

## 脲酶 $K_m$ 值简易测定方法的改进

李帮秀\* 胡奎 刘大军 徐鹏芬

西南农业大学农学与生命科学学院, 重庆 400716

### Improvement for A Simplified Way to Assay Urease $K_m$

LI Bang-Xiu\*, HU Kui, LIU Da-Jun, XU Peng-Fen

College of Agronomy and Life Sciences, Southwest Agricultural University, Chongqing 400716, China

**提要** 对脲酶  $K_m$  值简易测定方法中存在的问题和  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  标准溶液浓度、尿素浓度、脲酶终止剂、缓冲液系统以及脲酶用量等因素对  $K_m$  值的影响, 进行了多组对比测定。将该方法测定条件优化为:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  标准溶液浓度  $0.001 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 尿素浓度  $1/250$ 、 $1/200$ 、 $1/150$ 、 $1/100$ 、 $1/50 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 终止剂 10% 硫酸锌, 缓冲液  $1/15 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris- $\text{H}_2\text{SO}_4$  (pH 7.0), 脲酶用量 0.50 mL。

**关键词** 脲酶  $K_m$  值; 简易测定方法; 改进

脲酶  $K_m$  值(米氏常数)简易测定方法<sup>[1]</sup>是高等农业院校生物化学和应用酶学等课程常开设的实验项目之一。由于反应溶液随着尿素浓度的增加, 显色液出现由黄色逐渐变为棕红色两种颜色, 且由透明变为浑浊, 吸光值变化不定, 实验计算出的  $K_m$  值与实验特定底物——脲酶  $K_m$  值(即文献报道值  $25 \text{ mmol}$ , 下同)<sup>[2]</sup>相差甚远或  $K_m$  值为负, 实验结果欠佳(不可靠)。为此, 我们对此项实验条件进行了探讨和改进。

### 材料与方法

#### 1 实验材料

实验材料为我校农学与生命科学学院大豆研究室提供的西豆4号(*Glycine max* L. var. Xidou No. 4)。脲酶的提取与文献 1 相同。

#### 2 实验仪器和试剂

实验所用仪器与文献 1 中的相同。

标准曲线所用  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  溶液浓度为 3 个组合: (1)原方法的  $0.005 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , (2)  $0.001 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , (3)  $0.002 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 溶液浓度原方法为  $1/50$ 、 $1/40$ 、 $1/30$ 、 $1/20 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 本文设 3 个组合进行对比: (1)  $1/250$ 、 $1/200$ 、 $1/150$ 、 $1/100$ 、 $1/50 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , (2)  $1/100$ 、 $1/80$ 、 $1/60$ 、 $1/40$ 、 $1/20 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , (3)  $1/60$ 、 $1/50$ 、 $1/40$ 、 $1/30$ 、 $1/20 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 终止剂用 10%  $\text{ZnSO}_4$  溶液与  $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的  $\text{HCl}$ <sup>[3]</sup> 溶液进行对比; 缓冲溶液用  $1/15 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  磷酸缓冲液

(pH 7.0) 与  $1/15 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris- $\text{H}_2\text{SO}_4$  缓冲液 (pH 7.0)<sup>[4]</sup> 进行对比; 脲酶用量以 0.25、0.50、0.75 mL 进行对比; 实验的其它条件与原方法相同。

#### 3 操作程序

按原方法的程序测定  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  标准溶液 3 种浓度、不同体积的吸光值, 回归分析得出回归方程, 然后, 对各尿素组合浓度中的每一浓度进行 3 次平行测定, 取每一种浓度吸光值的平均值, 并根据各组合浓度所得的吸光值范围, 按对应的标准溶液的吸光值的回归方程计算  $K_m$  值。

### 实验结果

#### 1 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 标准溶液浓度对吸光值的影响

从表 1 可知, 当  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  标准溶液浓度为  $0.001$ 、 $0.002$  和  $0.005 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  摩尔数与吸光值的相关系数 ( $R^2$ ) 分别为  $0.9955$ 、 $0.9992$  和  $0.9719$ 。随着  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  摩尔数的增加, 比色液由黄色变为红棕色, 由透明变为浑浊; 当  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  标准溶液摩尔数为  $8\times 10^{-7}$  时, 吸光值迅速增加, 无法准确记录。

