

大鼠脑突触体 (Na-K)ATPase 活力的微量测定方法*

冯北元 徐慕禹

(中国科学院动物研究所内分泌室)

目前关于 ATPase 活力的测定,一般是将酶与底物一起保温后,分析释放的无机磷的含量。无机磷(Pi)含量的测定,习惯上采用 Fiske 和 SubbaRow^[1]的方法,但由于此法所用还原剂不稳定,形成的有色复合物也极不稳定,而且在颜色的发生过程中 ATP 有干扰,同时这种方法灵敏度不高,不适用于测定数量很少或酶活力极低的样品。近来 Michele G. Bunette^[2], Reiji Takashi^[3] 提出测定 ATPase 活力的新方法,但它需要的仪器和试剂比较复杂,操作又必需熟练,因此,在一般实验室条件下是不太适用的。

本法采用了 L. Musbek^[4]的测定 Pi 的方法,并加以改进,把酶反应液的体积缩小到 100 微升(一般为 1 毫升),进一步提高了测定方法的灵敏度。

实验方法

一、制作 Pi 校准曲线

称取在 105℃ 烘至恒重的磷酸二氢钾,用双蒸水配成每毫升含 1 微克分子(1 μ mole)磷的母液。

将磷的母液用双蒸水稀释 50 倍,成为每毫升含 20 毫微克分子(20n moles)磷的标准溶液。取十个不同量的标准溶液分别放在十个试管内(2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 毫克分子)加双蒸水使各管体积均匀 1 毫升。依次加入下列各种试剂:0.5 毫升 15% 三氯醋酸;0.4 毫升酸性钼酸钠(24% 硫酸 1 份:0.1M 钼酸钠 3 份, V/V) 摇匀后 15 秒钟,再加入 0.3 毫升孔雀绿试剂(18.5 毫克孔雀绿溶于 100 毫升 1% 聚乙烯醇),反应两分钟后加入 2 毫升 7.8% 硫酸,室温放置一小时后进行比色测定(波长: 625nm,

比色杯光径 1 厘米)。参考杯除不含磷外,其余试剂均与样品杯相同。以消光值为纵座标,磷的含量为横座标,绘制校准曲线。(图 1)

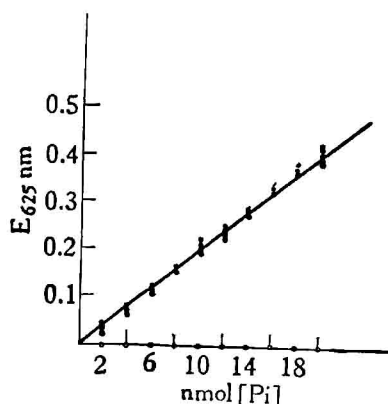


图 1 无机磷的校正曲线

二、大鼠脑突触体 (Na-K)ATPase 活力的测定

1. 突触体样品的制备 按 Gray 和 Whittaker^[5]的方法,略加修改。得到的突触体样品用 10mM Tris-HCl (pH7.4) 缓冲液适当稀释后,分装在小管内,置 -20℃ 低温冰箱保存。突触体样品蛋白质含量的测定,采用 Hartree^[6]的方法(牛血清蛋白作为标准蛋白)。

2. (Na-K)ATPase 活力的测定 主要参考 A. A. Abdel-Latif^[7]的方法,但加以修改,酶反应液的体积缩小到 100 微升。取 9 个小试管(直径 6 毫米,长 4 厘米)分成三组(每组重复三管、取平均值),各组内容如下:

组 1: 100 微升反应液中含 50mM Tris-HCl 缓冲液 (pH7.4) 5mM MgCl₂, 150mM

* 本文承张致一教授,刘树森副教授指正;工作中得到本所新技术室及发育生物所同志的帮助,深表感谢。

NaCl, 20mM KCl, 0.5mM ATP, 8 微克左右蛋白质含量的突触体样品。组 2: 100 微升反应液中含 50mM Tris-HCl 缓冲液 (pH7.4), 5 mM MgCl₂, 0.5mM Ouabain, 0.5mM ATP, 8 微克左右蛋白质含量的突触体样品。组 3: 100 微升反应液中含 50mM Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.4), 5mM MgCl₂, 8 微克左右蛋白质含量的突触体样品, 加入 50 微升的 15% 三氯醋酸后再加 0.5mM ATP。

各组加 ATP 后立即置于 37°C 水浴中保温 5 分钟, 然后立即向组 1、组 2 各管加入 50 微升的 15% 三氯醋酸, 置冰浴中, 将反应液定量地转入带磨口塞的 5 毫升试管中, 用少量双蒸水洗小管 2—3 次; 合并洗液使最后体积为 1 毫升, 待测磷 (测磷的步骤与测 Pi 校正曲线相同)。

3. Na-K-ATPase 比活的计算 分别将组 1、组 2 的消光值减去组 3 的消光值, 在校正曲线上查出 Pi 的量, 换算成比活单位: 释放的 Pi μ moles/mg 蛋白质·小时, 组 1 为 (Na-K-Mg) ATPase 的比活 (总的比活); 组 2 为 (Mg) ATPase 的比活; 组 1、组 2 比活之差为 (Na-K) ATPase 的比活。

结果讨论

从图 1 可见, 磷的含量在 2—20n moles 为一条比较理想的直线。含磷量如超过 20n moles 其消光值逐渐偏离直线关系。根据我们制备的大鼠脑突触体样品的酶活力, 本方法提出在 100 微升反应液中, 以加 8 微克左右 (6—10 微克) 的蛋白质含量为宜。

用本法测定大鼠脑突触体 (Na-K) ATPase

活力的三次实验结果见下表。

表 大鼠脑突触体的 ATPase 活力

次数	比活 类别	释放的 Pi μ moles/克蛋白质·小时		
		(Na-K-Mg) ATPase	(Mg) ATPase	(Na-K) ATPase
1		25.91	10.34	16.28
2		24.27	8.50	16.28
3		26.76	8.78	18.69

注: 每次实验重复三管, 取平均值。

从表中可见, (Mg) ATPase 的活力与 A. A. Abdel-Latif^[8]发表的数值相近, 而 (Na-K) ATPase 的活力则比它高一倍左右。

本法可测定微量的 ATPase, 操作比较简便。由于突触体样品量很少, 在加三氯醋酸沉淀蛋白质后, 可以省去离心分离的步骤。方法的重复性也较好; 在加突触体样品时, 如能做到仔细摇匀, 加量准确, 则每管误差可以低于 5%。因为方法比较灵敏, 实验要求分析纯试剂和双蒸水, 并严格洗涤玻璃仪器, 否则会产生较大的误差。

参考文献

- [1] Fiske et al.: *Methods in Enzymology* 3, 843, 1957.
- [2] Michele. G. B.: *Anal. Biochem.*, 86, 229, 1978.
- [3] Reiji Takashi, et al.: *Anal. Biochem.*, 92, 375, 1979.
- [4] Muszbek, L. et al.: *Anal. Biochem.*, 77, 286, 1977.
- [5] Gray. E. G. et al.: *J. Anat.*, 96, 79, 1962.
- [6] Hartree, E. F. *Anal. Biochem.*, 48, 422, 1972.
- [7] Abdel-Latif, A. A. et al.: *Methods of Neurochemistry*, Vol. 5, 147, 1973.
- [8] Abdel-Latif, A. A. et al.: *J. Neurochem.*, 17, 391, 1970.

[本文于 1980 年 5 月 28 日收到]