

大鼠心肌线粒体 Ca^{2+} -ATP 酶的制备及活性测定

张源鑫 符云峰 窦淑筠

(河北省医学科学院实验医学研究所生化研究室, 石家庄)

Ca^{2+} 在细胞内有许多重要的功能, 它参与不同酶系和多种类型细胞活动的调节。细胞内 Ca^{2+} 的这些功能需很低的 Ca^{2+} 浓度 ($\mu\text{mol/L}$ 或更低), 维持细胞浆低 Ca^{2+} 浓度是与细胞 Ca^{2+} 调节装置有关, 心肌细胞的这类装置包括肌膜、肌浆网、线粒体以及一些与 Ca^{2+} 结合的蛋白(如钙调素)和小分子物质, 其中线粒体是重要的机构之一。Vasington 等^[1]首次报道了肾脏线粒体对 Ca^{2+} 的摄取作用, 并注意到这一过程依赖线粒体的呼吸。现已确认线粒体有两种不同的 Ca^{2+} 转运系统^[2], 一种负责 Ca^{2+} 内流, 这种内流需消耗能量, 另一种参与 Ca^{2+} 外流。Lehninger 等^[3]认为所有细胞线粒体膜上均含有向内的依赖呼吸的 Ca^{2+} 泵, 所需的能量由 ATP 水解来提供^[4], 亦即 Ca^{2+} 通过线粒体膜上的 Ca^{2+} -ATP 酶而转运入基质中。1985 年 Trotman 等^[5]报道了毒杀酚对线粒体 Ca^{2+} -ATP 酶的影响, 但 Dhalla 等^[6]却未检测出该酶活性的存在。本文就大鼠心肌线粒体 Ca^{2+} -ATP 酶的制备及配体等因素对该酶活性的影响报告如下。

量结果表明全血中 ATP 含量主要来自血球, 约占全血的 96%。因而贫血者 ATP 含量较正常低。

五、血液保存条件实验

多次试验结果表明血液保存在 0°C 较妥, 在两天内测定对结果影响较小(表 3), 否则 ATP 将受到破坏或分解。

表 3 温度及时间对血液保存的影响

编号	ATP 含量 保存温度	测定时间		
		当天	隔 2 天	隔 1 周
1	0°C	1.7	1.8	0.6
2	0°C	1.6	1.8	0.5
3	4°C	2.6	1.4	0.2

表中 ATP 浓度单位: $\times 10^{-4} \text{ mol/L}$

六、正常值

本文对本所 42 名职工进行血中 ATP 含量的测定, 年龄从 21—60 岁, 平均年龄 39.2 岁, 正常值为 $1.84 \pm 2.02 \times 10^{-9} \text{ mol/g}$ 血色素, 男女之间无明显差

材 料 和 方 法

本实验所用的普通试剂均为分析纯, 寡霉素购自 CALBIOCHEM-BEHRING 公司, 哇巴因购自西德 Boehringer Mannheim GmbH。

线粒体的制备 将大鼠断头处死后, 立即取出心脏, 置于冷的介质 (0.25 mol/L 蔗糖、 10 mmol/L 咪唑-HCl, $\text{pH } 7.5$) 中, 去除脂肪组织及外膜, 用介质冲洗 3—4 次洗去血污。进行分级分离^[7]。将洗净的心肌组织(约 10 g 左右)在少量介质中充分剪碎, 再用介质冲洗 1—2 次, 然后在 Glass-Teflon 匀浆器中匀浆, 离心 ($750 \times g$) 10 分钟, 弃去沉淀, 取上清液离心 ($9000 \times g$) 20 分钟, 去上清液, 加介质悬浮沉淀, 以同样的速度重复离心一次。最后将沉淀(线粒体小球)悬浮于介质中, 置于低温冰箱中保存供酶活性测定。以上操作均在 4°C 下进行。

Ca^{2+} -ATP 酶活性测定 通过测定 ATP 水解释放的无机磷来确定线粒体 Ca^{2+} -ATP 酶的活性^[8]。在

别[男性为 $1.86 \pm 1.78 \times 10^{-9} \text{ mol/g}$ ($n = 20$); 女性为 $1.80 \pm 2.24 \times 10^{-9} \text{ mol/g}$ ($n = 22$)。血色素的测定是取 $20 \mu\text{l}$ 手指血按张庭卿等^[9]报道的方法测定]。

七、影响 ATP 生物发光的因素

酶反应对许多因素非常敏感, 王维光^[12]对此进行了详细的研究, 认为荧光素酶的用量、反应体系的 pH 值、缓冲液系统、反应温度以及盐都会影响 ATP 的生物发光。本文也观察了反应温度、pH 值及盐对 ATP 生物发光的影响, 结果与王维光的报道相符合。

本工作得到王维光同志的指导, 在此表示感谢。

参 考 文 献

- [1] Brown, A.M.: *Red Cell Membranes—A Methodological Approach*, (J. C. Ellory and J. D. Young eds.), Academic Press, London, 1982, 223—238.
- [2] 王维光: 《植物生理学通讯》, 1982, (4), 38.
- [3] 张庭卿等: 《临床检验杂志》, 1985, (3), 123.

