

腺苷酸环化酶活力测定

张林华 刘秉文 吴兆锋 蓝天鹤

(华西医科大学生物化学教研室,成都)

腺苷酸环化酶 (AC; E. C. 4.6.1.1) 是位于细胞膜上的一种复杂的酶系统,它通过鸟苷酸调节蛋白^[1],与膜表面激素受体相偶联,催化细胞内 ATP 生成 cAMP,介导外部信息的跨膜传递。测定 AC 活力对于研究生物膜的结构与功能,研究激素,神经递质及药物对细胞代谢的调控,以及细胞增殖分化,肿瘤发生等具有重要意义。作者以 Krishna 等人 (1968)^[2]建立的

方法为基础,综合有关改进方法,建立了一种简便的 AC 放射分析法,并对 cAMP 的分离效果及影响酶活力的若干因素进行了探讨。

一、材料与方 法

1. 材料

³H-ATP: 比放射性为 31ci/mmmole; ³H-cAMP: 比放射性为 23ci/mmmole, 放化纯度

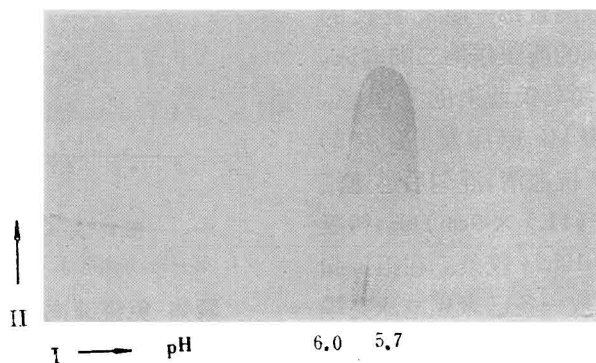


图 2 人 CRP 的聚焦-免疫双向电泳

I: 第一向,聚焦电泳 II: 第二向,免疫电泳

出现的现象可能是一种假象,值得注意。

滴定曲线法测定人 CRP 的等电点,曲线与加样槽交点不易分辨,测得的 pI 值不够明确,且在 pH4.0—5.0, 7.2—8.5 间均有等电点区,结果不够满意。用聚焦-免疫双向电泳法测人 CRP 的等电点为 5.7—6.0,在 pH4.0—5.0, 7.2—8.5 间均无等电点区。说明我们提纯的人 CRP 纯度较高,同时也可以看到 CRP 分子的微小不均一性的存在。

参 考 文 献

[1] Wood, H. F. et al.: *J. Exp. Med.*, 100, 71, 1954.

- [2] 吴蔚等,《上海免疫学杂志》,4(2), 65, 1984.
- [3] Laurent, P. et al.: *Electrophoresis*, 4, 316, 1983.
- [4] Righetti, P. G. et al.: *J. Chromat.*, 166, 455, 1978.
- [5] Malamuol, D. and Drysdale, J. W., *Analyt. Biochem.*, 86, 620, 1978.
- [6] Smyth, C. J. et al.: *Scand. J. Immunol.*, 17, Suppl. 10, 233, 1983.
- [7] Axelsson, N. H. and Bock, E. *Scand. J. Immunol.*, 17, Suppl. 10, 177, 1983.

[本文于 1985 年 5 月 9 日收到]

95% (上海原子核所), ATP (Sigma 产品), 纯度 99%, cAMP (西德产品)。阴离子交换树脂, Dowex-1 (200—400 目, 氯型, Serva 公司产品), 经碱和酸处理后于 4N 甲酸溶液中保存备用。猪脾磷酸二酯酶 (中国科学院生物物理所生化厂, 6 单位/瓶, 批号 801115)。GTP (上海生化所东风厂, 批号 83--409)。磷酸肌酸钠 (上海试剂二厂)。肌酸磷酸激酶, 按 Kuby 法提取 (本室孙芝琳教授馈赠)。

2. 测定方法

(1) 组织匀浆的制备

大白鼠断头处死, 迅速取出所需组织 (脑、肝、肾、肌肉等) 置冷浴中, 用滤纸吸去附着水份, 称取一定量组织, 按 1/10 (W/V) 加入预冷匀浆介质 (50mM Tris-HCl, pH7.5, 5mM MgSO₄), 用玻璃匀浆器于冰浴中制成匀浆。

