

微量量热法测定 ATP 酶的比活

胡粹青 刘云娜

(中国科学院化学研究所)

王苏民 林治焕

(中国科学院生物物理研究所)

应用微量量热法研究酶的活性,是近年发展起来的一种新方法^[1,2,3]。在国内,至今尚未见到有关报道。量热法作为一种热力学研究方法得以应用于研究酶的活性,主要是基于酶与底物反应的专一性上。另一特点是:不需要光学透明性的样品,即对于酶的悬浮液体系亦能直接进行测定。我们应用流动微量量热计测定了 ATP 酶的比活,并与分光光度法测定的结果作了比较,数据相当一致。

材料与仪器

猪心线粒体可溶性腺三磷酶(F_1): 制备与提纯方法同[4]。 F_1 溶于 TEA (Tris-EDTA-ATP pH 7.4) 溶液中,在室温下保存,两天之内活性不变。Folin-酚试剂法测得酶蛋白的浓度为 1.6 毫克/毫升。

$Na_2H_2ATP \cdot 2H_2O$ 上海生物化学研究所东风生化试剂厂出品,纯度: 90% 以上。

缓冲溶液 Tris-顺丁烯二酸溶液, 42 mM, pH 8.0。

反应液 A 含 12 mM ATP、5.0 mM $Mg \cdot SO_4$ 的 Tris-顺丁烯二酸缓冲溶液, pH 8.0。

反应液 B F_1 (浓度为 $10^{-8} M$) 缓冲溶液。

以上溶液均用二次重蒸水配制。

量热计: 瑞典 LKB 2107 型流动式微量量热计,配以 Keithley 150 B 型微伏放大器及 LKB BD 12 型记录仪。量热计的基本结构如图 1 所示:^[5,6]

实验时,一个检测计内输入反应液体系,另一个检测计作为参考。反应热速率(dQ/dt)与安装在一对检测计周围热电堆的电位差信号 V

呈当量关系。经电功率标定,本仪器的校正常数 K 为 0.059 微伏/微瓦。信号 V 经过放大,连续记录下来,得到热谱图。

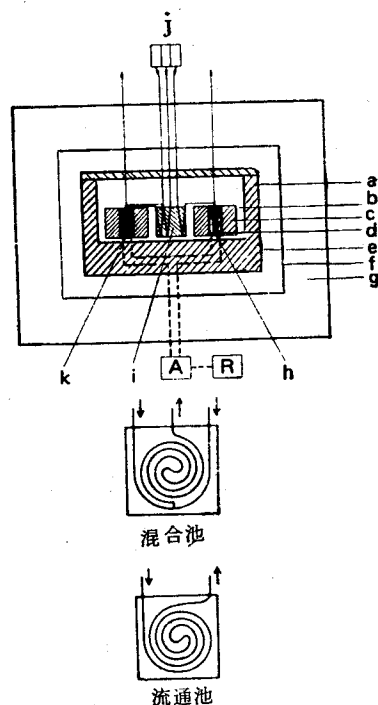


图 1

图中: (a) 主热池, (b) 空气隔层, (c) 铅块, (d) 半导体热电堆, (e) 隔热层, (f) 不锈钢外层, (g) 空气恒温槽, (h) 流通式检测计, (i) 热交换器, (j) 蠕动泵, (k) 混合式检测计, (A) 放大器, (R): 记录仪

量热计测量条件: 恒温槽温度: $30^\circ \pm 0.02^\circ C$, 反应液 A、B 输入前的温度: $28^\circ \pm 0.2^\circ C$, 混合式热流检测计, 反应液流速: 管 1、2 均为 9 毫升/小时, 放大器量程: 10 微伏, 记录仪: 1 毫米相当于 0.05 微伏。

酶比活测定方法

如图 2 所示: 以一定流速经管道 1 输入反

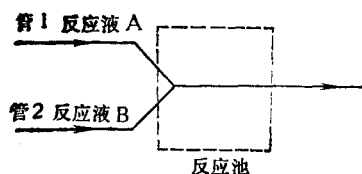


图 2

应液 A, 在管道 2 中则交替地以同样流速输入缓冲溶液或反应液 B。当反应液 A 与缓冲溶液在反应池中混合并反应, 在热谱图 (见图 3) 上可得到一基线。当管道 2 中改为输入反应液 B 时, 基线则开始偏移。七、八分钟后呈一稳定的偏移值。当再改为输入缓冲溶液后, 热谱图又回复到基线。