[本文于 1988 年 4 月 25 日收到]

总体积为 400 μl 的反应介质中含有: 100 mmol/L 咪唑-HCl(pH 7.4), 4 mmol/L ATPNa_2 , 0.1 mmol/L MgCl_2 , 5 mmol/L CaCl_2 , 100 mmol/L KCl , 40~60 μg 线粒体蛋白(以上浓度均为最终浓度)。总 $(\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})$ -ATP 酶活性在含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的介质中测定, Mg^{2+} -ATP 酶在只含 Mg^{2+} 和 4 mmol/L EGTA 的介质中测定。总 $(\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})$ -ATP 酶活性与 Mg^{2+} -ATP 酶活性之差为 Ca^{2+} -ATP 酶活性。酶活性单位用 $\mu\text{molPi}/\text{mg}$ 蛋白 $\cdot$ 小时来表示。蛋白定量用 Lowry 法,以牛血清白蛋白作为标准物。

结果与讨论

从图 1, 2 可以看出, Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 浓度的变化对线粒体 Ca^{2+} -ATP 酶活性有明显的影响,其最适浓度分别为 5mmol/L, 0.1mmol/L, 此时酶活性为 17.2

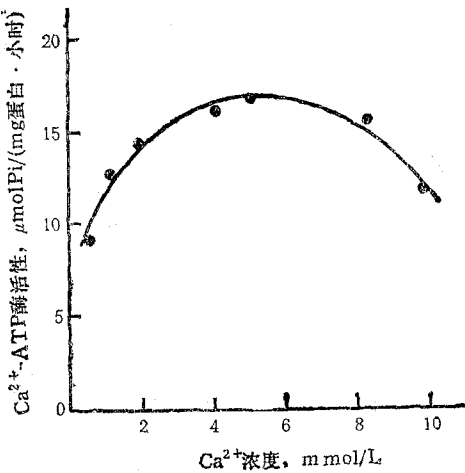


图1 Ca^{2+} 浓度与 Ca^{2+} -ATP 酶活性关系

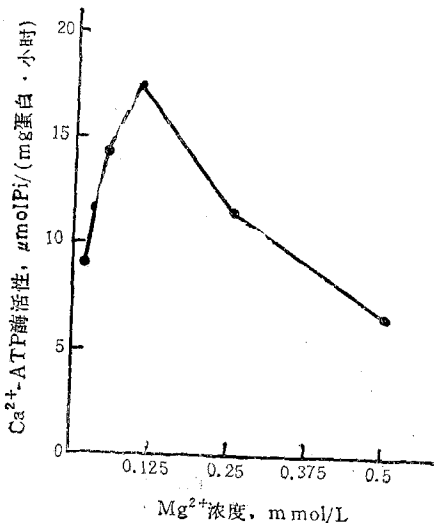


图2 Mg^{2+} 浓度与 Ca^{2+} -ATP 酶活性关系

$\mu\text{molPi}/\text{mg}$ 蛋白 $\cdot$ 小时。而 K^{+} 浓度的改变对该酶活性影响较小(结果未显示)。

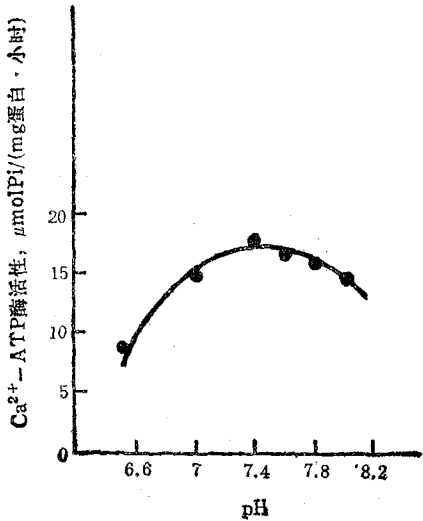


图3 pH 值对 Ca^{2+} -ATP 酶活性的影响

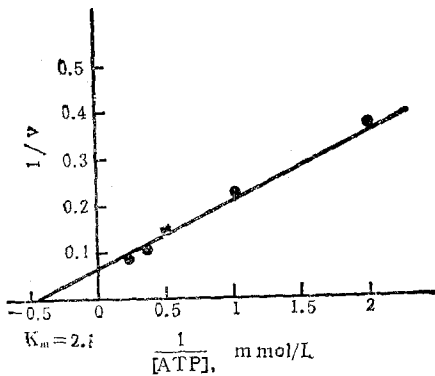


图4 底物浓度与反应速率关系双倒数作图

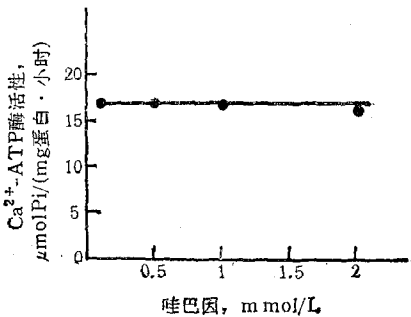


图5 哇巴因对 Ca^{2+} -ATP 酶活性的影响

图3表示 pH 值对 Ca^{2+} -ATP 酶活性的影响,当 pH 值为 7.4 时酶活性最高。

保持其它条件不变,在不同浓度的 ATP(0.5~4 mmol/L) 下测定 Ca^{2+} -ATP 酶活性,然后用 ATP 浓

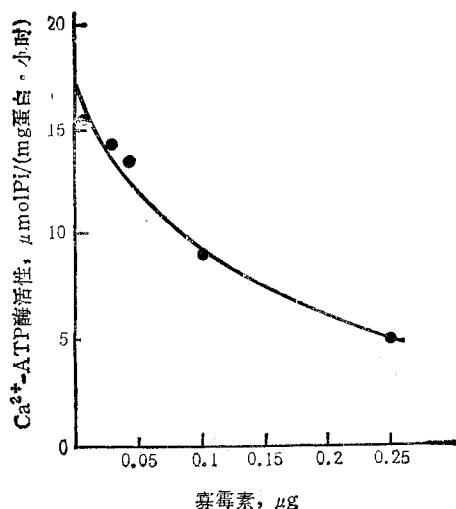


图6 寡霉素对 Ca^{2+} -ATP酶活性的影响

度和酶活性的双倒数作图,如图4所示,可算出底物ATP的 K_m 值为 2.1mmol/L 。

图5、6分别表示哇巴因和寡霉素对 Ca^{2+} -ATP酶活性的影响,结果未显示出哇巴因对该酶有何影响,而寡霉素的作用较为明显,当寡霉素的浓度为 $0.25\mu\text{g/ml}$ 时,酶活性被抑制一半。

实验结果清楚地表明,线粒体膜存在 Ca^{2+} -ATP酶并依赖其配体 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 而表现其活性,但配体浓度过高时,酶活性下降, Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 最适浓度分别为 5mmol/L 、 0.1mmol/L 。 K^+ 对 Ca^{2+} -ATP酶影响较小,说明线粒体 Ca^{2+} -ATP酶对 K^+ 不敏感。哇巴因是 $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATP}$ 酶的特异抑制剂,本实验结

