

全部解离出来。本文测定三种细胞匀浆液中的 DNA 含量,比文献报道的用其他方法测定的结果低,可能是由于裂解不完全所致。最好的办法是用超声波处理样品。此外每次操作条件必需一致才有可能得到较好的重现性。总之用本法直接检测细胞裂解液或组织粗匀浆液中 DNA 含量,确实是一个非常简便而可靠的微量方法值得推广。

南开大学化学系倪凤淑同志,中国医学科学院血液学研究所甘午君,蔡辉国,许静等同志及天津医学院神经病理研究所许理衍,单书宝等同志在实验仪器及材料上给予支持,特此致谢。

参 考 文 献

[1] Anamda S. P., *J. Lab. and Clinical Medicine*, **80**,

4, 1972.

- [2] Russel W. C., Newman C. and Williamson, D. H.: *Nature* (London) **253**, 461—462, 1975.
- [3] Williamson D. H., and Fennel D. J.: in *Methods in cell Biology* (Prescott. D. M. ed), Vol. **120**, 335—351. Academic Press, New York. 1975.
- [4] Cesar Labarca and Kenneth Paigen: *Anal. Biochemistry*, **102**, 344—352, 1980.
- [5] Cesarone C. F. Bolognesi C. et al.: *Anal. Biochemistry*, **100**, 188—197, 1979.
- [6] Weisblum B. and Haenssler, E.: *Chromosoma* (Berlin) **46**, 255—260, 1974.

[本文于 1984 年 8 月 18 日收到]

膜 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase 连续自动分析方法*

徐友涵 倪基德

(南开大学分子生物学研究所)

目前,膜 ATPase 的活性测定主要是利用 ATP 再生系统^[1,2],以及测定 ATP 水解所释放 Pi 的方法。比色测 Pi 的方法为 Fiske 所开创。Lacy 改用抗坏血酸作还原剂,还原磷钼酸,提高了灵敏度^[3]。通常在中止酶反应,进行 Pi 比色测定之前,使用离心或过滤去除变性的酶蛋白。Kline 将酶水解产生的 Pi 透析到还原性试剂中,以进行 Na^+ - K^+ -ATPase 的自动分析^[4]。Arnold 用表面活性剂溶解膜蛋白,省去过滤、离心或透析等步骤,进行膜 ATPase 的自动分析,具有简便、快速、灵敏度高、结果可靠等特点^[5],本文基于 Arnold 的工作,全部使用国产仪器,用于红细胞膜 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase 的分析。

材 料 与 方 法

1. 试剂

ATP (江门化工厂), Ouabain 为 Serva 公司产品,其余均为国产分析纯试剂。

2. 溶液配制

A 液: 29mM SDS, 40mM TCA

B 液: 6.9mM 钼酸铵, 0.56mM 酒石酸锶钾, 0.9M H_2SO_4

C 液: 0.114M 抗坏血酸, 20 μM KH_2PO_4 , (C 液中添加无机磷,用以减少自动分析体系中管壁对样品 Pi 的吸附与解附的影响)

3. 标准无机磷: 分析纯 KH_2PO_4 于 110℃ 烘 4 小时。

4. 钙调蛋白 (CaM) 以及膜 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase 的制备

CaM 制备按 Kakiuchi 法^[6],在 SDS-凝胶电泳上显示单一蛋白带。缺少 CaM 的红细胞膜制备按 Gietzen 方法^[7]。膜蛋白测定按 Lowry 法^[8],以牛血清白蛋白为标准。

5. 酶反应体系:

* 本工作是科学技术委员研究基金资助

Tris-顺丁烯二酸	25mM (pH 7.0)
NaCl	100mM
MgCl ₂	2mM
Ouabain	0.1mM
Mg ²⁺ -ATP	1mM
红细胞血影膜	50μg 膜蛋白/ml
游离 Ca ²⁺ 浓度	36μM

反应溶液总体积 10ml, 置于 37℃ 水浴中, 添加 ATP 以启动酶反应。

6. 自动分析装置

酶连续自动分析系统见图 1。蠕动泵为浙江国康仪器厂 WLB-78-C 型, 连续式比色计采用上海医用分析仪器厂 GD-811 型, 记录仪为上海大华仪表厂台式自动平衡记录仪, 走纸速度 4mm/分。

