

## 双酶偶联催化分光光度法测定血清次黄嘌呤

李忠琴<sup>1,2</sup>, 许小平<sup>1,2\*</sup>, 王 武<sup>1</sup>

1. 江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036  
2. 福州大学化学化工学院, 福建 福州 350002

**摘要** 依据黄嘌呤氧化酶和辣根过氧化物酶催化反应的特征,研究了以黄嘌呤氧化酶-辣根过氧化物酶-苯酚-4-氨基安替比林为反应显色体系,建立了检测血清和组织中次黄嘌呤浓度的新方法。通过对该测定体系影响因素的考察,确定最佳反应条件为:黄嘌呤氧化酶(XO, EC 1.2.3.22)  $0.32 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,辣根过氧化物酶(HRP)  $7.0 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,4-氨基安替比林(AAP)  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,苯酚(PA)  $6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 溶于  $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCL 缓冲液(pH 8.3);反应温度为  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,保温时间为  $8 \text{ min}$ ;检测波长为  $508 \text{ nm}$ 。测定次黄嘌呤浓度的线性范围为  $0.2 \sim 3.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,线性关系良好( $r=0.9979$ ),检测限为  $0.05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。方法操作简单易行,测定结果准确可靠。可有效应用于普通实验室和常规临床血液生化检测。

**关键词** 黄嘌呤氧化酶;辣根过氧化物酶;次黄嘌呤检测;分光光度

**中图分类号:** O657.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2008)09-2169-04

### 引言

次黄嘌呤是核苷的代谢产物,其氧化产物尿酸和氧自由基具有重要的生理及病理功能<sup>[1-4]</sup>。黄嘌呤氧化酶是嘌呤代谢途径中的限速酶,催化次黄嘌呤先氧化形成黄嘌呤,再进一步氧化生成尿酸和过氧化氢<sup>[3,5]</sup>。目前次黄嘌呤浓度测定主要是选用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)法<sup>[2]</sup>,由于黄嘌呤和次黄嘌呤的化学结构和性质差异微小,在 HPLC 条件下难以达到有效分离,而且还易受到其他核苷类化合物的干扰。酶催化反应具有反应底物专一性强的优点,且在多酶反应体系中,非限速步骤的反应速率不影响酶促反应全过程。本文根据辣根过氧化物酶(HRP)<sup>[6-8]</sup>与黄嘌呤氧化酶(XO)<sup>[9]</sup>的催化特性,提出了双酶偶联催化反应,用分光光度法检测次黄嘌呤的新方法。采用 XO-HRP-PA-AAP-HX 反应新体系生成氧化型色素,定量检测血清和组织中的次黄嘌呤浓度。该方法简便易行,结果准确可靠。可应用于常规临床检测的自动生化检测仪及普通实验室的可见分光光度仪上进行定量分析。

### 1 实验部分

#### 1.1 主要试剂及仪器

紫外-可见分光光度仪(日立 U-300 型),恒温水浴锅(H. H. S 11-2R, 上海医疗器械五厂),高速冷冻离心机(Hitachi CR22G 型)。黄嘌呤氧化酶( $0.67 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ , Sigma),辣根过氧化物酶( $250 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ , 上海双向西巴斯科技有限公司),4-氨基安替比林(AR, 华东师范大学化工厂),苯酚(AR, 国药集团上海化学试剂公司),次黄嘌呤(99%, Fluka), Tris(BR, 国药集团化学试剂有限公司),三氯醋酸、HCL(盐酸, AR, 国药集团上海化学试剂公司),叠氮钠(BR, 厦门新隆达试剂有限公司)。

#### 1.2 实验方法

配制反应显色液:4-氨基安替比林(4-Aminoantipyrine, AAP),  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;苯酚(Phenic Acid, PA),  $6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;Tris-HCL 缓冲液(pH 8.0),  $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;叠氮钠,  $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ;辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP),  $7.0 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

在试管中依次加入  $3 \text{ mL}$  反应显色液,  $100 \mu\text{L}$  黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XO)酶液(终浓度为  $0.32 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),及一定量的次黄嘌呤(hypoxanthine, HX)溶液。混合在  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  保温  $8 \text{ min}$ ,然后煮沸  $2 \text{ min}$  终止反应,立即冰水冷却。以不加 HX 的反应体系作为参比,测定其可见吸收光谱。

