵素章節，你在大學所熟悉的基本酵素知識，在研究所或以後的任何階段，都還是完全適用。

問題集 (每個問題不一定都有標準答案，甚至會引起很大的爭議，但這就是問題集之主要目的)

1. 酵素活性的測定，可觀察反應物消失或者生成物生成，何者較佳？請述明理由。 [2]
2. 活性分析時通常使用大量基質，要大到多少？(有一個公認的估計) 其目的何在？ [3]
3. 在設計一個酵素活性分析方法時，應當注意那些要點，以免低估酵素活性？ [3]
4. 酵素的催化條件受環境因子影響很大，而在試管中的反應與在細胞內的催化環境，一定有很大的差異，請儘你所知舉出兩者的差別，並說明其利弊。 [3]
5. 酵素催化反應時若能把生成物除去，有何好處？如何以物理或化學方法去除之？ [3]
6. 測定酵素活性為何要中止酵素反應？何種情況下可以不必中止反應？ [3]
7. NAD^+ 如何進行其輔酶的作用？請寫出其構造式。 [1]
8. NAD^+ 為何能在 340 nm 波長的吸光有變化？ [1]
9. NADH 與 NADPH 有何不同？能否互相通用？ [2]
10. 340 nm 應當使用 UV 或者可視光的光源？ [2]
11. 若生成物無法直接偵測，則要如何進行活性分析？ [2]
12. 分析酵素活性時，雖然耦合反應與主反應一起連續著進行，但在反應動力學及實驗操作上，或者反應過程中基質及生成物的濃度上，二者有相當的差別，請檢討兩種反應的異同點。 [4]
13. 在酵素活性分析時，佐以耦合反應，有何好處？但有什麼可能的缺點？ [3]
14. 請詳究澱粉磷酸解酶 (starch phosphorylase) 的催化反應，請列出所有可能的活性分析方法。 [2]
15. 何為還原糖？為何蔗糖不是還原糖，而葡萄糖及果糖則是？ [1]
16. 請寫出轉化酶 (invertase) 的催化反應，並舉出可能的生成物偵測方法。 [2]
17. 請幫轉化酶設計一個使用放射線的活性分析方法。 [3]
18. 某酵素催化基質 AH，產生反應物 B 及 H^+ ，請問最方便的活性分析法為何？ [4]
19. Phytochelatase synthase (PCS) 催化以下的反應，請幫忙設計活性分析方法： [3*]
$$\gamma\text{-Glu-Cys-Gly} + \gamma\text{-Glu-Cys-Gly} \rightarrow \gamma\text{-Glu-Cys-}\gamma\text{-Glu-Cys-Gly} + \text{Gly}$$
20. 有那些試劑或處理方式可以使蛋白質變性？其原理或機制各為何？ [1]
21. 為何改變 pH 可以使得蛋白質沉澱下來？其變性的機制為何？ [2]

22. EDTA 與 EGTA 有何不同？在使用上有何差異？ [1]
23. 使用放射性試劑時，何謂 pulse-chase？在實驗上有何用途？ [3]
24. 許多酵素在冰凍後受到傷害，活性因而下降，為此經常把酵素放在含有 50% 甘油的緩衝液中，凍藏在 -20°C 中就不會結冰，可以直接取出來使用，非常方便。某生以此方式保存酵素，但每次取出來做活性分析時，分別取出 10 到 100 μL 體積，想要做一條校正直線 (酵素體積 vs 活性)，但是無論嘗試幾次，這條直線的精準度都很差，檢測點大多無法落在直線上，請幫忙找出可能的原因，並且建議改善方法。 [4*]
25. 通常要進行活性分析的樣本都要稀釋，若某酵素的稀釋度為 1:10 時，測得 2 U/mL 的活性；當稀釋為 1:50 時，活性為 0.6 U/mL；稀釋 1:1000 時，活性為 0.05 U/mL。請問你應當如何判別所得數據？如何取捨？為何有這樣的情形？ [5*]
26. 酵素試劑通常都很貴，某生要購買酵素 X 做為實驗的標準品，發現廠商有多種形式如下，請問你如何幫他訂購最合適的種類？括號內為美元報價。 [5]
 - Type X-1: 1,000 units/1 gm (USD 10.00), Type X-2: 100 units/1 mg (USD 100.00)
 - Type X-3: 1,000 units/10 gm (USD 5.00), Type X-4: 50 units/0.1 mg (USD 500.00)

(也請解答 0 酵素實驗室問題集的題目：5, 7~15 題)

[題目後面方括號內的數字代表該題的難易程度，3 為中等而 5 最難回答，標有 * 為實際問題]