

- [6] 李成文等:《生物化学与生物物理进展》6, 71—73 页 1983 年
[7] 阎一林:《中华按蚊种间亲缘种的生化差异》(内部资料(动物所研究生论文) 1982 年。
[8] Andrew, C. et al: *Biochemical Genetics*, 18, (11/

12) 1185, 1980.

- [9] Othmar, G.: *Methods in Enzymology*, XXI (22), 590, 1971.

[本文于 1984 年 6 月 16 日收到]

铊激活人红细胞膜 (Na^+-K^+)-ATP 酶研究

蒋 斌 孙 祺 薰

(中国科学院上海原子核研究所)

铊是 III 族元素,放射性药物铊 (^{201}Tl) 对心肌组织有一定亲和性^[1]。近十多年,日趋广泛地应用于临床心肌灌注显影,诊断心肌疾患,效果较好。但它由细胞转运而为细胞摄取、组织浓集的机理至今未被阐明^[2]。本工作是在研究完整细胞摄取 Tl^+ 规律、机理的基础上^[3],进一步探讨 Tl^+ 的细胞膜转运和 (Na^+-K^+)-ATP 酶 (Na 泵)之间的联系,用人红细胞膜为材料,比较研究 Tl^+ 和 K^+ 激活人红细胞膜 (Na^+-K^+)-ATP 酶的异同。

一、材料和方法

(Na^+-K^+)-ATP 酶是细胞膜上一横贯质膜的固有蛋白。我们用人红细胞膜作为粗制的 (Na^+-K^+)-ATP 酶。在适当条件下,用酶分解底物而产生的无机磷量 (Pi) 来衡量酶活性,比活性单位为 $\mu\text{molePi} \cdot \text{mgP}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$, 其中 mgP 是单位重量红细胞膜蛋白量。本实验用血取自同血型而无近期服药史,无烟酒嗜好的健康中年男女志愿献血者。每次三名早晨空腹抽血,肝素抗凝,等量混合,献血员要相对固定。

主要参照 Dodge, J. T. 的方法^[4],用低渗溶血,密度梯度差速离心法制备人红细胞膜。做法是先由 $\text{pH}7.4$ 等渗磷酸盐缓冲液多次悬洗离心,充分分离红细胞,然后用 $\text{pH}7.4$ 10mM Tris 缓冲液低渗涨破溶血,缓冲液和红细胞容积比为 $70:1$,搅拌 1—2 分钟。再用同一低渗液三次悬洗及 $10000-20000\text{g}$ $\text{RCF} \times 15$ 分离心(HITACHI20PR-52D 高速冷冻离心机),即

可制得匀一的乳白色的红细胞膜。全部操作温控在 -2°C 。经相差显微镜观察,人红细胞膜为匀一圆形或扁圆形透明而有皱纹的结构,不含完整红细胞和污染的白细胞、细菌等(图 1)。

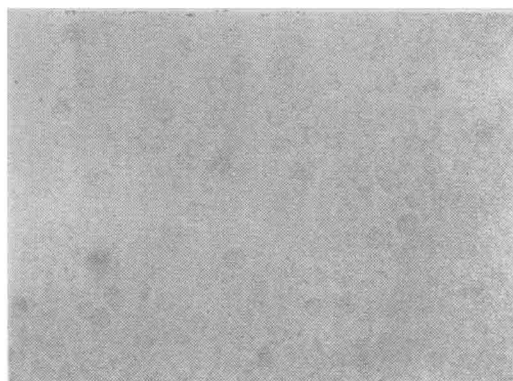


图 1 人红细胞膜
($\times 600$)

为了使测试结果准确可靠,凡包括有若干对比条件(如不同浓度的 K^+ 和 Tl^+) 的同一个实验使用同一次制得的人红细胞膜。

红细胞膜蛋白定量采用 Lowry, O. H. 法^[5]。在 $10-100\gamma$ 范围内,光密度和蛋白量线性关系良好。制得的人红细胞膜经碱溶液稀释 50 倍即为测蛋白样品,其蛋白浓度恰在此线性范围内。最后用低渗 Tris 液将人红细胞膜浓度调到 3mg 蛋白/ ml 。无机磷测定主要参照 Lagarus, L. H. 的方法^[6],用 ANSA 为钼蓝显色还原剂。本方法在 $2-20\gamma\text{Pi}$ 内,光密度和 Pi 量呈线性关系,本实验测样 Pi 量均在此范围内。此法测 Pi 灵