(2) 腺苷酸环化酶活力的测定

反应液总体积 200 μ l, 其中加入 50mM Tris-HCl, pH7.5, 5mM MgSO₄, 10mM 巯基乙醇, 8mM 茶碱, 1mM ATP (5×10^4 cpm), 加入适量组织匀浆。35 $^{\circ}$ C 水浴中保温 10 分钟, 于沸水中加热 3 分钟终止反应。冷却后, 加入 100 μ l 0.1M ZnSO₄ 和 Ba(OH)₂, 混匀, 3000 rpm 离心 15 分钟。将上清液全部转移到预先经水充分淋洗后的 Dowex-1 阴树脂柱 (0.5 $\times$ 2.2cm) 上, 待样品完全进入柱床表面后, 依次用 1ml 水, 0.5ml 和 2ml 2N 甲酸洗柱。收集最后加入的 2ml 2N 甲酸洗脱液, 置 80 $^{\circ}$ C 水浴上, 同时接一空气压缩机吹气管, 蒸干。加 120 μ l TE 缓冲液 (50mM Tris-HCl, pH7.5, 4mM EDTA) 溶解干渣。取 100 μ l 于闪烁瓶内, 加入 1.5ml 无水乙醇和 3.5ml 闪烁液 (0.4% TP 或 PPO; 0.01% POPOP 的二甲苯溶液), 于液体闪烁谱仪上计数测定。

按 Bradford 方法^[3]测定组织匀浆蛋白量, 以牛血清白蛋白作为标准。酶活力以 cAMP Pmoles/分/毫克蛋白表示。

二、结 果

1 反应产物 cAMP 的分离、回收与鉴定

我们利用紫外吸收法首先考查了 Dowex-1 阴树脂柱层析分离纯化 cAMP 的效果。由图 1 可见, 柱体积在 0.5 $\times$ 2.0—3.0cm 时, cAMP 在第 0.5ml 到 2.5ml 2N 甲酸洗脱液中能完全洗出。5'-AMP 略先于 cAMP 流出, 茶碱也随 cAMP 流出, 而 ATP 则保留在柱上。

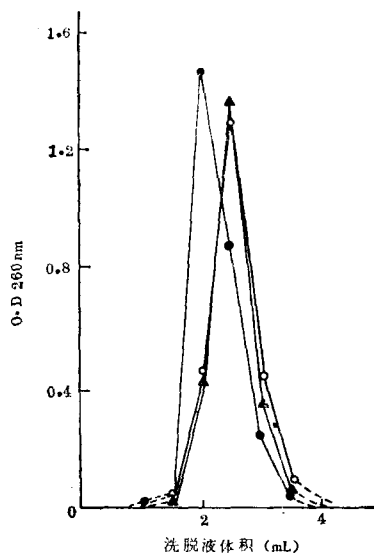


图 1 Dowex-1 阴树脂柱层析柱床体积对 cAMP 洗脱峰位置的影响

各柱加入标准 cAMP (1mg/ml) 200 μ l, 先用 1ml 水淋洗, 然后用 2N 甲酸 0.5ml 分次淋洗。收集各部分洗脱液, 加水 3ml 后测定 O.D._{260nm} 值。柱床体积以柱内径 $\times$ 柱内树脂高 (cm) 表示。

●: 0.5 $\times$ 2.0cm △: 0.5 $\times$ 2.5cm
○: 0.5 $\times$ 3.0cm

结合 Zn⁺⁺-Ba⁺⁺ 沉淀分离及过柱纯化后, ³H-ATP 清除率, 测定放射活性为 99.9 $\pm$ 2.8% ($n = 6$), 以 O.D._{260nm} 计为 98.4 $\pm$ 0.7% ($n = 3$); ³H-cAMP 回收率, 测定放射活性为 73.2 $\pm$ 5.0% ($n = 10$), 但若以 O.D._{260nm} 计 cAMP 回收为 56.0 $\pm$ 1.2% ($n = 7$)。而 5'-AMP 及茶碱经 Zn⁺⁺-Ba⁺⁺ 悬沉后几乎除尽。

我们将肝匀浆 AC 反应液浓缩后作纸层析, 表明确有 ³H-cAMP 生成。另取 AC 反应液经 Zn⁺⁺-Ba⁺⁺ 沉淀后, 取其上清液, 加入 0.6 单位猪脾磷酸二酯酶, 继续保温 20 分钟, 再行沉淀过柱分离 (见图 2) 可见按本操作程序测得的放射性绝大部分是 ³H-cAMP。

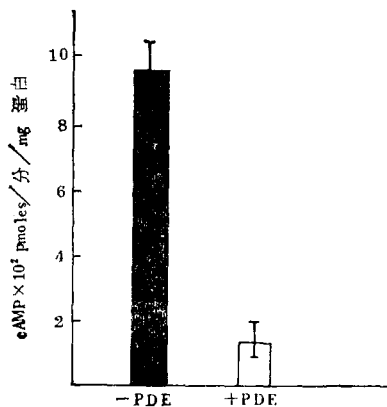


图2 3', 5'-cAMP 磷酸二酯酶水解试验

含有 0.6mg 肝匀浆蛋白和 ^3H -ATP 5.6×10^4 cpm 反应液 200 μl , 35 $^{\circ}\text{C}$ 10 分钟, 测定加(+)与不加(-) PDE 的 ^3H -cAMP 放射性, 柱形图示 $\bar{x} \pm \text{S.D.}$ ($n = 4$)。

