

人血 ATP 的生物发光测定

王正昌 黄 健 吴自娟

(上海市气功研究所)

生物发光法测定 ATP 具有微量、简单、快速、灵敏及专一性强等特点^[1], 我们用以测定了人血液中的 ATP 含量, 现简略介绍如下。

ml 荧光素-荧光素酶缓冲液, 立刻记录发光曲线, 以发光高峰为发光强度^[2]。

结果与讨论

材 料 与 方 法

一、试剂

1. 10m mol/L Tris-HCl 缓冲液, pH 7.6。
2. 荧光素-荧光素酶缓冲液 [50m mol/L 甘氨酸、10 m mol/L 硫酸镁、1m mol/L EDTA、荧光素酶 (上海植物生理研究所提供, 内含荧光素) 3mg/ml 及 BSA 1 mg/ml] pH 7.6。
3. 标准 ATP (美国 SIGMA 产品)。

二、仪器 FG-300 型发光光度计 (上海植物生理研究所产品)

三、样品制备

无名指采血 20 μ l, 即刻注入预冷的内含 10m mol/L Tris-HCl 缓冲液 0.5ml 的试管中, 摇匀, 立刻在沸水浴中煮沸 5 分钟, 冷却, 3000 r/min 离心 10 分钟, 取上清液备用。

四、测量

吸取 0.2 ml 上述制备的滤液于 0.5 cm 光径的比色皿内, 放入发光光度计反应暗室, 然后注入 0.8

一、标准曲线

测定结果如图 1 所示, 5×10^{-8} — 5×10^{-4} mol/L 之间呈线性关系。据测定结果人血 ATP 含量一般在 10^{-4} mol/L 数量级。

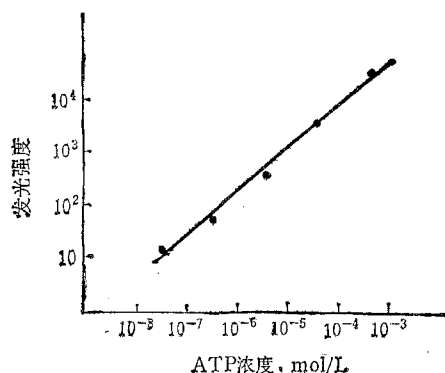


图 1 标准曲线

表 1 样品回收率(%)

编 号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	$\bar{x} \pm S. D.$
回 收	107	82	86	97	112	81	117	110	73	75	94 ± 15

表 2 复管变异

编 号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	$\bar{x} \pm S. D.$
发光强度	38.5	31.5	34	38	38.5	36.5	31.5	35	33.5	31.5	34.9 ± 2.9

发光强度单位: 格

二、回收

加一定量的标准 ATP 于 20 μ l 全血中, 同血样处理, 10 次测定结果见表 1, 平均回收率 $94 \pm 15\%$ 。

三、复管变异

用同一份 EDTA 抗凝血分成 10 管, 每管 20 μ l, 同上述样品处理, 测定结果见表 2, 平均 34.9 ± 2.9

(格)。

四、血中 ATP 的来源

先从 EDTA 抗凝全血中取 20 μ l, 作全血组, 剩下 EDTA 抗凝全血用低速离心, 分离血球与血浆, 从血球和血浆中各取 20 μ l, 分别作血球组和血浆组。血球组用生理盐水洗三次, 用前述样品处理方法处理, 测

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)

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, 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^[1]。将洗净的心肌组织 (约 10g 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×g) 10 分钟, 弃去沉淀, 取上清液离心 (9000×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℃ 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^[2]。在

别 [男性为 $1.86 \pm 1.78 \times 10^{-9}$ mol/g ($n = 20$); 女性为 $1.80 \pm 2.24 \times 10^{-9}$ mol/g ($n = 22$)。色素的测定是取 20μl 手指血按张庭卿等^[3]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^[2]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]

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℃ 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℃	1.7	1.8	0.6
2	0℃	1.6	1.8	0.5
3	4℃	2.6	1.4	0.2

表中 ATP 浓度单位: $\times 10^{-4}$ 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 $1.84 \pm 2.02 \times 10^{-9}$ mol/g 色素, 男女之间无明显差