#### 2 不同浓度尿素溶液和终止剂对 $K_m$ 值的影响

从表 2 可知, 尿素溶液浓度相同时, 用 0.2

收稿 2005-01-17 修定 2005-06-28

资助 重庆市精品课程项目和西南农业大学实验教学改革创新项目。

✉-mail: libangxiu@163.com, Tel: 023-68250794

表1 不同浓度  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  溶液对吸光值的影响

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度/ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ( $\times 10^{-7}$ )	摩尔数	吸光值	回归方程	相关系数
0.001	1	0.058	$y=432000x+0.0096$	$R^2=0.9955$
	2	0.089		
	3	0.140		
	4	0.181		
	5	0.228		
0.002	2	0.089	$y=520500x-0.0203$	$R^2=0.9992$
	4	0.181		
	6	0.293		
	8	0.394		
0.005	5	0.228	$y=775200x-0.2406$	$R^2=0.9719$
	10	0.503		
	15	0.872		
	20	1.181		
	25	1.827		

$\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  盐酸作终止剂所得的吸光值比 10% 硫酸锌的大。用  $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  盐酸作终止剂时,  $K_m$  值随着尿素浓度的增加而增加; 用 10% 硫酸锌作终止剂时,  $K_m$  值随着尿素浓度的增加呈现无规律的变化。用 10% 硫酸锌和尿素浓度较低[组合(1)]时,  $K_m$  值与文献报道值接近, 相关系数为 0.9484; 其

余两组合的  $K_m$  都只有几个  $\text{mmol}$ , 与文献报道值相差较大。但当尿素增加到  $1/100 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 不管用  $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  盐酸或 10% 硫酸锌作终止剂, 比色液都会出现与制作标准曲线相同的现象: 颜色变红, 出现浑浊。

### 3 不同浓度尿素和缓冲液对 $K_m$ 值的影响

从表 3 可知, 当尿素浓度为  $1/250$ 、 $1/200$ 、 $1/150$ 、 $1/60$ 、 $1/50$ 、 $1/40$ 、 $1/30 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时,  $1/15 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  磷酸缓冲液 (pH 7.0) 比  $1/15 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris- $\text{H}_2\text{SO}_4$  缓冲液 (pH 7.0) 所得到的比色液吸光值小; 当尿素浓度为  $1/100$ 、 $1/80 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 上述 2 种缓冲液所得到的比色液吸光值相等或接近; 当尿素浓度为  $1/20 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时,  $1/15 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  磷酸缓冲液 (pH 7.0) 比  $1/15 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris- $\text{H}_2\text{SO}_4$  缓冲液 (pH 7.0) 所得到的比色液吸光值大。用  $1/15 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  磷酸缓冲液 (pH 7.0), 组合 1、2、3 的  $K_m$  值差异较大, 分别为 22.98、3.90、7.17  $\text{mmol}$ ; 用  $1/15 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris- $\text{H}_2\text{SO}_4$  缓冲液 (pH 7.0), 相应的  $K_m$  值分别为 3.48、3.74、4.04  $\text{mmol}$ , 差异较小。

当尿素浓度增加到  $1/80 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 不管是用  $1/50 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  磷酸缓冲液 (pH 7.0) 还是用  $1/15 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$

表2 不同浓度尿素和终止剂对  $K_m$  值的影响

尿素浓 度组合	尿素浓度/ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	终止剂								
		0.2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸				10% 硫酸锌				
		吸光值	回归方程	双倒数方程	$K_m$ 值/ $\text{mmol}$	吸光值	回归方程	双倒数方程	$K_m$ 值/ $\text{mmol}$	
(1)	1/250	0.239	$y=520500x-0.0203$	$y=10500x+5E+06$	2.10	0.129	$y=520500x-0.0203$	$y=20737x+902200$	22.98	
	1/200	0.256				0.203				$R^2=0.9484$
	1/150	0.307				0.278				
	1/100	0.423				0.362				
	1/50	0.647				0.585				
(2)	1/100	0.423	$y=775200x-0.2406$	$y=13520x+4E+06$	3.38	0.362	$y=775200x-0.2406$	$y=15584x+4E+06$	3.90	
	1/80	0.472				0.427				$R^2=0.9569$
	1/60	0.533				0.488				
	1/40	0.784				0.741				
	1/20	1.243				1.204				
(3)	1/60	0.533	$y=775200x-0.2406$	$y=19928x+3E+06$	6.64	0.488	$y=775200x-0.2406$	$y=21522x+3E+06$	7.17	
	1/50	0.647				0.585				$R^2=0.9937$
	1/40	0.784				0.741				
	1/30	0.977				0.863				
	1/20	1.243				1.204				