#### 1.3 样品的前处理

血清标本的采集与处理:采集患者空腹静脉全血  $5 \text{ mL}$ ,

收稿日期:2007-02-08, 修订日期:2007-05-16

基金项目:工业生物技术教育部重点实验室基金项目(KLIB-KF200502)和福建省自然科学基金项目(2008J0100)资助

作者简介:李忠琴,女,1976年生,江南大学讲师 e-mail: Lzq7626@163.com \* 通讯联系人 e-mail: xu@fzu.edu.cn

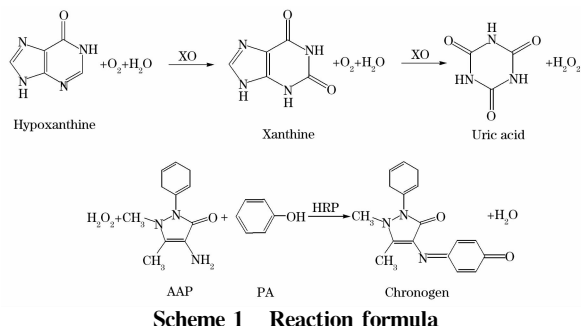
室温静置 30 min; 于  $5\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  室温离心 5 min; 取出上层的血清, 分装, 立即冻存于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 备用。

组织标本的采集与处理: 取新鲜鼠肝组织, 充分匀浆后离心取上清液 0.1 mL, 加入 10% 三氯醋酸 0.1 mL, 混匀沉淀蛋白,  $10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  高速离心 10 min, 取上清液进行检测。

## 2 结果与讨论

### 2.1 双酶偶联测定法原理

黄嘌呤氧化酶在催化次黄嘌呤氧化的反应过程中, 每氧化 1 mol 次黄嘌呤, 将消耗 1 mol 分子氧和水, 产生 1 mol 尿酸和 1 mol 过氧化氢。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 再经辣根过氧化物酶作用分解, 可使 4-氨基安替比林与苯酚形成亚醌类呈红色的化合物(Chromogen)。反应体系中 HRP 和 XO 酶充分过量的条件下, 根据生成的红色化合物在可见光范围内测定的吸光度值大小即可推算出样品中次黄嘌呤的含量。总反应式见 Scheme 1。



Scheme 1 Reaction formula

### 2.2 吸收光谱

按 1.2 节实验方法依次加入除次黄嘌呤以外的试剂, 以 Tris-HCL 缓冲液为参比, 从 300~700 nm 扫描该体系的可见吸收光谱。如图 1 中曲线 1 所示, 仅在 300 nm 有 1 个强吸收峰。加入 HX 反应后再扫描体系的吸收光谱, 从曲线 2 可看出体系反应产物在可见光区 450~650 nm 之间只有 1 个宽幅吸收峰, 选择吸收峰值最高处的波长 508 nm 作为 HX 含量检测波长, 可降低干扰, 提高检测灵敏度。

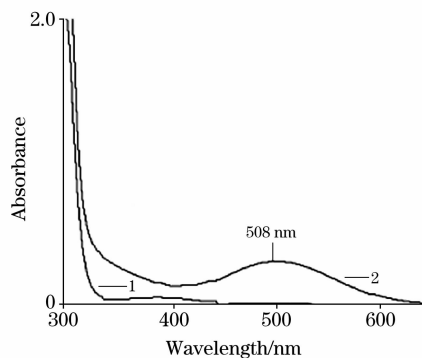


Fig. 1 Visible absorption spectra for catalyzing reaction system of quantifying hypoxanthine

