

荧光素浓度对于用荧光素酶测定 ATP 含量的影响

王维光 顾俭本

(中国科学院上海植物生理研究所)

提 要

在粗荧光素酶液中加入合成的荧光素和不加荧光素, 观察其发光反应动力学, 反应系统中外加荧光素后, 发光强度明显增加, 以适当低浓度的荧光素酶液的发光强度增加最大。在室温(20℃)下, 不同贮藏时间的荧光素酶液, 其反应活性随贮藏时间的延长而下降。外加荧光素后, 反应活性可以恢复并达到最大后保持恒定。在-15℃贮藏一年后的荧光素酶粉剂, 反应活性下降, 外加荧光素后, 反应活性可以提高到原来的水平。

荧光素酶催化的发光反应是一个双底物的反应, 这两个底物分别是荧光素和 ATP。当用荧光素酶法测定 ATP 时, 反应系统中的荧光素必须是过量的, 这样关于限制底物 ATP 浓度的反应速度才是一级反应, 发光强度与 ATP 浓度呈线性关系。荧光素酶制剂^[1] (包含荧光素) 已被广泛地应用于 ATP 及有关酶活性和代谢物浓度^[2-7] 的定量测定。荧光素酶活性的高低直接影响反应的灵敏度, 当荧光素酶粉剂在-15℃贮藏一年, 或荧光素酶液在 20℃ 下放置 48 小时, 酶反应活性明显下降, 本文对这一问题作了研究。

材 料 和 方 法

荧光素酶 按王维光^[1] 方法制备, 用 50mM 甘氨酸甘氨酸, pH7.8, 内含 1mM EDTA, 10mM MgSO₄, 1mg 牛血清蛋白 ml⁻¹ 的缓冲液配制。

荧光素 称取化学合成的荧光素 (sigma), 用 20mM Tris pH7.8 缓冲液配制成 10μgml⁻¹ 和 100μgml⁻¹ 两种浓度溶液。

ATP 标准液 称取纯 ATP (sigma) 用 20mM Tris pH7.8 缓冲液配成 5×10^{-9} mole ml⁻¹, 5×10^{-10} mole ml⁻¹... 5×10^{-14} mole ml⁻¹

的溶液。

测试仪器 发光光度计 FG-300 型 (中国科学院上海植物生理研究所制造)

测试方法 吸取 0.2ml ATP 标准液于 0.5cm 光径的 721 型比色杯, 再加一定量的荧光素溶液或不加荧光素溶液, 比色杯放入发光光度计暗室, 然后注射 0.8ml 荧光素酶液, 立刻记录发光曲线, 以发光峰高为发光强度。

结 果

一、发光反应活性与酶液存放时间的关系

以荧光素酶的浓度为 3mg ml⁻¹*, 在室温下(20℃) 存放, ATP 浓度为 10^{-10} mole/0.2ml, 在不同时间间隔内测定发光反应, 同时测定荧光素酶液中的荧光素含量^[8], 结果见表 1, 发光强度随酶液存放时间的延长而降低, 同时荧光素的含量也在减少。

二、外加荧光素对发光反应的影响

从表 1 可知, 荧光素酶催化的发光反应的发光强度, 与酶液不同存放时间及荧光素含量有关。那么在反应系统里另外加入荧光素, 发光强度是否可以提高, 为此本文在这方面作了

* 3mgml⁻¹ 的荧光素酶浓度是测定 10^{-14} — 10^{-9} mole ATP 的最佳酶用量^[1]

表 1 发光反应活性与酶液存放时间的关系

酶液存放时间 (小时)	发光强度 (10^{-9} A)	荧光素含量 (μ g)
0	85	7.52
8	58	7.35
24	49	6.97

探讨。荧光素酶浓度为 3mgml^{-1} , ATP 浓度为 $10^{-10}\text{mole}/0.2\text{ml}$, 荧光素的加量分别为 50, 200, 500, 1000, 2000, 3000ng, 再对不同存放时间的荧光素酶液作测定, 结果见表 2, 荧光素酶液存放一定时间后, 反应活性下降, 当在反应系统中外加一定量的荧光素, 就会提高发光强度, 当发光强度达到一定值后, 保持恒定。再

表 2 外加荧光素后的发光强度变化

酶液存放 时间 (小时)	发光 强度 (10^{-9} A)	外加荧光素后的发光强度					
		50	200	500	1000	2000	3000ng
0	85	112	200	345	345		
8	58	72	120	260	345	345	
24	49	70	100	230	345	345	
30	44	60	90	200	330	345	345
48	32	44	80	136	245	345	345

以荧光素酶浓度为 1mgml^{-1} , ATP 浓度为 $10^{-10}\text{mole}/0.2\text{ml}$, 荧光素的加量也分别为 50, 200, 500, 1000, 2000, 3000ng, 测其发光反应的发光强度, 结果见图 1, 当荧光素加到 1000ng 以上时, 发光强度达到恒定, 这与表 2 的结果相一致, 说明荧光素酶液中的荧光素未达到饱和水