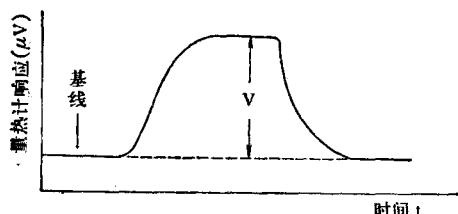


图 3

热谱图上基线记录的量热计响应是为反应液 A 中 ATP、MgSO₄ 在池中混合过程中的稀释热速率, 而反应液 A 与 B 反应时, 测量的 $\frac{dQ}{dt}$ 除上述稀释热效应外, 还包括: (1) ATP 水解反应热速率。(2) Tris 的质子化反应热速率以及 (3) F₁ 在反应液 A 中的稀释热速率 (此项热效应由于 F₁ 浓度很小, 可忽略不计) 等。A 与 B 反应的量热计响应与基线响应的差值, 即图 3 中的 V, 是为 (1)、(2) 两项的热速率。(1) 项直接与酶的活性有关, 而 (2) 项则与 (1) 项呈化学当量关系。



$\Delta H_1 + \Delta H_2$ 等于 -16.2 千卡/克分子^[7]。

其中 ΔH_2 相当大, 为 ΔH_1 的 2.5 倍, 因此采用 Tris 缓冲溶液, 有助于提高 F₁ 比活测量的灵敏

度, 犹如起到“化学放大”的作用。

从热谱图上得到 V 值, 加之校正常数 K, 即能计算 F₁ 的比活。计算方法如下:

比活 (微克分子 P_i/毫克蛋白·分)

$$\begin{aligned} &= \frac{V \times \frac{1}{K} \times 60}{F_1 \text{ 毫克重量} \times (\Delta H_1 + \Delta H_2) \times 10^3 \times 4.1840} \\ &= 1.50 \times 10^{-2} \times \frac{V}{F_1 \text{ 毫克重量}} \end{aligned}$$

F₁ 毫克重量 = 反应液 B 中 F₁ 浓度

$$\begin{aligned} &\times \frac{\text{反应液 B 流速}}{\text{反应液 A 流速} + \text{反应液 B 流速}} \\ &\times \text{反应池体积} \end{aligned}$$

混合式检测计反应池的体积为 0.5 毫升。

结果与讨论

量热法测定酶的比活, 一般采用流通式检测计^[1,2,3]。但对于反应速率快的体系, 如 F₁ 催化 ATP 水解反应则不适用。因此, 我们试用了混合式检测计。但必须满足以下两条件: (1) 呈表观零级反应。(2) 酶与底物混合后需瞬时达到稳态反应。否则, 两者均能使量热计响应偏低而不宜作酶比活的定量测试。对于前一条条件的满足, 需要底物的浓度足够大, 遵循 Michaelis-Menten 方程式, 此时酶的催化反应速率 $\frac{dP}{dt} = Ke$, e 为酶的浓度 (或活性)。即 e 固定时, 反应速率为一常数, 与底物浓度的变化无关。我们选择了 ATP 的浓度为 6 mM (在反应池混合后的浓度), 并在一定 F₁ 浓度范围内进行量热实验。从图 4 可以看出: 量热计响应 V 与 F₁ 浓度 e 成线性关系, 说明在此底物与 F₁ 的浓度下, 反应以表观零级进行。对于能否满足后一条件, 我们采取改变溶液流经反应池内的保留时间 τ

$$\left(\tau = \frac{\text{反应池体积}}{\text{反应液 A 流速} + \text{反应液 B 流速}} \right)$$

的方法进行检查, 其结果如表 1 所示: 相同浓度的 F₁ 溶液, 当 τ 在 1—1.7 分之间, 量热计响应 V 保持不变, 说明 F₁ 与底物混合后很快到达稳态反应, 而不影响量热的准确性。与文献报

