

技术与方法 Techniques and Methods

谷胱甘肽还原酶活性单位的现状及SI单位换算

刘昌来*, 吴祝华, 郑琰焱, 李燕文, 王国栋

《南京林业大学学报(自然科学版)》编辑部, 南京210037

摘要: 谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GR)是一种在农林生物医学等领域期刊中被广泛用到的一种酶。但是这个酶的活性单位却存在各种形式,有些期刊的文章使用了SI单位(international system of units, 国际单位制)或者我国法定计量单位,而有些期刊中的文章却使用了既不是SI单位也不是我国法定计量单位。本文在对2013~2015年公开发表的48篇测定谷胱甘肽还原酶的中外文文献分析后发现,其中有25篇文献使用了既不是SI单位也不是我国法定计量单位(共同简称非法单位)的单位作为GR的活性单位。在所调查的48篇文章中,有超过40篇文章使用了分光光度计法测定GR的活性,这种测定GR的方法往往是先定义GR活性的基本单位,以U表示,然后再根据定义的基本单位表示最后测定的GR活性。为了推广SI单位,遵守我国对量和单位的法律规定,同时为了加强学术交流,使不同研究者测定的GR之间具有可比性,建议将这些非法单位根据比尔郎伯定律换算为SI单位。

关键词: 谷胱甘肽还原酶; SI单位; 分光光度计法; 换算

国际单位制(international system of units)是国际计量大会(CGPM)采纳和推荐的一种一贯单位制,于1960年第十一届国际计量大会通过,推荐各国采用,简称为SI (https://en.wikipedia.org/wiki/International_System_of_Units#cite_note-25th_CGPM-1_2016-10-02)。1985年9月6日,全国人大常委会制定并通过了《中华人民共和国计量法》。这一法规明确宣布:“国家采用国际单位制。国际单位制计量单位和国家选定的其他计量单位,为国家法定计量单位。非国家法定计量单位应当废除。”(陈浩元2000)。同时也为了学术交流的需要,应该使用SI单位。1964年国际生物化学联合会推荐根据1961年国际生物化学联合会酶学委员会的报告来定义一个标准酶活性单位(unit, 简称为U)(Tipton和Boyce 2000),一个标准的酶活性单位定义为在确定的最适反应条件下,每分钟催化1 μmol 底物所需要的酶量,定义为1 U (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry 1979),这就是常用的酶活性单位。但是U并不是国际单位制(SI)的基本单位(GB 3100-1993《国际单位制及其应用》,1993),也不是“coherent derived unit”(Taylor和Thompson 2008)。因此,为了遵循SI的要求,1972年,生物化学命名委员会在“*Enzyme Nomenclature, Recommendations*”中建议催化反应速率应该表达为 $\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$ 的形式,同时在这本书中,根据生物化学命名委员会的提议提出并定义了一个新的酶活单位(katal, 简称kat),用于代替以前

的、没有被命名的酶单位(Florkin和Stotz 1973),此种定义以后,仍然有很多期刊使用了U作为酶的活性单位,例如在外文文献中CAT和SOD的酶活性单位的例子(刘昌来2015a, b)。

谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GR)是一种利用还原型NAD(P)将氧化型谷胱甘肽(GSSG)催化反应成还原型谷胱甘肽(GSH)的酶, EC.1.6.4.2。GR活性的高低往往作为生物体中氧化状态的指标,因此在农林医以及生物类期刊的文章中被广泛采用。例如使用谷胱甘肽还原酶作为关键词搜索中国知网学术总库(<http://scholar.cnki.net/>), 刊出时间设定为2015, 共有231篇文献含有谷胱甘肽还原酶, 其中英文文章114篇, 中文核心期刊文章91篇, 涉及40个学科领域(根据中国知网学科划分), 这说明GR在科技论文中是一个比较常见的酶, 具有广泛的应用。但GR的活性单位却存在各种表现形式, 有些文章中使用了SI单位, 而有些却使用了既不是SI单位又不是我国法定计量单位的单位(称为“非法单位”)表示方法。

1 国内外期刊中谷胱甘肽还原酶活性单位的现状

使用“antioxidant enzymes”为关键词, 在Springer数据库中进行高级搜索, 设定年限为2013到2014年, 下载与搜索关键词最相关的前45篇文章, 涵盖