2. 影响 AC 活力的因素

(1) 底物 ATP 及 ^3H -ATP 的影响

在大鼠肝匀浆 AC 反应液中, 当 ATP 浓度为 1mM 时, AC 活力随 ^3H -ATP 浓度增加, 在 ^3H -ATP 为 $3-23 \times 10^4$ cpm 时呈线性增加; 但当 ^3H -ATP 浓度为 3.6×10^4 cpm 时, AC 活力则随 ATP 增加 (在 1—5mM) 迅速减小。我们认为, pH7.5, 35 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 分钟, 当 ATP 浓度为 1mM 时, ^3H -ATP 放射性为 $3-10 \times 10^4$ cpm 为宜 (仪器测定 ^3H 效率为 65%)。

(2) 酶浓度的影响

在 1mM ATP (5.1×10^4 cpm) 时, AC 活力随加入匀浆蛋白量 (在 0—0.5mg) 增加而增加 (见图 3)。不同组织 AC 活力不同: 脑组织

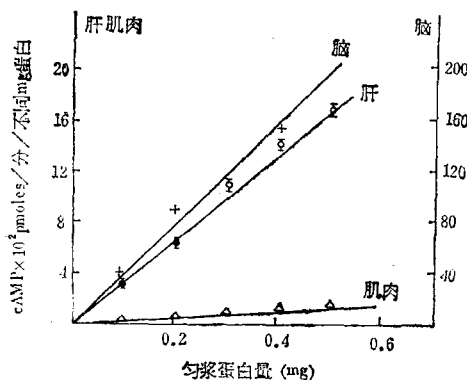


图3 酶浓度对 AC 活力的影响

AC 活力最高, 比肝约大十倍; 肌肉组织 AC 活力最低, 仅为肝脏的十四分之一。

(3) 保温时间对 AC 活力的影响

肝匀浆中蛋白含量为 0.35mg 时, 35 $^{\circ}\text{C}$ 保温 0—20 分钟, AC 活力与保温时间呈正比关系。

(4) ATP 再生系统对 AC 活力的影响

由图 4 可见, 肝匀浆在有或没有 ATP 再生系统存在时, 在一定的范围内 AC 活力均有较好的线性关系; 没有 ATP 再生系统时 AC

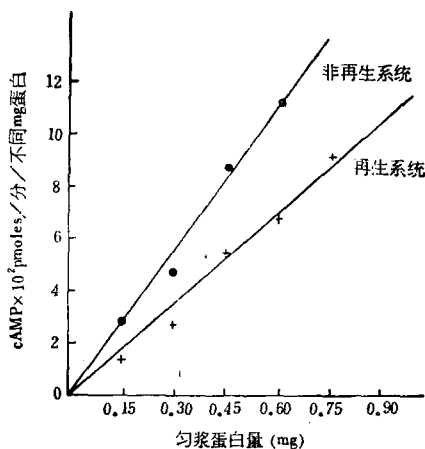


图4 ATP 再生系统对大鼠肝匀浆 AC 活力测定的影响

200 μl 反应液含 500mM Tris-HCl, pH7.5, 5mM MgSO_4 , 10mM 巯基乙醇, 8mM 茶碱, 1mM ATP (9.1×10^4 cpm), ATP 再生系统为 60 μg 肌酸激酶和 400 μg 磷酸肌酸钠, 35 $^{\circ}\text{C}$, 10 分钟。

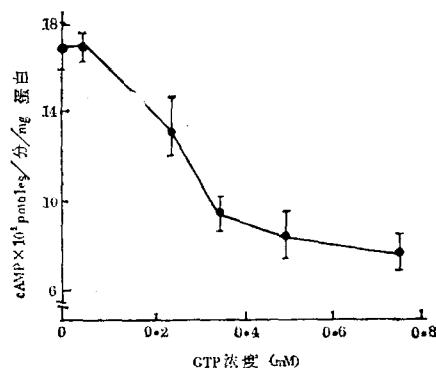


图5 GTP 对大鼠肝匀浆 AC 活力的影响

200 μl 反应液含 50mM Tris-HCl, pH7.5, 5mM MgSO_4 , 10mM 巯基乙醇, 8mM 茶碱, 1mM ATP (9.2×10^4 cpm) 0.58mg 肝匀浆蛋白, 35 $^{\circ}\text{C}$ 10 分钟, 图示 $\bar{x} \pm \text{S.D.}$ ($n = 3$)