表3 不同浓度尿素和缓冲液对 $K_m$ 值的影响

尿素浓度组合	尿素浓度/ mol·L <sup>-1</sup>	缓冲液							
		1/15 mol·L <sup>-1</sup> Tris-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 缓冲液 (pH 7.0)				1/15 mol·L <sup>-1</sup> 磷酸缓冲液 (pH 7.0)			
		吸光值	回归方程	双倒数方程	$K_m$ 值/ mmol	吸光值	回归方程	双倒数方程	$K_m$ 值/ mmol
(1)	1/250	0.171	$y=520500x-0.0203$	$y=13926x+4E+06$	3.48	0.129	$y=520500x-0.0203$	$y=20737x+902200$	22.98
	1/200	0.287		$R^2=0.882$		0.203		$R^2=0.9484$	
	1/150	0.337				0.278			
	1/100	0.368				0.362			
	1/50	0.623				0.585			
(2)	1/100	0.368	$y=775200x-0.2406$	$y=14974x+4E+06$	3.74	0.362	$y=775200x-0.2406$	$y=15584x+4E+06$	3.90
	1/80	0.427		$R^2=0.9926$		0.427		$R^2=0.9569$	
	1/60	0.576				0.488			
	1/40	0.786				0.741			
	1/20	1.100				1.204			
(3)	1/60	0.576	$y=775200x-0.2406$	$y=16170x+4E+06$	4.04	0.488	$y=775200x-0.2406$	$y=21522x+3E+06$	7.17
	1/50	0.623		$R^2=0.9857$		0.585		$R^2=0.9938$	
	1/40	0.786				0.741			
	1/30	0.915				0.863			
	1/20	1.100				1.204			

Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 缓冲液 (pH 7.0), 比色液的颜色也转红, 溶液浑浊。

#### 4 不同浓度尿素溶液和脲酶用量对 $K_m$ 值的影响

从表4可知, 在尿素溶液浓度相同时, 脲酶用量增加, 吸光值也增加, 但不成倍数增加。酶量为0.25 mL对尿素浓度较低的组合(1), 无法确定 $K_m$ 值; 酶量为0.25 mL对尿素浓度较高的组合(2)、(3), 酶量为0.50 mL对尿素浓度为较高的组合(3), 酶量为0.75 mL对尿素浓度较高的组合(3), 三者的 $K_m$ 值比较接近, 为13.21~17.84 mmol; 0.50 mL酶量对尿素浓度较低的组合(1), 其 $K_m$ 值为29.47 mmol, 与已有文献报道的脲酶值仅差3.53 mmol, 其相关系数为0.9814; 酶量为0.50 mL对尿素浓度较高的组合(2)和酶量为0.75 mL对尿素浓度组合(1)、(2),  $K_m$ 值均较低, 只有几个mmol, 与已有报道的相差较大。酶量为0.50或0.75 mL时, 随着尿素浓度的增加, 比色液的颜色同样变红, 溶液不透明。

### 讨 论

通过上述实验结果, 可以得出以下几点结论:

(1) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 标准溶液、尿素浓度和终止剂、尿素浓度和缓冲液、尿素浓度和脲酶量4个因素, 比色液均随着浓度的增大而逐渐由黄色变为红棕色, 由透明变为浑浊, 当(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>的摩尔数大于或等于 $8 \times 10^{-7}$ , 即吸光值大于0.4时, 吸光值迅速增加, 无法准确记录。此现象的发生与NH<sub>4</sub><sup>+</sup>浓度有关, 而与反应的其他条件无关。由于奈氏试剂是一种碘化钾、碘化汞复合体的碱性溶液, 能与NH<sub>4</sub><sup>+</sup>作用生成棕黄色的碘化双汞铵胶体溶液, 颜色深浅与溶液中氨量成正比, 所以本文的方法只适用于铵盐的稀溶液<sup>[5]</sup>。奈氏试剂与铵盐反应生成红棕色沉淀, 若铵盐浓度很低时, 则生成黄色或棕色溶液<sup>[6]</sup>。所以, 测定 $K_m$ 值时, 应采用低浓度的标准液和尿素液, 吸光值应控制在0.4以下。

(2) 尿素浓度相同时, 用0.2 mol·L<sup>-1</sup>盐酸终止剂比10%硫酸锌得到的吸光值大, 这可能是0.2 mol·L<sup>-1</sup>盐酸不能完全终止脲酶活性的结果。为了避免上述颜色变红、溶液浑浊现象发生, 准确测定 $K_m$ 值, 终止剂以10%硫酸锌为佳。