1: Without xanthine; 2: With xanthine

### 2.3 酶催化反应动力学性质

按 1.2 节实验方法, 分别反应 1, 3, 6, 9, 10, 12, 13, 18, 20, 25, 30 min 后终止, 在 508 nm 测其吸光度值, 结果见图 2。在 HX 加入测定体系后, 吸光度值随反应时间增加逐渐增大。至 20 min 后, 吸光度值达到最大, 用  $A_{\max}$  表示。用一级动力学方程描述吸光度与时间之间的关系曲线得到图 3, 结果显示该体系反应很好地符合一级反应, 动力学方程为:  $\ln(A_{\max} - A_t) = -0.1894t - 0.6195$ , 相关系数  $r = 0.9949$ 。虽然体系中包含两种酶促反应, 但是由于 HRP 的催化效率极高, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 一经生成立刻分解出初生态氧, 而且 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化苯酚反应比黄嘌呤的氧化反应要快得多, 故该体系的综合反应是准一级反应。在酶促反应 10 min 之前, 体系中红色产物的生成量与时间近似呈线性关系, 故确定该检测时间居于 5~10 min 之间。本实验选定酶促反应时间为 8 min。

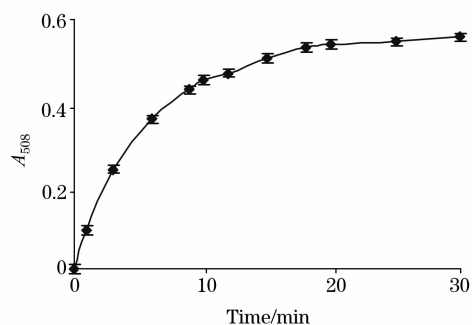


Fig. 2 Curve of absorbance versus time in reaction system  
 $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH } 8.0$

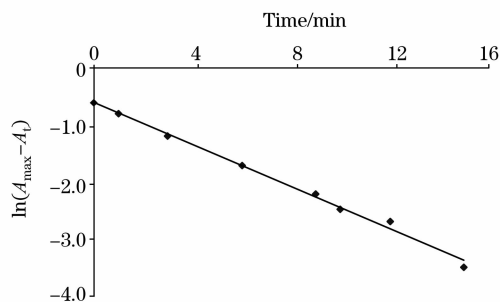


Fig. 3 Kinetic curve of the XO-HRP-PA-AAP-HX reaction system

$T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH } 8.0$

### 2.4 显色反应体系的温度和 pH

在 XO 和 HRP 酶促反应的稳定 pH 和温度范围内, 考察不同温度和 pH 对显色反应的影响。(表 1 和表 2) 表明, 温度和 pH 对体系反应速率均有较大影响, 两者具有相似的变化规律。随着温度的升高, 体系吸光度值先增大后减少, 即显色物的生成量先增后减。在  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  时, Chromogen 的吸光度达到最高值。在 pH 7.5~8.3 范围内, 随着 pH 的提高, 显色吸光度增大。故确定该反应体系的最适反应温度和 pH 分别为  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  和 8.3。

**Table 1** Effect of temperature on reaction system for quantitating the concentration of hypoxanthine

Temperature/°C	$A_{508}$	Temperature/°C	$A_{508}$
30	0.390 2	40	0.451 3
35	0.470 8	45	0.446 2
37	0.534 7		

**Table 2** Effect of pH on reaction system for quantitating the concentration of hypoxanthine

pH	$A_{508}$	pH	$A_{508}$
7.5	0.472 5	8.5	0.523 4
8.0	0.513 2	9.0	0.430 5
8.3	0.608 1		

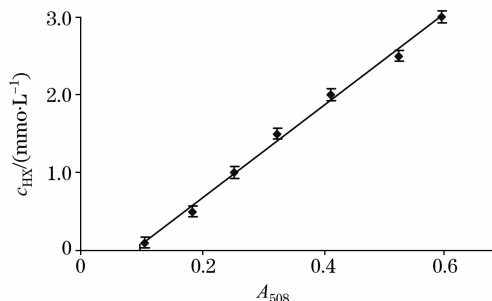
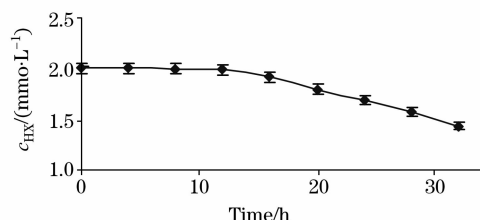
## 2.5 测定方法的线性范围和检测限

