

一种简便、灵敏的 ATPase 活性测定法

徐友涵 宋铨华*

(南开大学分子生物学研究所,天津)

现有的 ATPase 活性测定方法是利用分光光度法,偶联丙酮酸激酶和乳酸脱氢酶的反应,测定 NADH 在 340nm 处光密度的减少,求出 ATP 的水解量,以及利用³²P-ATP 同位素测定或用比色法测定 ATP 水解的 Pi 等,后一方法因实验条件简单,仍是最常用的分析方法。Fiske 建立的钼蓝比色法^[1]虽经改进^[2],灵敏度仍较低。Itaya 发现磷钼酸与孔雀石绿生成的复合物,有很高的克分子消光系数,可用于灵敏测定 Pi^[3]。但用于 ATPase 分析时,酸性钼酸催化的底物 ATP 非酶促水解,将严重干扰对酶活性的测定^[4]。Lanzetta 利用柠檬酸淬灭新生 Pi(如中止酶反应后,ATP 非酶促水解产生的 Pi)的颜色反应,使该法有可能用于 ATPase 的活性测定^[5]。本文基于上述工作,全部使用国产试剂,并用 Tween-20 取代不易获得的 sterox,顺利完成对红细胞膜 Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase、Na⁺-K⁺-ATPase 的测试。现将此法介绍如后。

材料与方 法

孔雀石绿酒石酸盐 (MG) (天津化学试剂

一厂), ATP (江门化工厂), 其余试剂均为国产分析纯。

1. 原始溶液配制

- (1) 0.05% 孔雀石绿溶液(M液)
- (2) 4.2% 钼酸铵于 4NHCl 中(A液)
- (3) 24% 柠檬酸钠盐(C液)
- (4) 1.5% Tween-20

2. 呈色反应溶液配制

1 体积 A 液与 3 体积 M 液混合后, 搅拌 30 分钟, 滤纸过滤, 滤液存于聚乙烯瓶中(AM 液)。100ml AM 液与 4ml 1.5% Tween-20 混合液存于 4℃ 冰箱 (AMT 液), 此溶液可贮存一个月。

3. 红细胞膜 Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase 测定

酶反应溶液含 50—60μg 膜蛋白/ml, 25mM Tris-Maleate (pH7.0), 100mM NaCl, 2mM MgCl, 0.1mM 鸟本苷, 1mM ATP 和 36μM Ca²⁺^[6]。不同时刻取 0.4ml 酶反应液(制作标准曲线时, 则取 0.4ml 标准 Pi 溶液)于 2ml AMT

* 河北大学 85 届生化专业毕业生

到不同方向的两个克隆株,用普通胶板测序时,片段在 300 核苷酸以上的,就需要用另外的酶切片段重新克隆,以测定片段中间的部分,用³⁵S 标记梯度胶分离后,可以自一次克隆得到两个方向的重组子,经过测定便可以得到完整片段的顺序,简化了操作,便于大片段的测定。一次测得 430 核苷的片段的结果见图 4。

³⁵S 标记的不足之处是显影时间长,所以通常与 ³²P 标记联合应用,收效更好。

参 考 文 献

- [1] Sanger, F. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **74**, 5463, 1977.
- [2] Biggin, M. D. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **80**, 3963, 1983.
- [3] 蔡良琬等:《中国医学科学院院报》, **6**(4), 251, 1984.
- [4] Sanger, F. et al.: *J. Mol. Biol.*, **143**, 161, 1980.
- [5] 琦祖和等:《生物化学与生物物理进展》, **6**, 55, 1985.

[本文于 1985 年 8 月 17 日收到]

溶液中,迅速混溶,中止酶反应,1分钟后加 0.4 ml C 液,混溶产生鲜绿色的复合物,在室温下放置 30 分钟后于 660nm 处测定光吸收,颜色至少在 4 小时内是稳定的。

4. 红细胞膜 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 测定

酶反应溶液含 50—60 μg 膜蛋白/ml, 100 mM NaCl, 10m M KCl, 25mM 咪唑 (pH7.2), 4mM Mg^{2+} , 0.5mM EGTA, 2mM ATP。添加或不添加 0.2mM 鸟本苷。于 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 60 分钟。分别测定释放的 Pi (徐友涵,待发表)。 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 活性为存在与缺少鸟本苷时所测的酶活力之差。