敏、方便、重复性好。

(Na⁺-K⁺)-ATP 酶反应条件: pH7.4; Tris 50mM; Mg⁺⁺ 4mM, Na⁺ 100mM; ATP 2mM; 人红细胞膜 3mg/ml, 0.5ml; EGTA 0.1mM(为络合 Ca⁺⁺, 以尽可能减少 Ca⁺⁺-Mg⁺⁺-ATP 酶的干扰), K⁺ 为变量, 浓度变化范围 1—15mM; 以 Ti⁺ 代 K⁺ 时, Ti⁺ 浓度变化范围是 0.1—1.5 mM; 主要阴离子为 Cl⁻, 总渗透压约 310mOsm, 总反应体积 1ml。用水浴恒温 37℃ 振荡 60 次/分, 保温 1 小时, 每次以加 ATP 开始反应, 由 3% 三氯乙酸 0.5ml 沉淀蛋白终止反应。用同样反应条件, 将含与不含 0.5mM Na 泵特异抑制剂 Ouabain 保温的 ATP 酶分解 ATP 产 Pi 量之差为 (Na⁺-K⁺)-ATP 酶活性。

酶反应结束后, 4000rpm × 3 分离心沉淀蛋白质, 倾倒入上层无蛋白滤液于干净试管中, 供测 Pi 用。

不同浓度 K⁺、Ti⁺ 激活 Na 泵实验中, K⁺、Ti⁺ 对应点浓度比为 10:1。在 K⁺、Ti⁺ 混合激活 Na 泵的实验中 K⁺、Ti⁺ 浓度为变量, 二者以 10:1 (即 1 份 Ti⁺ 当作 10 份 K⁺) 互补叠加到相当于 5mM K⁺ 浓度。

比较 Ouabain 分别抑制由 K⁺、Ti⁺ 激活之 Na 泵活性实验中, K⁺、Ti⁺ 浓度各为 10 mM 和 1mM, Ouabain 浓度为变量, 变化范围是 10⁻⁸—10⁻³M。本实验中 Mg⁺⁺-ATP 酶反应液成份: Mg⁺⁺4mM, EGTA 0.1mM, Tris 50 mM, pH7.4。其他酶反应条件及酶活性表示均同 (Na⁺-K⁺)-ATP 酶。Ouabain 对 (Na⁺-K⁺)-ATP 酶抑制率可按以下公式计算:

$$\begin{aligned} & \text{Ouabain 抑制率} \\ &= \frac{(\text{Na}^+-\text{K}^+)\text{-ATP 酶活性被 Ouabain 抑制部分}}{(\text{Na}^+-\text{K}^+)\text{-ATP 酶全部活性}} \times 100\% \\ &= \frac{\text{总 ATP 酶活性} - \text{Ouabain 作用下残存的 ATP 酶活性}}{\text{总 ATP 酶活性} - \text{Mg}^{++}\text{-ATP 酶活性}} \times 100\% \end{aligned}$$

比较酒精对分别由 K⁺、Ti⁺ 激活之 Na 泵影响实验中, K⁺、Ti⁺ 浓度各为 5mM 和 0.5 mM, 酒精浓度是 0.5%。无酒精保温做为对照, 酒精对 Na 泵活性抑制率可按以下公式计算

0.5% 酒精抑制率

$$= \frac{\text{无酒精保温的 Na 泵活性} - \text{含 0.5\% 酒精保温的 Na 泵活性}}{\text{无酒精保温之 Na 泵活性}} \times 100\%$$

全部试剂均为分析纯, 实验均用重蒸水。Ouabain 为德 E. Merck 产, K₂SO₄ 为天津塘沽新华化工厂产, Ti₂SO₄ 为英国 J. M. C. 产。