果未表现哇巴因对ATP酶的抑制作用,说明在用本方法制备的线粒体 Ca^{2+} -ATP酶制备物中未混杂质膜 $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATP}$ 酶,线粒体 Ca^{2+} -ATP酶对哇巴因不敏感。寡霉素是线粒体氧化磷酸化的解偶联剂,对线粒体有明显的毒性作用。本实验观察到寡霉素对线粒体 Ca^{2+} -ATP酶活性明显抑制,其 IC_{50} 为 $0.25\mu\text{g/ml}$,表明寡霉素不仅影响线粒体的产能过程,对线粒体膜 Ca^{2+} 转运也具有一定影响,可能抑制线粒体膜 Ca^{2+} 主动转运,从而影响线粒体对胞浆 Ca^{2+} 水平的调节,其作用机制和特性还有待进一步研究。

线粒体 Ca^{2+} -ATP酶的制备及活性测定操作简便,不需特殊设备,结果较为可靠,可作为研究线粒体 Ca^{2+} 转运的一项有用的指标。

参 考 文 献

- [1] Vasington, F. D. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1962, 237, 2670.
- [2] Fiskum, G. et al.: *Feder. Proc.*, 1980, 39(7), 2432.
- [3] Lehninger, A. L.: *Supplement III to Circ. Res.*, 1974, Vol. 34 and 35, 83—90.
- [4] Joseph, G. et al.: *Circulation*, 1987, 75, (Suppl V), v-15.
- [5] Trotman, C. H. et al.: *Life Sci.*, 1985, 36(5), 427.
- [6] Dhalla, N. S. et al.: *Myocardial Injury, Advances In Experimental Medicine And Biology* VOL161 edited by John J. Spitzer, Plenum Press, New York, 1983, 305—316.
- [7] Green, D. E. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1957, 23, 516.
- [8] Fisk, C. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1925, 66, 375.
- [9] Skou, J. C.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1960, 42, 6.

【本文于1988年5月18日收到】

(上接第320页)

参 考 文 献

- [1] 中科院生物物理所线粒体研究小组:《线粒体的分离与活性测定》,内部资料,1980,1—9。
- [2] 赵君庸等:《西安医科大学学报》,1987,8(3),258。
- [3] Gazzotti, P. et al.: *In Membrane Biochemistry*

(Carafioi, E. et al eds), New York, Springer-Verlag New York Inc. 1979, 61~76.

- [4] Estabrook, R. W.: *Methods in Enzymology*, Academic press Inc., New York, 1967, Vol. 10, 41—47.

【本文于1988年6月4日收到】