道^[8] F_1 催化 ATP 水解反应的稳态前期 (Presteady state) 仅数十毫秒是一致的。表 1 的结果

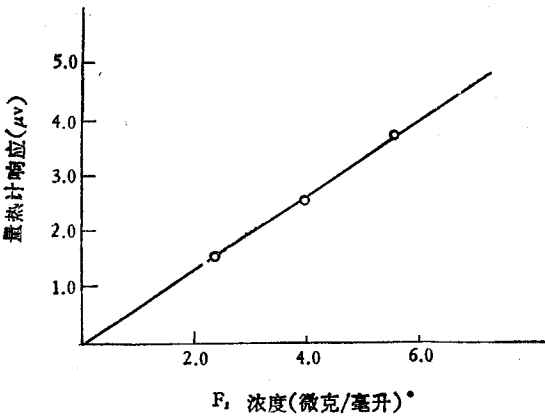


图 4

亦说明,在此保留时间范围内,产物 ADP 的浓度较小,对 F_1 活性的抑制尚不明显。

表 1 反应稳态前期影响的定性试验

反应池中 F_1 浓度 (微克/毫升)	溶液总流速 (毫升/小时)	τ (分)	V (微伏)
3.2 4.8	26	1.2	1.8 2.9
3.2 4.8	18	1.7	1.7 2.8

从表 2 可以看出,微量量热法测定酶比活,具有较好的测量精密性。以上结果与用分光光度法^[9]测定的 F_1 比活值 42 比较,相当一致。

表 2 F_1 比活的测定

反应液 B 中 F_1 浓度 (毫克/毫升)	F_1 重量 (毫克)	V (微伏)	比活 微克分子 P_i / 毫克蛋白·分
5.6×10^{-3}	1.4×10^{-3}	3.60	38.6
4.0×10^{-3}	1.0×10^{-3}	2.55	38.3
2.4×10^{-3}	0.6×10^{-3}	1.55	38.8
平均比活			38.6 ± 0.2

参 考 文 献

[1] Monk, P. et al.: *Acta Chemica Scandinavica* 23, 29, 1969.
[2] Beezer, A. E. et al.: *Sci. Tools* 19 (1), 13, 1972.
[3] Beezer, A. E.: *Biochem. Soc. Trans* 4 (4), 570, 1976.
[4] 林治焕等:《生物化学与生物物理进展》1981 年,第 5 期,第 58 页。
[5] Monk, P. et al.: *Acta Chem. Scan.* 22, 1840, 1968.

(下转第 25 页)

一种快速显示姐妹染色单体差别染色法

陈 采 琴 樊 蓉

(中国科学院生物物理研究所)

近年来,应用 5-溴脱氧尿苷 (BUdR) 建立了各种姐妹染色单体差别 (SCD) 染色方法,并已广泛用于细胞周期动力学、DNA 复制、损伤与修复以及检测各种致突变物和致癌物对染色体作用等方面的研究。

显示 SCD 的方法有多种,大致分为两种类型: 1. B-浅 SCD: 细胞在 DNA 二个复制周期内与 5-溴脱氧尿苷 (BUdR) 接触,当一个染色单体的二股 DNA 链均被 BUdR 所替换 (BB) 为浅色,如果染色单体仅有一股 DNA 链被 BUdR 所代替 (BT) 则为深色。在 DNA 经过三个复制周期时,只有 1/4 染色单体的一股

DNA 链不含 BUdR (BT),则表现为深色,3/4 的单体的二股 DNA 链全部含有 BUdR (BB) 表现为浅色^[1-3]。

2. B-深 SCD 与上述相反, BB 染色单体为深色,而 BT 染色单体为浅色^[4-5]。

我们参照 Takayuma S.^[6] 的工作 (1980) 用人外周血白细胞作为材料,建立一种快速、简便而稳定的 B-深 SCD 染色方法。其操作程序如下:

1. 细胞培养 在开始时即加入 BUdR, 其最终浓度为 10 微克/每毫升培养液,避光培养 72 小时,在中止培养前 4 小时,加入秋水仙素。

彼此之间不做相对运动,环的边界就“消失”了。但是只要图形相对于背景运动,或者以不同的频率振荡,平均的抑制项就在穿过交界时消失,也仅仅在穿过交界时消失。

上述的 Reichardt 等的实验都证明了图 9 中的 b 与 c 是符合的。Reichardt 等^[1]的进一步实验则证明了 b 符合蝇视觉系统的实际,它的独立的运动检测器对运动方向不敏感,但总的反应却是有方向性的。