5. 蛋白浓度测定 依照 Bradford 法^[7]。

结 果

1. Pi 标准曲线

图 1 示柠檬酸存在下无机磷的标准曲线。空白的 OD 值约 0.1, 反映柠檬酸等试剂所含的 Pi 从标准曲线可求出在我们实验条件下, 磷酸与孔雀石绿复合物的克分子消光系数 ϵ_{660} 约等于 $9.1 \times 10^4 \text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$ 。

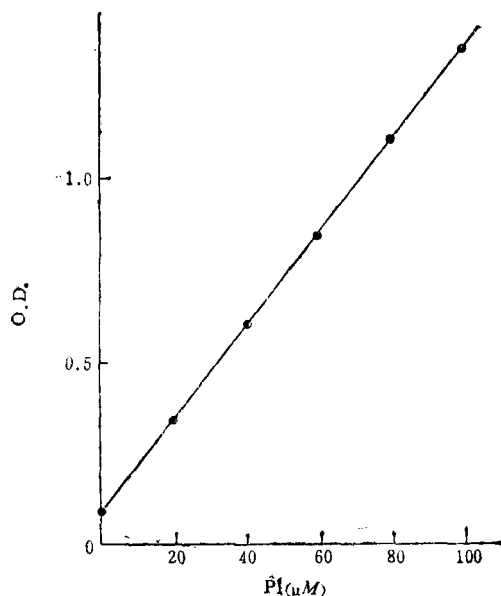


图 1 在柠檬酸存在下的无机磷呈色的标准曲线

2. 柠檬酸对 ATP 非酶促水解产生 Pi , 呈色反应的淬灭效应

图 2 表示在酸性钼酸存在下, 0.2mM ATP 的非酶促水解引起的光密度随时间的增长, 水解速率为 $23 \mu\text{M/hr}$. 即 1 小时内有 11% 左右的 ATP 被水解。加入柠檬酸后, 光密度增长立即停止, 颜色在几小时内是稳定的。柠檬酸显示对新生 Pi 呈色反应的淬灭效应。

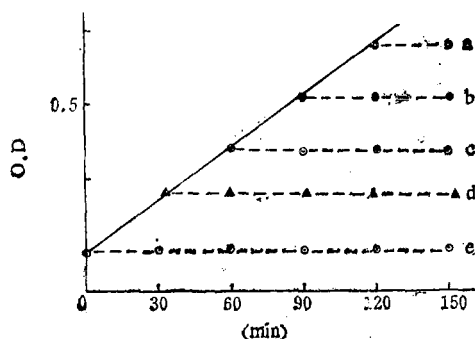


图 2 酸性钼酸催化的 ATP 非酶促水解及柠檬酸对呈色反应的淬灭效应

样品: 0.2mM ATP 0.4ml 与 2.0ml AMT 溶液混合后, 在室温下静止不同时间 (e—0 分; d—3 分; c—60 分; b—90 分; a—120 分) 后, 加 C 液 0.4ml. 室温放置 30 分钟后, 于 660nm 处比色测定。

3. 红细胞膜 $\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+}-\text{ATPase}$ 的测定

为测定存在与缺少钙调蛋白 (CaM) 时, 红

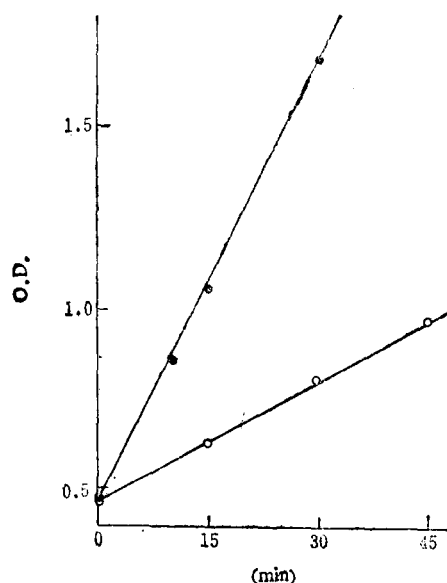


图 3 红细胞膜 $\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+}-\text{ATPase}$ 活力的测定
在酶反应不同时刻取样, 测定释放的 Pi
○—○ 无 CaM ●—● 存在 0.4 $\mu\text{g/ml}$ CaM