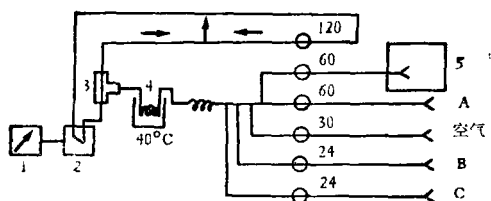


图 1 膜 ATPase 自动分析仪示意图

⊖ 表示蠕动泵 数字表示流速 (ml/h)

1. 记录仪, 2. 连续式比色计, 3. 脱气泡管 4. 水浴, 5. 酶反应液或水

反应管中的酶反应溶液由蠕动泵以 1ml/分的速度流入分析体系。A、B、C 分别代表分析溶液(成分见正文), 按一定比例混合后, 流经置于 40℃ 水浴中的螺旋管, 使钼蓝充分呈色, 再经过“脱气泡管”脱除气泡后, 进入连续比色计。

酶反应溶液由蠕动泵以 60ml/h 的速率流入分析体系, 首先与 A 溶液混合, A 液中的 TCA 使酶反应中止, 膜蛋白被 SDS 溶解。然后 B、C 溶液相继以 24ml/h 流速进入体系。同时泵入空气泡, 使溶液在管中均匀流动。上述混合液通过 40℃ 水浴, 使磷钼蓝呈色完全, 再经“脱气泡管”脱除气泡后, 进入连续比色计 (1cm 光程, 660nm)。ATP 酶促水解反应释放的无机磷引起光密度的变化由记录仪记录。

酶反应 10 分钟后, 换水清洗, 使记录谱回到基线后进行下一个样品的测定。

结果与讨论

1. 无机磷标准曲线: 由于比色测定的 OD 值正比于记录仪的反响高度, 样品为标准无机磷时, 记录曲线如图 3(A), 其高度 H 与无机磷浓度之间有良好的线性关系 (图 2)。

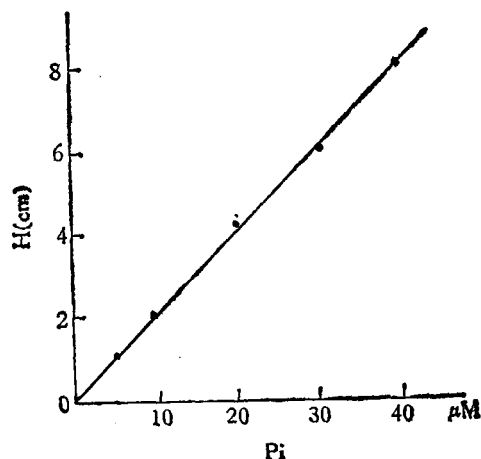


图 2 无机磷标准曲线

2. 反应体系不存在酶时, 记录谱如图 3(B), 其高度反映在 1mM ATP 溶液中所含游离 Pi 的浓度 (约 18μM), ATP 因受酸性钼酸催化的非酶促水解在 10 分钟内可忽略不计。

3. 酶活性测定 红细胞膜 Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase 催化的水解反应记录的典型图谱如图 3(C、D), 高度 H₂ 反映 ATP 所含的无机磷, 而斜高 H₁ 反映酶反应 10 分钟释放的 Pi 的数量。因此这一段斜率代表酶水解 ATP 的速率, 实验表明, 反应进行 30 分钟, 酶反应仍处于稳态。

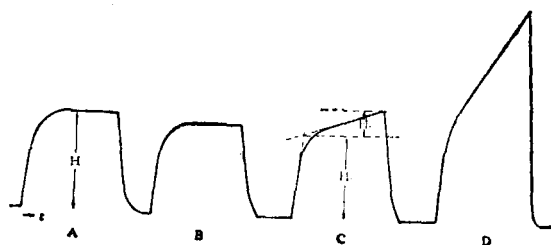


图 3

(A) 20μM 标准无机磷 (B) 反应体系不存在酶 (C) 缺少 CaM 时酶反应(基本酶活): 0.7μM Pi/min (D) 存在 0.4μg/ml CaM 时, 酶活力为基本活力的 4 倍以上

