嘉南藥理科技大學補助專題研究計畫成果報告

離子對層析法應用於鼠肝麩醯胺酶活性的測定

計畫編號：CNIB-91-02

執行期間：91 年 1 月 1 日至 91 年 12 月 31 日

計畫主持人：葉 東 柏

E-mail: idongyeh@mail.chna.edu.tw

執行單位：生物科技研究所

中 華 民 國 九十二 年 二 月 二十八 日

前　　言

麩醯胺酶(L-glutaminase; L-glutamine amidohyrolase; EC 3.5.1.2))為哺乳類動物肝中參與尿素合成之重要酵素(1)。除具有水解能力外，有些麩醯胺酶也具有基團轉移的功能(2)。在水解時係催化下列反應:

$$\text{L-glutamine} + H_2O \rightarrow \text{L-glutamate} + NH_4^+$$

測定兩個產物的產生量都曾被利用於此酵素的活性分析(3)。氨的量測包括：

a.Nessler's reagent
b.與 glutamate dehydrogenase(GDH)偶合(測 NAD^+生成)
c.OPA 反應(見後述)

不過測定氨有幾個缺點，包括背景值偏高、在鹼性溶液中易流失及靈敏度不高。故一般多是量測 L-Glutamate 的產量，方法包括：

a.層析法
b.與 glutamate dehydrogenase 偶合(測 NADH)
c.與 GDH+diaphorase 偶合(測 formazan)
d.與 glutamate decarboxylase 偶合(測$[^{14}C]CO_2$)
e.與 glucose oxidase 偶合(amperometric method)(測 H_2O_2)

上述方法雖常被採用，但仍有些缺點，例如易受反應物或酵素樣品干擾，製備或操作繁瑣及靈敏度不夠高等。也有人利用合成基質(Synthetic substrate)-L-γ-glutamyl *p*-nitroanilide (4)，直接以比色法測定生成的 *p*-nitroaniline (測 A410)。此法雖極為簡單，但靈敏度偏低，且它畢竟不是真正的基質，故被採用的情況並不多。

OPA-HPLC 法配合螢光檢測器以分析水解後的氨產生量曾被應用於茶葉中麩醯胺酶活性(5)之測定。然而，根據我們研究發現，雖然胺基酸與 OPA 反應會有強螢光衍生物生成，但氨的呈色靈敏度卻很差，而且再現性也不佳。為了克服這個缺點，我們轉而檢測另一水解產物--麩胺酸，因麩胺酸的 OPA 衍生物呈色靈敏度約為氨的 50 倍。但由於麩胺酸-OPA 衍生物仍為極性物質，直接進行逆相 HPLC 的分離效果並不理想。本報告乃是以 N-cetyl N,N,N-trimethyl ammonium bromide (簡稱 CTMAB)為對應離子，進行所謂離子對（ion-pair）高效液相層析法。原理為藉由對應離子的存在以延長麩胺酸-OPA 衍生物的滯留時間，而使之與反應物（麩醯胺）及氨的-OPA 衍生物分離。因而本人認為可嘗試用於鼠肝中麩醯胺酶活性之測定。

研 究 方 法

1. 酵素活性之測定

1.1. 麩醯胺的前處理：利用陰離子交換樹脂 (Dow SBR-P, OH^- 型)進行離子交換，以減少殘留麩胺酸(約為 0.1 %)的干擾。

1.2. 酵素反應(35℃水浴中反應 10-60 分)：

1.2.1 細菌麩醯胺酶(Sigma 商品)：50mM 醋酸緩衝液 4μL + 0.1 M glutamine 4μL+20 mM hydroxylamine·HCl 2μL+水 9～0μL，酵素液 1～10μL。(6)

1.2.2 鼠肝麩醯胺酶：20mM 磷酸緩衝液(pH 7.6)含 300mM mannitol, 10 mM Na-citrate, NH_4^+ (0, 0.5, 1 mM)及 66mM glutamine。

1.3. OPA (o-phthaladehyde)試劑之製備：取 OPA 5mg 溶於少量絕對酒精，再加入 Borate buffer 2ml 及 β-mercaptoethanol 20μl，振搖均勻，裝入褐色瓶中。

1.4. 呈色反應與分析：

1.4.1 取反應液 20μL＋o-phthaladehyde (OPA) 試劑 100 μL 震盪 5 秒，避光下反應 2 分鐘。

1.4.2 上述反應液經過濾後取 10-20μL 進行 HPLC。

1.5. HPLC (Hitachi Ltd., Japan)

1.5.1 RP-18（4.6×125 mm, Merck）column

1.5.2 Mobile phase：10 mM K-PO_4 buffer pH 7.0 含 10 mM CTMAB + acetonitrile (1:1)

1.5.3 Flow rate：1.5 mL/min

1.5.4 Detector：Spectrofluorometer（ex：335nm，em：425nm）

2. 鼠肝麩醯胺酶之製備與分析

鼠肝麩醯胺酶係依據 Szweda & Atkison 所提出的方法(7)。程序大致如下：取經 24 小時進食之大鼠肝臟，加入緩衝液(2 mM Hepes, pH 7.4 含 300 mM mannitol)以均質機擠碎，在去除未破細胞、紅血球、核及碎片後，以 5,000xg 離 10 分鐘，得到粒腺體。