收稿 2016-08-24 修定 2016-10-08

资助 江苏省期刊协会基金项目(JSRFSTP2013C06)。

* 通讯作者(E-mail: 358940418@qq.com)。

了24种杂志,具体见文献(刘昌来等2015a),使用到GR作为指标的有20篇文章,其中使用 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ 或 $\text{mmol}\cdot\text{min}^{-1}$ 作为酶活性单位的有11篇,使用U作为酶活性单位的有8篇,以 μkatal 作为酶活性单位的有1篇,没有出现像CAT和POD一样使用OD值作为活性单位的文章(刘昌来等2015a)。同时以“谷胱甘肽还原酶”作为关键词搜索中国知网数据库,条件设定为核心期刊,刊出年限为2015年,语种为中文,搜索结果中,对农作物学(21篇)、生物学13篇)、林学(4篇)和植物保护学科(3篇)等学科共41篇文章进行分析,其中测定谷胱甘肽还原酶活性的文章共有28篇,使用U作为活性单位的有10篇, $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}$ 与 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ 等的有11篇, $\text{U}\cdot\text{min}^{-1}$ 的6篇,甚至有1篇使用 $\Delta\text{OD}_{340}\cdot\text{min}^{-1}$ 作为其GR酶活性单位。

从以上对GR酶活性单位的调查看,在使用GR作为生物体氧化还原状态指标的48篇中,使用SI单位或者我国法定计量单位(陈浩元2000)的中外文文章共23篇,而使用非法定单位有25篇,基本上达到了1:1的比例。从上面对中外期刊的分析看,外文期刊中含有GR活性单位的文章更多地使用了SI单位、SI单位的倍数(SI prefixes)单位以及被接受使用的非SI单位(如min等)(这些单位属于我国法定计量单位),说明GR采用SI单位或者被接受的SI单位是被广大研究者所接受的现实,因为使用统一的SI单位,更有利于GR在不同研究间进行比较,有利于学术间的交流,所以有必要将GR使用非SI单位表示换算为SI单位。

2 GR活性单位测定方法

谷胱甘肽还原酶催化氧化型谷胱甘肽(GSSG)和NADPH反应生成 NADP^+ 和GSH,所以可以根据反应物NADPH量的减少速率(刘昌来等2015b)或者GSH生成速率表示GR的活性大小(Khan和Khan 2014),当然也可以通过间接方法测定GR的活性大小(Smith等1989),例如通过测定间接反应物TNB表示GR的活性。进一步对这48篇文章进行分析,以探究GR使用U等非法定单位的原因。在48篇文章中,有46篇文章使用了分光光度计法测定GR活性,剩下2篇使用了Sigma公司的试剂盒。在使用分光光度计法测定GR活性的46篇文章中,其中有44篇测定的是以NADPH表示GR活性,2篇是以TNB表示GR的活性。在这些使用分光光度计法测定GR活性的文章中,由于对酶活性单位又分为几

种情况:(1)定义酶活性的基本单位,如在一定条件,340 nm波长下,定义每分钟 A_{340} 变化 x (取值有0.1、0.05等)作为1个GR活性单位(U),通过这种方式测定的GR的活性为 y U(马金虎等2015);(2)在有些文献中,虽然使用的是340 nm测定NADPH或者412 nm下测定TNB的吸光度值改变以获得GR的活性,但是在进行GR酶活性单位的定义时,使用每分钟或者每秒钟转换反应物NADPH或者产物TNB的摩尔量的方式定义GR的基本单位,使用这种方式最后得到酶活性虽然是以U表示,这种表示的U可以直接换算为以 $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}$ 与 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ 等表示的形式,有些文章直接就以这种形式表示,这些都是我国法定计量单位,所以并不需要进行换算;(3)并不定义GR的活性单位,直接以测定吸光值表示GR活性,单位为 $\Delta\text{OD}_{340}\cdot\text{min}^{-1}$ 。以上3种表示GR的活性中,方法(1)和(3)其实都是以吸光值表示的酶活性,而(2)虽然使用U作为GR的活性单位,但仍然是以单位时间内反应物或者生成物转换的物质的量表示的,最后也是我国法定计量单位表示,所以并不是需要进行换算,而方式(1)和(3)所使用的为非法定单位,所以需要进行换算。从这个数据看,大部分文章中GR的活性是以反应物NADPH的减少表示的。至于调查的48篇文章中,使用 $\text{U}\cdot\text{min}^{-1}$ 作为GR活性单位的文章是作者没有真正理解GR活性单位的定义造成的。

3 GR非SI单位的换算

任何物质都会吸收一定波长的光,根据比尔-朗伯定律,物质的吸光度和其浓度之间是存在一定关系的,吸光度值(A)和溶液的浓度(c)之间由溶液的摩尔吸收系数(κ)通过公式 $A=\kappa lc$ (其中 l 为溶液的光程)来联系(Van Gelder和Slater 1962)。根据这个关系,使用吸光度值表述的GR活性单位都可以转换为以反应物或者生成物的改变量来表示的酶活性单位。上述使用非法定单位表示的GR活性,都可以通过使用NADPH或者GSH在一定波长下的摩尔吸收系数(κ)进行换算成以 $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ 和 $\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$ 等表示的方式。基于此种设想,本文以测定反应物NADPH浓度改变的速率来表示GR活性为例,将GR的活性以非SI单位“U”表示的形式转换为SI单位以“ $\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$ (kat)”表示的形式,也希望此种换算方法可以用于所有使用吸光度法测定的其他酶。