4. 钙调蛋白 (CaM) 对膜 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase 的活化作用 红细胞膜 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase 受 CaM 的调节, 图 3(C)(D) 分别为缺少 CaM 与存在 $0.4\mu\text{g/ml}$ CaM 时的情况, 由斜高可计算缺少 CaM 时的酶活(基本酶活) $0.7\mu\text{M Pi/min}$, 酶浓度为 $50\mu\text{g}$ 膜蛋白/ml, 比活为 14n mole/mg 蛋白 $\cdot \text{min}$, 存在 CaM 时的酶活为 $3.0\mu\text{M Pi/min}$, 比活为 60n mole/mg 蛋白 $\cdot \text{min}$, 以 CaM 完全活化的酶活为 100% 计, CaM 浓度与酶活的关系如图 4 所示。7nM 的 CaM 可使酶达到半最大活化, CaM 对膜 Ca 泵的调节具有显著的生理意义, 在正常胞内低 Ca^{2+} 浓度时 ($\sim 10^{-7}\text{M}$), CaM 不与膜 Ca 泵结合, Ca 泵处于低活性状态, 但也泵出少量的 Ca^{2+} , 以抵销正常被动渗漏进胞内的 Ca^{2+} [9]。当某些因素引起胞内 Ca^{2+} 浓度升高后, $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{CaM}$ 复合物与

Ca 泵结合, 使之跃迁为高活性状态, Ca 泵将以最大效率泵出胞内过多的 Ca^{2+} , 以维持胞内 Ca^{2+} 的稳恒水平 (Homeostasis)

本文叙述的膜 ATPase 自动分析装置, 有以下几个特点: 1) 可以连续测定酶反应中释放的无机磷, 因此可准确计算酶反应速率。2) 通常用 Fiske 及其改进法测定酶反应释放的无机磷时, 酸性钼酸催化的 ATP 非酶促水解将干扰酶反应的测定, 而在自动连续测定体系中, 非酶促水解产生的 Pi 可以忽略不计 (见图 3, B)。3) 与使用 ATP 再生系统分析 ATPase 相比, 它无需高纯 ATP 和复杂的外加酶系 (丙酮酸激酶, 乳酸脱氢酶等), 因此是一种简便、可行的分析方法。这种装置原则上也适用于其它水解产生 Pi 的酶的测定, 如 Na^{+} - K^{+} -ATPase, 磷酸酶等。

承张筠同志熟练的技术协助, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Pullman, M. E. et al: *J. Biol. Chem.*, 235, 3322, 1960.
- [2] 李生广等: 《生物化学与生物物理进展》, 6, 70, 1983.
- [3] Lacy, J. *Methods in Enzymology*, vol. 10, 385, 1967.
- [4] Kline, M. H. et al: *Analyt. Biochem.*, 23, 97,
- [5] Arnold, A. et al: *Analyt. Biochem.*, 71, 209, 1976.
- [6] Kakiuchi, S. et al: *FEBS Letters*, 126, 203, 1981.
- [7] Gietzen, K. et al: *Biochem. J.*, 207, 155, 1982.
- [8] Lowry, O. H. et al: *J. Biol. Chem.*, 195, 265, 1951.
- [9] Roufogalis, B.: *Canad. J. Physiol. Pharmacol.*, 57, 1331, 1979.

[本文于 1984 年 9 月 8 日收到]

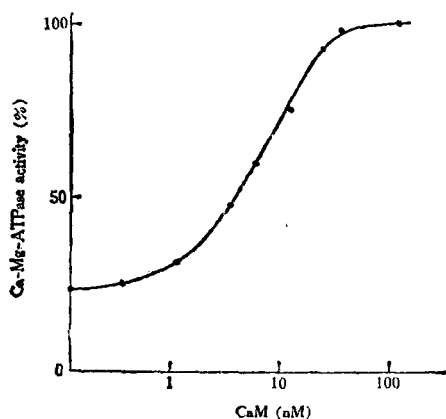


图 4 CaM 对红细胞膜 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase 的活化
酶反应溶液的成分参见正文, $0.4\mu\text{g/ml}$ CaM 活化的酶
活计为 100%, 酶半最大活化要求 7nM 的 CaM。

高纯度 α_1 -抗胰蛋白酶的提取、抗血清的 制备及其火箭免疫电泳测定

顾学范 陈瑞冠
(上海市儿科研究所)

齐 家 仪
(上海第二医学院附属新华医院)

α_1 -抗胰蛋白酶 (α_1 -AT) 是肝细胞分泌的一种糖蛋白, 是血浆蛋白电泳 α_1 球蛋白的主要

成份。它能抑制多种蛋白酶, 如胰蛋白酶、糜蛋白酶、弹性蛋白酶、纤维蛋白溶酶等的活性。