本实验结果均为重复三次的实验均数。

结果与讨论

1. 不同浓度 K⁺、Ti⁺ 激活 (Na⁺-K⁺)-ATP 酶活性比较。

图 2 的结果表示 Ti⁺ 可完全取代 K⁺ 激活 (Na⁺-K⁺)-ATP 酶。在 10mM K⁺ 和 1mM Ti⁺ 时, Na 泵活性完全相等, Ti⁺ 激活 Na 泵的能力是 K⁺ 的 10 倍。其余各浓度 Ti⁺ 激活 Na 泵能力约是 K⁺ 的 7—8 倍。

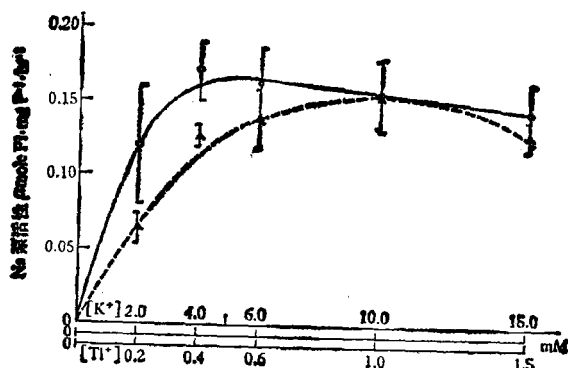


图 2 不同浓度 K⁺、Ti⁺ (10:1 浓度) 分别激活人红细胞膜 (Na⁺-K⁺)-ATP 酶活性比较

在本实验浓度范围内, 4mM K⁺ 和 1mM Ti⁺ 时, Na 泵活性最大。考虑到标准差, 分别由 K⁺、Ti⁺ (10:1 浓度) 激活的人红细胞膜 Na 泵活性曲线多处重叠, 与 Britten^[7] 及 Skulskii^[8] 的研究结果类似。

本实验结果表明, Ti⁺ 可取代 K⁺ 激活人红细胞膜 (Na⁺-K⁺)-ATP 酶, 低浓度 (0.2—1.5mM) Ti⁺ 激活 Na 泵的能力为 K⁺ 的 7—10 倍。

2. K⁺、Ti⁺ 混合激活人红细胞膜 Na 泵活性

图 3 是不同构成比的 K⁺、Ti⁺ 以 10:1 浓

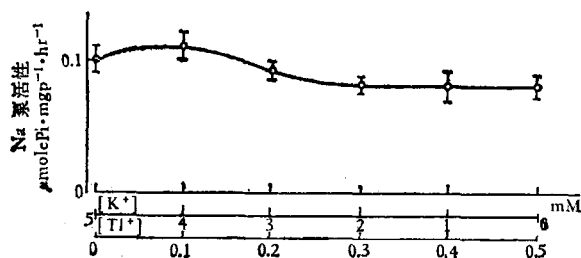


图3 K^+ 、 Tl^+ 以 10:1 浓度互补混合激活人红细胞膜 Na 泵活性
○——○ K^+ ▲---▲ Tl^+

度互补混合到相当于 5mM K^+ 激活的 Na 泵活性,为一近似水平线。Na 泵活性稳定在 0.08—0.1 $\mu\text{mole Pi} \cdot \text{mgP}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$ 。

对照图 2 可见在 $[K^+] < 6\text{mM}$, $[Tl^+] < 0.6\text{mM}$ 各点, K^+ 激活的 Na 泵活性均略大于相应 Tl^+ 激活的 Na 泵活性,而又以 4mM K^+ 激活的最大。图 2 中 K^+ 、 Tl^+ 浓度恰在此范围内,此时 Na 泵活性在基本稳定的前提下,必然是 K^+ 含量较高,而在激活 Na 泵活性中 K^+ 起主要作用的图左侧曲线,略高于含 Tl^+ 较高而在激活 Na 泵活性中 Tl^+ 起主要作用的图右侧曲线,又以 4mM K^+ /0.1mM Tl^+ 激活的 Na 泵活性为最大。