(3) 1/15 mol·L<sup>-1</sup>磷酸缓冲液 (pH 7.0) 的 $K_m$ 值随

表4 不同浓度尿素和脲酶量对 $K_m$ 值的影响

尿素浓度组合	尿素浓度/ mol·L <sup>-1</sup>	脲酶量 0.25 mL				
		吸光值	回归方程	双倒数方程	$K_m$ 值/ $\mu$ mol	
(1)	1/250	0.030	$y=432000x+0.0096$	$y=15733x-2E+06$	$R^2=0.979$	—
	1/200	0.037				
	1/150	0.042				
	1/100	0.085				
	1/50	0.176				
(2)	1/100	0.085	$y=520500x-0.0203$	$y=7627x+534974$	$R^2=0.9916$	14.26
	1/80	0.099				
	1/60	0.134				
	1/40	0.201				
	1/20	0.359				
(3)	1/60	0.134	$y=520500x-0.0203$	$y=7807.1x+469988$	$R^2=0.9801$	16.61
	1/50	0.176				
	1/40	0.201				
	1/30	0.244				
	1/20	0.359				
尿素浓度组合	尿素浓度/ mol·L <sup>-1</sup>	脲酶量 0.50 mL				
		吸光值	回归方程	双倒数方程	$K_m$ 值/ $\mu$ mol	
(1)	1/250	0.069	$y=432000x+0.0096$	$y=4579.1x+155390$	$R^2=0.9814$	29.47
	1/200	0.093				
	1/150	0.105				
	1/100	0.163				
	1/50	0.282				
(2)	1/100	0.163	$y=775200x-0.2406$	$y=2342.1x+627140$	$R^2=0.8905$	3.73
	1/80	0.204				
	1/60	0.235				
	1/40	0.338				
	1/20	0.840				
(3)	1/60	0.235	$y=775200x-0.2406$	$y=3892.2x+294583$	$R^2=0.9654$	13.21
	1/50	0.282				
	1/40	0.338				
	1/30	0.556				
	1/20	0.840				
尿素浓度组合	尿素浓度/ mol·L <sup>-1</sup>	脲酶量 0.75 mL				
		吸光值	回归方程	双倒数方程	$K_m$ 值/ $\mu$ mol	
(1)	1/250	0.072	$y=520500x-0.0203$	$y=3200.5x+622146$	$R^2=0.9699$	5.14
	1/200	0.109				
	1/150	0.122				
	1/100	0.174				
	1/50	0.324				
(2)	1/100	0.174	$y=775200x-0.2406$	$y=2618.7x+402707$	$R^2=0.9594$	6.50
	1/80	0.211				
	1/60	0.303				
	1/40	0.454				
	1/20	1.054				
(3)	1/60	0.303	$y=775200x-0.2406$	$y=3625.5x+203117$	$R^2=0.9655$	17.84
	1/50	0.324				
	1/40	0.454				
	1/30	0.669				
	1/20	1.054				

着尿素浓度的增加而波动较大,  $1/15 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris- $\text{H}_2\text{SO}_4$  缓冲液 (pH 7.0) 的  $K_m$  值随着尿素浓度的增加较为稳定。所以, 缓冲液以  $1/15 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris- $\text{H}_2\text{SO}_4$  (pH 7.0) 为佳。

(4) 尿素浓度相同时, 脲酶用量增加吸光值增加, 但不成倍数。从我们的实验结果来看, 以 0.50 mL 酶量和组合(1)的尿素浓度所得到的  $K_m$  值与文献报道值接近。所以测定时酶量以 0.50 mL 为佳。

综上所述, 我们认为, 在脲酶  $K_m$  值简易测定方法中, 各种条件的确定建议为: 用  $0.001 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  为标准溶液, 尿素浓度用组合

(1), 以 10% 硫酸锌作终止剂,  $1/15 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris- $\text{H}_2\text{SO}_4$  (pH 7.0) 为缓冲液, 酶量用 0.50 mL。

#### 参考文献

- 1 朱利泉主编. 基础生物化学实验原理与方法. 成都: 成都科技大学出版社, 1997. 95~99
- 2 焦鸿俊主编. 基础生物化学. 南宁: 广西民族出版社, 1995. 100
- 3 扶惠华, 李小方, 田廷亮. 奈氏试剂测定脲酶活性方法的改进. 植物生理学通讯, 1996, 32(6): 435~439
- 4 张龙翔, 张庭芳, 李令媛主编. 生化实验方法和技术. 第2版. 北京: 高等教育出版社, 1997. 145~153
- 5 白宝璋, 汤学军主编. 植物生理学测试技术. 北京: 中国科学技术出版社, 1993. 22
- 6 王明德主编. 分析化学. 第2版. 北京: 高等教育出版社, 1995. 68~69