將粒腺體懸浮於等量的水中，進行三次的凍結(液態氮)與融解(37℃)操作，再進行高速離心（4℃，40,000 xg，20 分）。沉澱懸浮於 5 倍量的均質緩衝液中，分裝冷凍(-75℃)備用。

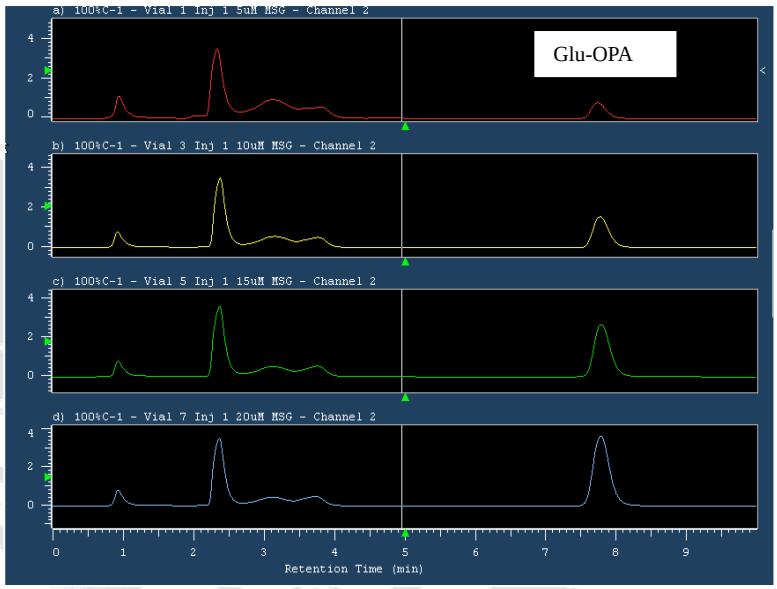
結 果 與 討 論

1.酵素活性測定方法之建立

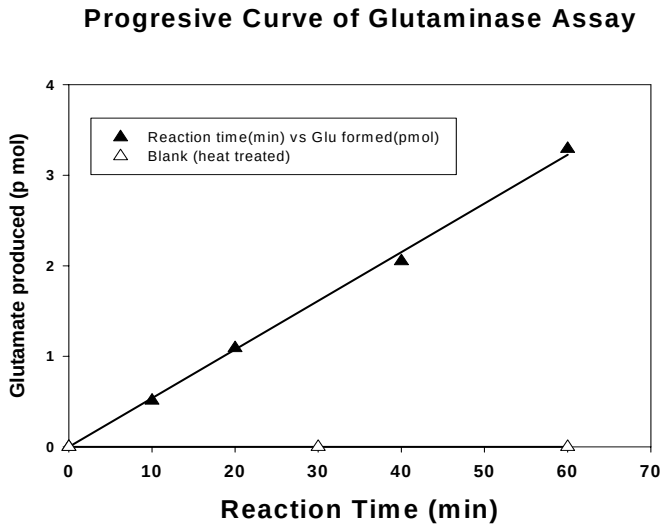
重要結論如下：

a. 為避免高濃度麩醯胺中麩胺酸(約為 0.1 %)對酵素分析可能造成的干擾，陰離子交換樹脂的前處理有其必要性。

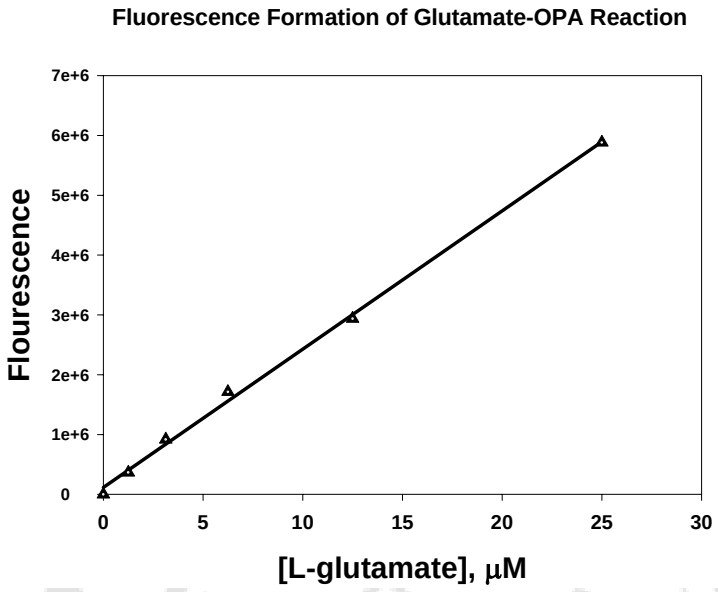
b. 利用 Lichrospher RP-18, 4.6x125mm 管柱，麩胺酸-OPA 衍生物之溶出體積約為 7.5-10 mL(與 mobile phase 之新鮮度有關)。相對的，麩醯胺及氨的 OPA 衍生物則都在 5 mL 以內。酵素樣品的干擾也不大。(圖 1)



c. 以細菌麩醯胺酶(Sigma 商品)為模式，利用本法可證明酵素之活性表現與酵素反應時間及含量(略)均有直線關係。(圖 2)



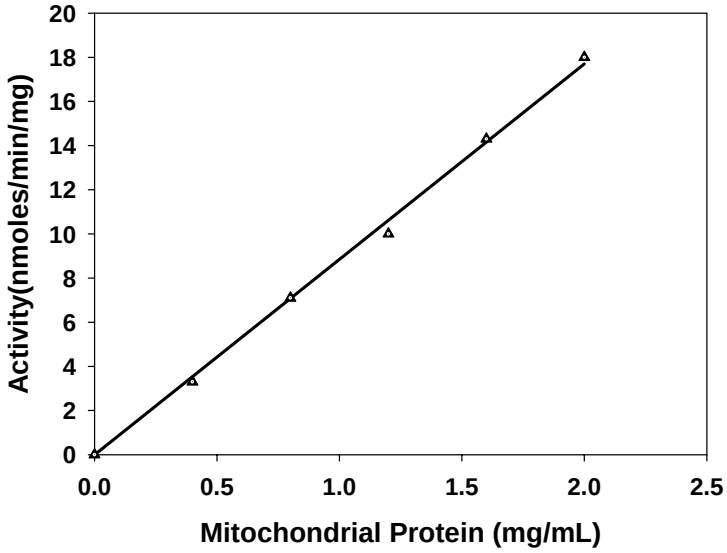
d. 由於反應物及產物的 OPA 衍生物具螢光，故靈敏度高，反應液中只要含 1μM 以上的麩胺酸即可被檢出。(圖 3)



e. 由於反應物中高濃度麩醯胺，反應液中含足量的 OPA 試劑相當重要。另一方面，OPA 之螢光衍生物形成快速，但退化亦極迅速。結果顯示，反應後宜於兩分鐘內進行分析。

2. 鼠肝麩醯胺酶之活性分析