5. 非线性相互作用的意义

生物网络的定量分析揭示了兴奋与抑制在空间的相互作用是神经系统感觉信息处理的基本原理。在空间分布的信息处理系统中,非线性性的相互作用是非常重要的。非线性的侧抑制的信息加工能力比线性的大得多。因为线性系统遵循叠加原理,而非线性的相互作用,对于由一些简单特征构成的一定组合,具有高度选择性。举例说,加工听觉信息的非线性系统只有谱成分的适当组合出现时,才能引起系统的反应,具有“交响”效果。而线性系统对于其中一个成分出现时就会有反应,而不管其他成分是否存在^[7]。所以,只有在非线性系统中,对于信息的处理才能实现从量变到质变的飞跃。当然这种转变是有代价的,那就是必须对所接收的信息进行筛选与压缩。人们只要想一想我们周围世界的无比巨大的信息量,对于任何一个生物信息系统,都有一个数据压缩过程。生物信息系统的信息处理方式照顾到了两个方面:一方面,为了生存竞争而需要大的信息量,另一方面,为提高效率而需要较低的最必要的信息量。所以,从形式上可以证明,非线性的相互作用是一系列的“与”门连结在一起的逻辑网络^[8,9]。物体-背景相区别的效应是非线性的,没有任何一种线性滤波可以完成这个功能。

一个空间图形可以表示为“基本”元素——如空间频率的集合。如果一个信息处理系统遵循空间叠加原理,那么每个这样的“元素”就可以看作是一个“特征”,一旦知道了每一个基本“特征”引起的反应,就会了解整个系统的输出。但是,侧抑制的非线性作用将改变这种情况,相互作用的空间范围及结构将确定一些新的更为“复杂”的特征。所以,图形的“基本”元素构成的简单特征通过非线性相互作用而“胶”在一起。而只有在这个非线性相互作用之外,二个复杂的特征又变成了互相独立的。这样,非线性的侧相互作用确定着一图形可分解而成的“特征”。

愈来愈多的人们认为,“抑制”与“兴奋”的非线性相互作用可能是不同的生物信息系统的基本原理。

参 考 文 献

- [1] Reichardt, W. et al.: *Biol. Cybernetics*, **35**, 81, 1979.
- [2] Poggio, T. et al.: *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **40**, 635, 1976.
- [3] Poggio, T. et al.: *Kybernetik*, **12**, 185, 1973b.
- [4] Poggio, T. et al.: *Q. Rev. Biophys.*, **9**, 377, 1976.
- [5] Reichardt, W.: *Theoretical Approaches to Complex Systems* (Ed. by Heim, R and Palm, G), 117, 1978.
- [6] Hartline, H. K.: *Handbook of sensory Physiology*, vol. VII (2) (ed. M. G. F. Fuortes), Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, 381, 1972.
- [7] Wilson, J. P.: *The Neurosciences, Third Study Program* (ed. F. O. Schmitt and F. G. Worden), Cambridge, MIT Press, 1974.
- [8] Poggio, T.: *Atti della prima riunione Scientifica* (Campgli, 1973), Soc. Ital. Biofis. pura e Applicata 217, 1974.
- [9] Poggio, T.: *Biokybernetik*, Band V (ed. H. Drischel and p. Dettmar) Jena: VEB Gustav Fischer Verlag 235, 1975.

[本文于 1981 年 1 月 28 日收到]

(上接第 61 页)

- [6] Spink, C. et al.: *Methods Biochem. Anal.* **23**, 1, 1976.
- [7] Podolsky, R. J. et al.: *Biol. Chem.* **218**, 945, 1956.
- [8] Roveri, O. A. et al.: *Biochimica et Biophysica*

Acta **589**, 241, 1980.

- [9] Senior, A. E. et al.: *Arch. Biochem. and Biophys.* **140**, 257, 1970.

[本文于 1981 年 6 月 30 日收到]