配制不同浓度的次黄嘌呤溶液加入测定体系,以反应终止后测得的吸光度值  $A_{\max}$  为横坐标, HX 浓度为纵坐标, 绘制一条标准曲线(见图 4)。结果表明本体系中测定 HX 含量的线性范围在  $0.1 \sim 3.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  之间, 线性回归方程为:  $c_{\text{HX}} = 5.814 6A_{508} - 0.509 2$ , 其相关系数  $r = 0.997 9$ , 检测限为  $0.05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

## 2.6 显色稳定性、精密度试验

将反应终止后的溶液, 放置室温, 每隔 10 min 测定其

吸光度, 考察显色终止液的稳定性。测定结果显示终止反应后 1 h 内, 该溶液的吸光度数值没有明显的变化。对已知浓度为  $1.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  HX 标准液平行测定 9 次, 平均结果为  $1.572 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{RSD} = 1.7\%$ 。表明用本方法测定 HX 的精密度令人满意。

**Fig. 4** Standard curve of determining hypoxanthine**Fig. 5** Enzyme stability for detecting the concentration of hypoxanthine with different keeping time**Table 3** Determination of concentration of hypoxanthine in sample

Sample	Assay hypoxanthine by this method/( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )				Assay hypoxanthine by HPLC/( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )			
	Assay concentration	Addition	Assay value	Recovery /%	Assay concentration	Addition	Assay value	Recovery /%
Serum	0.34	0.8	1.12	98.2	0.39	0.8	1.23	103.4
Tissue Homogenate	0.56	0.8	1.32	97.1	0.67	0.8	1.67	113.6

由于黄嘌呤氧化酶的稳定性较低, 且酶在稀溶液中易失活, 故考察了  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  放置不同时间的酶储液对已知浓度 HX 标准液测定结果的影响(见图 5)。新配制的酶储液在 10 h 内作为次黄嘌呤的定量检测液, 其测定结果是可靠的。

## 2.7 实际试样分析和回收率试验

按本文建立的测定方法及 HPLC 法进行加标做回收试验, 在血清和组织匀浆液中分别添加  $0.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  HX 标准液, 再测定样液中 HX 的含量, 每个试样均测定 5 次, 取平均值。比较此法与 HPLC 法测定血清和组织匀浆液中次黄嘌呤的含量, 结果见表 3。采用本法测得回收率均大于  $97\%$ , 说明该方法用于测定不同样液中的次黄嘌呤含量具有可靠性。由于组织匀浆液的成分较血清成分复杂, 对 HPLC 分离次黄嘌呤有较大影响, 故测定值误差较大。

## 2.8 不同化学物质对偶联酶法测定次黄嘌呤的影响

本文提出偶联双酶法测定次黄嘌呤浓度, 该酶催化显色过程为氧化反应。生物酶制剂的催化活力易受到一些化学物质的抑制或激活, 故可能造成测定准确度下降。为尽可能避免检测过程造成测量误差, 在检测体系中添加低浓度各种化学物质测定已知浓度 HX 标准液( $0.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 考察了

**Table 4** Effect of some chemicals on the system of catalytic spectrophotometric quantitation for hypoxanthine

Chemicals	Concentration	Relative deviation/%
Control	—	100
$\text{C}_7\text{H}_5\text{NaO}_3$	$1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	113
$\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2$	$1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	105
$\text{C}_5\text{H}_9\text{N}_3$	$1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	108
EDTA	$1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	101
Tween 80	0.1%	98
SDS	0.05%	102
Triton X-100	0.1%	97
$\text{C}_5\text{H}_7\text{N}_5\text{O}$	$1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	31
$\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_7\text{O}_8$	$1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	15
$\text{MnSO}_4$	$5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	72
$\text{MgSO}_4$	$5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	85
CaCl	$5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	91
$\text{ZnSO}_4$	$5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	67
$\text{FeSO}_4$	$5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	95
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	$35 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	83
$\text{CuSO}_4$	$5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	27
AgCl	$5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	0
$\text{HgSO}_4$	$5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	0

不同化学物质对测定结果的影响(见表 4)。水杨酸钠、半胱氨酸、组胺、乙二胺四乙酸盐对 XO 和 HRP 酶促反应有明显的促进作用,使 HX 测定值略高于标准值。表面活性剂吐温 80、SDS 和 Triton X-100 对 XO 和 HRP 酶促反应几乎没有影响, HX 测定值偏差很小。金属离子大多数能抑制 XO 和 HRP 的活力,其中  $\text{Ag}^+$  和  $\text{Hg}^{2+}$  能使酶完全失活,故无法测定 HX 浓度。