將本研究所建立之分析方法應用於活性檢測，亦得到了不錯的結果。由圖 4 顯示本法的確可檢出鼠肝麩醯胺酶之活性，且與一定濃度的酵素蛋白質量有正比關係。



過去的研究者(7)揭示會受低濃度銨離子的促進，本研究亦得到了類似的結果(表 1)。

表 1. 鼠肝麩醯胺酶活性與銨離子濃度的關係

NH_4^+含量 (mM)	麩醯胺酶活性 (nmoles/min/mg)
0	0.12
0.5	44.8
1.0	73.5

由以上結果可以了解，上述以 OPA-胺基酸反應，配合螢光檢測器進行所謂離子對（ion-pair）高效液相層析法的確可應用於麩醯胺酶之活性測定，對於肝麩醯胺酶的研究提供了一個可以選擇的方法。

參 考 文 獻

1). Watford, M., et al, Nutrition, **18**, 301-303, 2002.
2). Hartman, S.C., in ” The Enzymes ”, **4**, 79-100, 1971.
3). Kvamme, E., et al, Meth.Enzymol.,**113**, 241-256, 1985.
4). Takashi, T., et al, Biosci. Biotechnol. Biochem, **62**(7), 1279-1283, 1998
5). Taushida,T. and Takeo,T., J. Agric. Biol. Chem., **49**(10), 2913~2917, 1985
6). Standish, C.H., J. Biol. Chem., **2**48(24), 8506-8517, 1973.
7). Szweda, L. and Atkinson,D.E., J. Biol. Chem., **265**, 20869-20873, 1990.