表 1

	酶 基 本 活 力 (n·moles/mg·分)				Ca M活化的 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase (n·moles/mg·分)			
	测 定 值			平均值	测 定 值			平均值
连续自动测定	14.6	15.0	14.4	14.6	58.4	62.6	58.4	59.8
孔雀石绿法	15.6	14.6	15.0	15.0	60.0	62.6	61.0	61.2

细胞膜 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase 的活力,酶反应不同时刻 (0, 15, 30, 45min) 取样,分别测定酶反应释放的 Pi , 结果如图 3。0 时刻的吸收值反映 ATP, 柠檬酸等试剂所含的 Pi , 用本法测定的结果与基于钼蓝呈色反应的酶连续自动测定法^[8]的比较参见表 1。

结果表明基于孔雀石绿呈色反应所测的酶活与酶连续自动测定结果基本一致。

4. 红细胞膜 Na^{+} - K^{+} -ATPase 测定

酶反应溶液在存在与缺少鸟本苷时所测的酶活之差代表膜 Na^{+} - K^{+} -ATPase 的活力,用上述方法测定正常人红细胞膜 Na^{+} - K^{+} -ATPase 活力为 $6.0 \pm 0.5 \text{ n·moles/mg·分}$,与文献报道的结果颇为一致^[9]。

讨 论

比色测定 Pi 最灵敏的方法是基于孔雀石绿与磷钼酸生色的复合物具有高的吸光度,有报道其吸光值在 8×10^5 — $11.2 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ ^[5,10]。在我们测试条件下,其吸光度为 $9.1 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ 。为稳定染料-磷钼酸复合物, Lanzetta 选用表面活性剂 sterox。我们改用 Tween-20 也能满足分析要求,复合物颜色至少在 4 小时内稳定,同时具有良好的重复性。

在分析 ATPase 活力时,酸性钼酸催化的 ATP 非酶促水解极大干扰酶活性测定^[4],以前曾用有机溶剂如异丁醇、乙酸丁酯萃取磷钼酸,以减少干扰,但操作麻烦,重复性很差。低温 (0°C) 也可抑制酸性钼酸催化的 ATP 水解,但

呈色反应也变慢,呈色的结果也不稳定。

磷钼酸生成后剩余的钼酸可与柠檬酸结合,产生的柠檬酸-钼酸复合物不再能与无机 Pi 反应,因此柠檬酸可用于淬灭 ATP 非酶促水解产生 Pi 的呈色反应^[11],从而简便地测定 ATPase 活性而没有显著的干扰反应,实验表明该方法操作方便,灵敏,易于在简单实验室条件下测定 ATPase 的活性。

上述 Pi 的测定方法原则上也适用其它水解释放 Pi 的酶活性测定,如无机焦磷酸酶、碱性磷酸酶、葡萄糖-6-磷酸酶、5'-核苷酸酶等。

衷心感谢曲希玉同志的技术辅助。

参 考 文 献

- [1] Fiske, C. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 66, 375, 1925.
- [2] Lacy, J.: *Analyst*, 90, 65, 1965.
- [3] Itaya K. et al.: *Clin. Chem. Acta.*, 14, 361, 1966.
- [4] Malherbe, H. W. et al.: *Biochem. J.*, 49, 286, 1951.
- [5] Lanzetta, P. A. et al.: *Anal. Biochem.*, 100, 95, 1979.
- [6] 徐友涵等:《科学通报》, 17, 1348, 1985.
- [7] Bradford, M. M.: *Anal. Biochem.*, 72, 248, 1976.
- [8] 徐友涵等:“生物化学与生物物理进展”, 5, 57, 1985.
- [9] Gietzen, K., et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 101, 418, 1981.
- [10] Hess, H. H. et al.: *Anal. Biochem.*, 63, 607, 1975.
- [11] Baginski, E. S. et al.: *Annals. Clin. Lab. Sci.*, 5, 399, 1975.

【本文于 1985 年 10 月 10 日收到】