### 3 结 论

本文提出了 XO-HRP-PA-AAP 反应显色体系测定血清

和组织中次黄嘌呤含量的新方法,其检测结果具有较高灵敏度和精密度,是一种简便、稳定、准确可靠的方法,适用于采用普通实验室分光光度仪和常规生化自动检测仪测定复杂样液种次黄嘌呤浓度的含量。该检测方法的反应条件为充分过量的酶液 XO  $0.32 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ , HRP  $7.0 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 4-AAP  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , PA  $6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  溶于  $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH 8.3 的 Tris-HCl 缓冲液;反应温度  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 保温时间 8 min, 检测波长 508 nm。

### 参 考 文 献

- [1] Borges F, Fernandes E, Roleira F. *Curr. Med. Chem.*, 2002, 9: 195.
- [2] Chris A Pritsos. *Chemico-Biological Interactions*, 2000, 129: 195.
- [3] R. Harrison. *Free Radical Biology & Medicine*, 2002, 33(6): 774.
- [4] Cory A H, Owen T C, Barltrop J A. *Cancer Commun.*, 1991, 3: 207.
- [5] Harris C M, Massey V. J. *Biol. Chem.*, 1997, 272: 8370.
- [6] CHEN Hai-ming, LI Tong-hua, CHEN Kai(陈海明, 李通化, 陈 开). *Chinese J. Anal. Chem. (分析化学)*, 2002, 30(6): 654.
- [7] WEI Yong-feng, YAN Hong-tao(魏永锋, 阎宏涛). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2001, 21(5): 704.
- [8] XU Sheng, DENG Jian, XU Jin-sheng, et al(徐 生, 邓 健, 许金生, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2006, 26(3): 526.
- [9] CUI Xiao-bing, LI Wei, ZHANG Ke-wei, et al(崔小兵, 李 伟, 张科卫, 等). *Chinese Journal of Marine Drugs(中国海洋药物)*, 2006 25 (2): 58.

## Catalytic Spectrophotometric Quantitation for Hypoxanthine by Conjugating Xanthine Oxidase with Horseradish Peroxidase

LI Zhong-qin<sup>1, 2</sup>, XU Xiao-ping<sup>1, 2\*</sup>, WANG Wu<sup>1</sup>

1. The Key Laboratory of Industry Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China
2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Fuzhou University, Fuzhou 350002, China

**Abstract** A novel technology to determine the concentration of hypoxanthine through the chromogenic reaction of phenic acid (PA), 4-aminoantipyrine(AAP) and hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), which was produced via the oxidation of hypoxanthine catalyzed by xanthine oxidase(XO), under the help of horseradish peroxidase(HRP) was proposed in the present paper, according to the reaction of molybdoenzyme xanthine oxidase (XOD, EC 1.2.3.22) which mainly catalyzes the conversion of hypoxanthine and xanthine to xanthine and uric acid, respectively, and is capable of reducing oxygen to generate the reactive oxygen species (ROS), superoxide and hydrogen peroxide. The influences of temperature and pH on the system were investigated. The optimal conditions to determine the concentration of hypoxanthine were obtained as follows: XO ( $0.32 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), HRP ( $7.0 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 4-Aminoantipyrine ( $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), and phenic acid ( $6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) were dissolved in  $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl buffer solution (pH 8.3), and the reaction system was incubated in thermostat of  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  for 8 min, the absorptive wave length was 508 nm. Under the conditions mentioned above, the linear range of calibration curve was between 0.2 and  $3.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , the correlation coefficient was 0.997 9, and the limit of detection was  $0.05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ . All these show that this technology is a potential alternative method to determine the concentration of hypoxanthine in areas like for example in laboratory or clinical serum diagnosis.

**Keywords** Xanthine oxidase; Horseradish peroxidase; Hypoxanthine determination; Spectrophotometry

\* Corresponding author

(Received Feb. 8, 2007; accepted May 16, 2007)