活力较高。可见,测定肝匀浆 AC 活力时不用 ATP 再生系统仍可获得较好结果。

(5) GTP 对 AC 活力的影响

GTP 是 AC 激活所必需的激活因子,但我们发现, GTP 高于 0.05mM 时,肝匀浆中 AC 活力明显降低(见图 5)。

3. 重复性

我们对同一肝匀浆样品做 11 支平行管测定 AC 活力, $C. V. = 12.3\%$ 。

三、讨 论

1. AC 反应系统中 cAMP 分离纯化

AC 活力测定中分离纯化 cAMP 有多种方法^[4]。不少作者采用阳离子交换树脂如 Dowex-50^[2] 柱层析,并结合无机离子沉淀;或与其它柱层析如 Al_2O_3 柱相偶联分离 cAMP^[5]。但分离体积一般较大,常需要大量特殊闪烁液, cAMP 回收率不高,操作又较繁杂。1968 年, Brooker 等^[6]曾用 Dowex-1 阴树脂小柱分离 cAMP。最近,国内牛惠生^[7]及郭涛年等^[8]采用阴树脂小柱结合 Zn^{++} - Ba^{++} 悬沉分离 AC 反应产物,获得较好结果。我们在此基础上调整适宜底物浓度,省去加入大量 cAMP 载体及稀释反应液等步骤,适当加大离心速度并延长离心时间;同时使用普通吹气和加热蒸发相结合的浓缩方法,既能简化操作程序,缩短分离时间,又可获得较好回收率及重复性。空白对照计数几乎可忽略,阴树脂柱反复使用多次亦不会引起空白增高。

2. AC 反应条件的控制

由于待测组织样品中往往含有干扰 AC 活力测定的酶类,如 NTPase, $5'$ -NMP-PDE 及磷酸酶,加之 AC 活力一般较低, ATP 转化率低于 0.1% ^[4]。因此,使底物 ATP 最大限度地转变为 cAMP,并建立有效的分离纯化 cAMP 方法,是提高检测 AC 活力灵敏度的关键。在 AC 分析中,常需要加入某些特殊的激活剂,如 NaF、Forskolin、异丙基肾上腺素等,以增加可测 cAMP 量。同时为了维持反应过程中有足够的底物浓度,往往还要加入 ATP 再生系统(如磷酸肌酸-肌酸激酶,或磷酸烯醇式丙酮酸-丙

酮酸激酶系统)。但这些方法有缺点,有时会使结果变得更复杂。此外采用提高底物 ^3H -ATP 比活力,或减小反应液体积等方法,也能提高检测灵敏度。但是所用放射性过高在实用上并不可取;而反应液体积太小则易使操作误差增大。本文的结果不用特殊激活剂及 ATP 再生系统,在使用较低放射性条件下建立的 AC 测定法,为研究多种组织匀浆的 AC 活力提供了一种适宜的手段。

用本法测肝、脑、肾等组织匀浆的 AC 活力较高,这可能与匀浆中同时存在天然的 ATP 再生系统及某些胞浆 AC 激活因子有关。我们发现肌肉匀浆 AC 活力较低。这可能是肌肉组织中含有大量高活性 NTPase 所致。此外 Ca^{++} 和茶碱亦可抑制肌肉 AC 活力^[9]。经调整反应系统后肌肉匀浆 AC 活力明显改善。

近年来已弄清 GTP 及某些激素对 AC 活力有双重作用^[10]。Heyworth 等^[11]发现,只有当 0.1mM GTP 存在时,胰岛素才能抑制肝细胞膜 AC 活力,推测这与膜上某种特异的鸟苷酸调节蛋白有关。根据本文的结果,我们认为,反应系统中 GTP 本身浓度高于 0.05mM 即可抑制匀浆 AC 活力,可能并不是因 GTP 对 Ni(介导激素对 AC 抑制的一类鸟苷酸调节蛋白)激活而引起肝匀浆 AC 活力的降低。

参 考 文 献

- [1] Houslay, MD: *TIBS*, 9, 39, 1984.
- [2] Krishna, G. et al.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 16, 379, 1968.
- [3] Bradford, M. M.: *Anal. Biochem.*, 72, 248, 1976.
- [4] Hardman, J. G. (ed): *Methods in Enzymology*, vol. 38, Hormone Action Part C, p. 9, Academic Press, New York, 1974.
- [5] Saloman, Y. et al.: *Anal. Biochem.*, 58, 541, 1974.
- [6] Brooker, G. et al.: *Biochemistry*, 7, 4177, 1968.
- [7] 牛惠生等:《中华核医学杂志》,3, 103, 1983.
- [8] 郭涛年等:《中国军事医学科学院院刊》,2, 193, 1980.
- [9] Severson, D. L. et al.: *J. Biol. Chem.*, 247, 2949, 1972.
- [10] Katada, T. et al.: *J. Biol. Chem.*, 259, 3586, 1984.
- [11] Heyworth, C. M. et al.: *Biochem. J.*, 214, 547, 1983.

[本文于 1985 年 5 月 13 日收到]