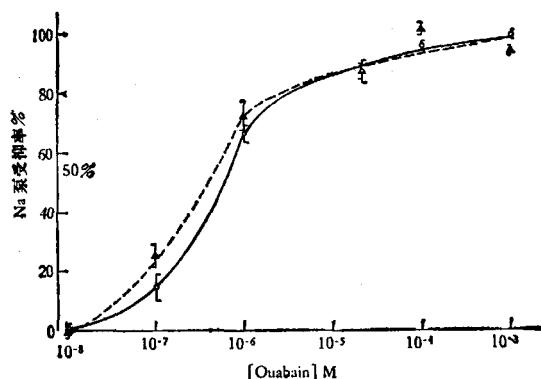


图4 不同浓度 Ouabain 对分别由 10mM K^+ 和 1mM Tl^+ 激活的 Na 泵活性抑制率
○——○ K^+ ▲---▲ Tl^+

3. 不同浓度 Ouabain 对分别由 10 mM K^+ 和 1mM Tl^+ 激活的 Na 泵活性抑制作用比较 (见图 4)。

图 4 表明, Ouabain 对分别由 10mM K^+ 和

1mM Tl^+ 激活的红细胞膜 Na 泵抑制作用相同,二曲线形态基本一致。将标准差考虑在内,二曲线有多处重叠。对应 K^+ 、 Tl^+ 激活的 Na 泵活性,被 Ouabain 抑制的半最大抑制浓度均为 $5-6 \times 10^{-7}\text{M}$,其中 Tl^+ 激活的 Na 泵活性,当 10^{-4}M Ouabain 时呈现最大抑制率,这和 Britten, J. S. 关于兔肾 Na 泵的研究结果一致^[7]。 K^+ 激活的 Na 泵活性,当 Ouabain 为 10^{-3}M 时抑制率最大。和 Bonting, S. L. 关于猫脉络膜丛及兔晶体上皮 Na 泵的研究结果一致^[9]。上述结果表明, Ouabain 对分别由 10:1 浓度 K^+ 、 Tl^+ 激活的 Na 泵抑制作用高度一致。

4. 0.5% 酒精对由 5mM K^+ 和 0.5mM Tl^+ 激活的 Na 泵活性影响(见表 1)

表 1 0.5% 酒精对由 5mM K^+ 及 0.5mM Tl^+ 激活 Na 泵抑制率 $M \pm SD$ ^[3]

激活 Na 泵离子	Na 泵活性 $\mu\text{mole Pi} \cdot \text{mgP}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$		0.5% 酒精对 Na 泵活性抑制率%
	对照	加 0.5% 酒精	
$[K^+] 5\text{mM}$	0.127 ± 0.033	0.06 ± 0.0159	$51.23 \pm 0.75\%$
$[Tl^+] 0.5\text{mM}$	0.090 ± 0.034	0.043 ± 0.018	$52.2 \pm 1.5\%$

表 1 的结果表明 0.5% 酒精对分别由 K^+ 、 Tl^+ 激活的 Na 泵抑制作用是一致的,与前人研究结果相符合^[10]。这可能是因为酒精能使 $(\text{Na}^+-\text{K}^+)\text{-ATP}$ 酶变构或能改变酶分子周围水化结构^[11]。

本研究结果有力地说明, Tl^+ 可以取代 K^+ 激活人红细胞膜 $(\text{Na}^+-\text{K}^+)\text{-ATP}$ 酶,并且在低浓度 Tl^+ 时,这种激活能力是 K^+ 的 7—10 倍。这种由 Tl^+ 激活的 $(\text{Na}^+-\text{K}^+)\text{-ATP}$ 酶在多方面和 $(\text{Na}^+-\text{K}^+)\text{-ATP}$ 酶一致。

Inturrisi, C. E. 报告 Tl^+ 对 Na 泵磷酸化中间体的作用如同 K^+ ,它导致酶磷酸化中间体的去磷酸化作用,并且 Tl^+ 对该中间体的亲和力是 K^+ 的 10 倍^[12], Tl^+ 可以取代 K^+ 而激活牛脑依赖 K^+ 的磷酸酶^[13]。 K^+ 、 Tl^+ 水化离子理化性质又高度相似^[14]。