例如GR活性单位的测定为: 将体积为 V_s (mL) 酶提取液加入到一定体积的比色皿中(比色皿的光程为1 cm), 形成总体积为 V_1 (mL)总反应液, 在一定温度下, 340 nm波长, 以30 s为间隔扫描3 min, 每分钟 A_{340} 变化0.1作为1个GR活性单位(U) (杨颖丽等2015)。如果根据以上定义和方法测定的反应液中GR活性为 x U, 根据NADPH在340 nm波长下摩尔吸收系数 $6.22 \text{ L}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (如果使用SI基础单位表示为 $622 \text{ m}^2\cdot\text{mol}^{-1}$)。将以“U”表示的GR活性换算为以“kat”表示的换算过程为:

$$\text{每升样品反应液中GR的活性}(\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\text{或kat})= \frac{\Delta c}{t_2 - t_1} = \frac{c_2 - c_1}{t_2 - t_1} = \frac{\frac{A_2 - A_1}{kl}}{t_2 - t_1} = \frac{A_2 - A_1}{kl(t_2 - t_1)} \quad (1)$$

式中, c_1 和 c_2 分别为 t_1 和 t_2 时反应液中NADPH的浓度($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); Δc 为从时间 t_1 到 t_2 时, 反应液中NADPH浓度的变化($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); A_1 和 A_2 分别为这两个时间点的吸光度值; κ 为NADPH的摩尔吸收系数($6.22 \text{ L}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ 或 $622 \text{ m}^2\cdot\text{mol}^{-1}$), l 为比色皿的光程, 这里设定为为1 cm。

那么将 x 带入公式(1), 将以U表示的GR活性转变为以kat表示的活性单位为:

$$\text{每升样品反应液中GR的活性}(\text{kat})= \frac{A_2 - A_1}{kl(t_2 - t_1)} = \frac{0.1x}{60kl} = \frac{0.1x}{6.22 \times 60 \times 1 \times 1000} \quad (2)$$

其中, 60为根据上述GR活性单位定义, 将分钟换算为秒的换算系数(s); 1 000为NADPH的摩尔吸收系数由mmol转换为mol的换算系数。

4 讨论

虽然公式(2)经过换算得到结果的单位为 $\text{kat}\cdot\text{L}^{-1}$ [$\text{mol}\cdot(\text{s}\cdot\text{L})^{-1}$], 为“catalytic activity concentration” (为SI coherent derived units) (Taylor和Thompson 2008), 但是此公式仍然适用于将文章中最后测定的GR酶活总量进行直接的换算。在有些文献中, 虽然使用的是一定波长下测定NADPH吸光度值改变的方法获得GR的活性, 但是在进行GR活性单位定义时, 将每分钟或者每秒钟转换反应物NADPH或者TNB的摩尔数定义为1个GR单位(U), 这种定义GR的方法可以直接通过倍数关系进行换算, 本研究并不涉及这方面的讨论, 也不涉及非kat单位但属于我国法定计量单位表示形式的换算(例如 $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ 等形式), 本研究只涉及到

以吸光值变化来定义的GR酶活性单位以及以吸光度值表示的GR活性单位的换算, 本研究也不涉及使用试剂盒测定GR活性单位的换算。

摩尔吸收系数是物质对某一特定波长光的吸收大小的量度, 表示在一定波长下, 某物质的溶液浓度为 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 1 cm光程下的吸光度值, 用 κ 表示, 值越大, 该物质溶液吸收光的能力越强, 使用分光光度法测定的灵敏度越高(Smith等1989)。摩尔吸收系数的值主要受该物质的溶剂、吸光性质以及入射光的波长等因素的影响。所以, 在一定条件下只要确定测定酶催化反应物或者产物的摩尔吸收系数, 就可以将以吸光度值变化为定义的酶活性单位换算为以kat表示的酶活性单位。所以, 对于GR来说, 无论是通过吸光光度法测定反应物NADPH、GSSG还是生成物GSH的浓度变化, 都可以使用其摩尔吸收系数和比尔-朗伯定律获得, 并且希望通过一种软件可以将编辑经常遇见的一些使用非SI单位作为酶活性单位的表示形式换算为以SI单位表示的形式, 以加强学术之间的交流。

参考文献

- Chen HY (2000). Standardization of Science and Technology Books 18. Beijing: Beijing Normal University Press, 81 (in Chinese) [陈浩元(2000). 科技书刊标准化18讲. 北京: 北京师范大学出版社, 8]
- Florin M, Stotz EH (1973). Comprehensive Biochemistry. Vol 13.3. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Publishing Company
- Janeesh PA, Abraham A (2013). Amelioration of cholesterol induced atherosclerosis by normalizing gene expression, cholesterol profile and antioxidant enzymes by *Vigna unguiculata*. Plant Foods Hum Nutr, 68 (2): 118–123
- Khan MIR, Khan NA (2014). Ethylene reverses photosynthetic inhibition by nickel and zinc in mustard through changes in PS II activity, photosynthetic nitrogen use efficiency, and antioxidant metabolism. Protoplasma, 251 (5): 1007–1019
- Liu CL, Tian YL, Wang GD, Zheng YY, Li YW (2015a). Conversion of enzyme activity unit (non-SI unit) to SI unit for CAT, POD and APX. J Lib Inform Sci Agri, 27 (8): 160–163 (in Chinese with English abstract) [刘昌来, 田亚玲, 王国栋, 郑琰琰, 李燕文(2015a). CAT、POD和APX 3种酶活力SI单位的换算. 农业图书情报学刊, 27 (8): 160–163]
- Liu CL, Wang GD, Tian YL, Zheng YY, Li YW (2015b). An analysis on the reasons for the wide use of the non-SI units in SOD activity testings. J Suzhou Coll Edu, 32 (6): 65–67 (in Chinese with English abstract) [刘昌来, 王国栋, 郑琰琰, 李燕文(2015b). SOD活性测定普遍使用非SI单位原因探讨. 苏州教育学院学报, 32 (6): 65–67]
- Ma JH, Xing GF, Yang XH, Wang YG, Du HL (2015). Effects of

- exogenous EBR and NO signal on antioxidant system and low response gene expression under cold stress on maize embryo. *Chin J Appl Eco*, 26 (5): 1411–1418 (in Chinese with English abstract) [马金虎, 邢国芳, 杨小环, 王玉国, 杜慧玲(2015). 外源EBR和NO信号对低温胁迫下玉米种胚抗氧化系统和低温响应基因表达的影响. *应用生态学报*, 26 (5): 1411–1418]
- Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB) (1979). Units of enzyme activity. *Eur J Biochem*, 97 (2): 319–320
- Smith IK, Vierheller TL, Thorne CA (1989). Properties and functions of glutathione reductase in plants. *Physiol Plant*, 77 (3): 449–456
- Taylor BN, Thompson A (2008). *The International System of Units (SI)*. Gaithersburg: the International Bureau of Weights and Measures Publication, 75
- Tipton K, Boyce S (2000). History of the enzyme nomenclature system. *Bioinformatics*, 16 (1): 34–40
- Van Gelder BF, Slater EC (1962). The extinction coefficient of cytochrome c. *Biochim Biophys Acta*, 58 (3): 593–595
- Yang YL, Ding F, Duan XH, Teng YJ, Ma T, Li CX, Zhang L (2015). Antioxidative response in wheat seedlings under iron or copper stress. *J Lanzhou Uni (Nat Sci)*, 51 (2): 248–254 (in Chinese with English abstract) [杨颖丽, 丁凡, 段晓晖, 滕玉瑾, 马婷, 李翠祥, 张丽(2015). 铁或铜胁迫下小麦幼苗根抗氧化体系的响应. *兰州大学学报(自然科学版)*, 51 (2): 248–254]

The units status of the glutathione reductase and the conversion of SI units

LIU Chang-Lai*, WU Zhu-Hua, ZHENG Yan-Yi, LI Yan-Wen, WANG Guo-Dong

Editorial Department of Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition), Nanjing 210037, China

Abstract: Glutathione reductase (GR) is a kind of enzyme which is widely used in the fields of agriculture, forestry, biomedicine and other fields. But there are various forms of this enzyme activity units, some journal articles use the SI unit or the legal measurement unit, but some journal articles use neither SI unit nor the legal measurement unit for enzyme. We analyzed 48 articles published during 2013–2015 to determine the activity of glutathione reductase from domestic and foreign literature. The results showed that 25 articles used neither SI unit nor the legal measurement unit (together referred to as illegal unit) as the unit of GR activity. In the survey of 48 articles, there were more than 40 articles using the spectrophotometer method for the determination of GR activity. This determination of GR method often firstly defined the basic unit of GR activity, expressed in U, then according to the definition of basic unit table showed the final determination of GR activity. In order to extend the SI unit for the GR, to abide the regulation of quantities and units in our country, and to strength academic exchanges, compared between different researchers measured GR, the results suggested that this illegal unit could be converted to SI unit using spectrophotometer method.

Key words: glutathione reductase; SI unit system; spectrophotometric method; conversion

Received 2016-08-24 Accepted 2016-10-08

This work was supported by Journal Association of Jiangsu Province (Grant No. JSRFSTP2013C06).

*Corresponding author (E-mail: 358940418@qq.com).