由本文和我们以前的研究^[3],可以设想 Tl^+ 取代 K^+ 激活 Na 泵,并非是因 Tl^+ 在 Na 泵上

另有特异亲和位点,而是在于 Ti^{+} 与 K^{+} 非常类似,以致 Na 泵难以区分 K^{+} 和 Ti^{+} 。换句话说 Ti^{+} 取代 K^{+} 激活 $(Na^{+}-K^{+})-ATP$ 酶,是由于 Ti^{+} 非特异地通过和 K^{+} 同一个途径激活 $(Na^{+}-K^{+})-ATP$ 酶。但 Ti^{+} 对 $(Na^{+}-K^{+})-ATP$ 酶激活力为什么是 K^{+} 的 7—10 倍,尚有待进一步研究。

本工作承张炯、玉高栋、吴智力同志大力协助,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Gerald, M. D.: *Seminars in Nuclear Medicine*, 10 (1), 7, 1980.
- [2] Peter, A. R. et al.: *Proceedings of third world Congress of Nuclear Medicine and Biology*, Part 3, 3018, 1983.
- [3] 蒋斌,孙祺燕:《中华核医学杂志》5(1), 33, 1985.
- [4] Dodge, J. T. et al.: *Archs. Biochem. Biophys.*, 100, 119, 1963.
- [5] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951.
- [6] Lazarus, L. H. et al.: *Anal. Biochem.*, 45, 557, 1972.
- [7] Britten, J. S. et al.: *Biochim. Biophys. (Acta)*, 159, 160, 1968.
- [8] Skulskii, I. A. et al.: *Biochim. Biophys. Acta.*, 298, 702, 1973.
- [9] Bonting, S. L. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 95, 416, 1961.
- [10] Israel, Y. et al.: *J. Pharmac. Exper. Therapy*, 174 (2), 330, 1970.
- [11] 王理升:《生物化学与生物物理进展》, 5, 21, 1979.
- [12] Inturrisi, C. E.: *Biochim. Biophys. Acta*, 178, 630, 1969.
- [13] Inturrisi, C. E.: *Biochim. Biophys. Acta*, 173, 567, 1969.
- [14] Mullins, L. J. et al.: *J. Gen. Physiol.*, 43, 759, 1960.

[本文于 1984 年 6 月 25 日收到]

激光光散射法研究 DNA-阳离子络合物的生成过程*

左 集 李乃宏 杨 彦 周逸民 袁 直 韩兴华 何炳林

(南开大学化学系)

由于抗 DNA 抗体免疫化学的发展,使人们对固定化 DNA 技术发生很大兴趣。这是因为固定化 DNA 可作为抗 DNA 抗体的免疫吸附剂去治疗一些与免疫复合物有关的疾病,例如红斑狼疮、类风湿性关节炎等,而这些疾病靠传统治疗方法疗效不佳。

以免疫吸附剂治疗免疫性疾病是 Terman 在 1979 年首次试用成功^[1]。吸附剂一般是用 DNA 和二价金属离子或有机阳离子进行络合,生成不溶于水的络合物,该络合物对一些致病的抗体及抗原抗体的复合物有吸附作用。因而以二价阳离子络合并沉淀固定 DNA 的反应引起了人们的兴趣^[2]。

Schultz^[3]提出,以激光光散射方法可以快速、高灵敏度地检测免疫复合物的存在与否,检测范畴可扩展至胶体聚集体体系。Greene 也在激光光散射法研究 DNA—阳离子络合反应方

面作过工作^[4]。本文用激光光散射技术,较系统地研究了二种阳离子络合剂络合沉淀固定 DNA 反应的动力学过程及影响因素,并在实验基础上归纳出有关反应的若干规律,对高分子免疫吸附剂制备有指导意义。

实 验 方 法

实验在多功能激光光散射装置^[5]上进行。用 2 毫升安瓶作反应瓶,使用中要严格定位。反应瓶、药品及器械需要严格除尘。记录在 35° 方向上随反应进行时散射光强的变化。检测前将反应瓶用空白液调零。采用功率稳定的 He-Ne 激光器,功率 2mW。

药品:小牛胸腺 DNA(上海市牛奶公司综合厂);蓝四唑(简称 BT, BDH 分装), $Pb(NO_3)_2$

* 本文曾在 1983 年全国高分子学术论文报告会上宣读。