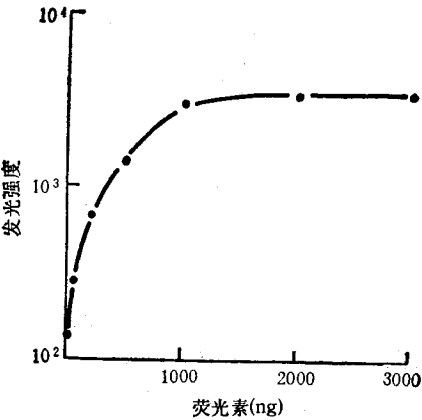


图 1 外加荧光素对发光反应的影响

平。用这种荧光素酶来定量分析 ATP 的浓度是否与发光强度呈线性, 这涉及到这种荧光素酶的实用价值。为此, 以荧光素酶浓度为 1mgml^{-1} 的酶液, 对几个数量级浓度的 ATP 标准液进行测定, 同时另外加 2000ng 荧光素, 再对几个数量级浓度的 ATP 标准液作测定, 结

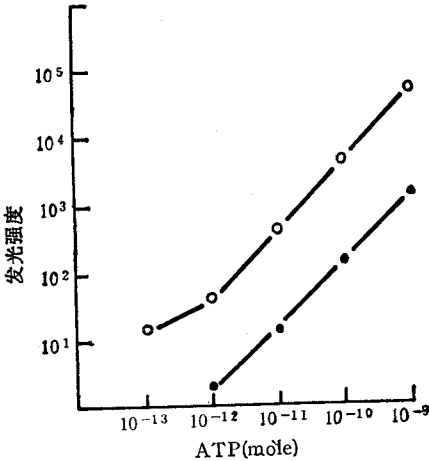


图 2 ATP 标准曲线

○—○ 加 2000ng 荧光素
●—● 不加荧光素

果见图 2。当荧光素酶液不外加荧光素时, 用来测定标准 ATP, 发光强度与 ATP 浓度呈线性, 说明这种荧光素酶中的荧光素是亚饱和的。在荧光素酶中外加 2000ng 荧光素, 使之达到饱和, 发光强度与 ATP 浓度仍呈线性, 其发光强度比不加荧光素的发光强度提高了几十倍, 而且反应灵敏度提高了一个数量级。另外, 无外加荧光素发光曲线见图 3a, 外加荧光素的

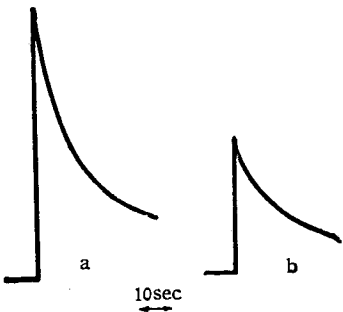


图 3 发光曲线

发光曲线见图 3b, 两个发光曲线的形状相同, 这说明外加荧光素不改变发光曲线的动力学特性。

三、不同浓度的荧光素酶外加荧光素的发光强度比较

将荧光素酶配成 1mgml^{-1} , 3mgml^{-1} , 5mgml^{-1} 三种浓度水平, ATP 浓度为 $10^{-10}\text{mole}/0.2\text{ml}$, 荧光素的加量分别为 0, 50, 200, 500ng 及将荧光素加至饱和, 测定各反应的发光强度, 结果见图 4 和表 3。说明在外加荧光素的条件下, 低浓度荧光素酶比高浓度酶催化发光反应的发光强度增加大得多, 如果将低浓度酶的荧光素加到饱和, 那么发光强度的提高更大。若将荧光素酶浓度降低至 0.5mgml^{-1} 和 0.1mgml^{-1} 时, 情况就不一样, 用其测定不同浓

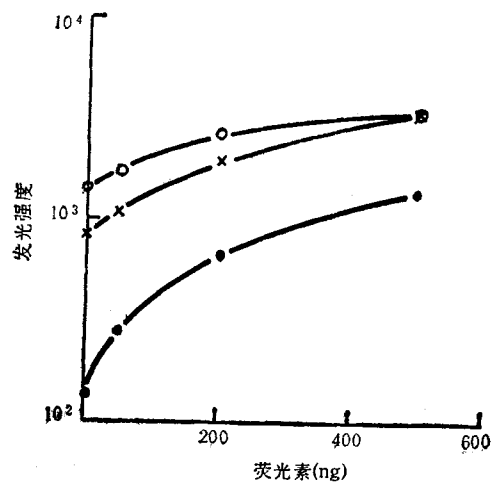


图 4 不同浓度荧光素酶外加荧光素后的发光强度变化
●—● 1mgml^{-1} ×—× 3mgml^{-1} ○—○ 5mgml^{-1}

表 3 不同浓度的荧光素酶液加 500ng 和饱和浓度荧光素后的发光强度比较

荧光素酶浓度 (mgml^{-1})	加 500ng 荧光素后 发光强度相对增加 倍数	加饱和浓度荧光素 后发光强度相对增 加倍数
1	10.3	25
3	4	4
5	2.4	2.4

度 ATP, 结果见图 5 和图 6。其测定 ATP 的最低量分别为 10^{-11} 和 10^{-9}mole , 在反应系统里外加荧光素到饱和时, 这两种浓度的荧光素酶测

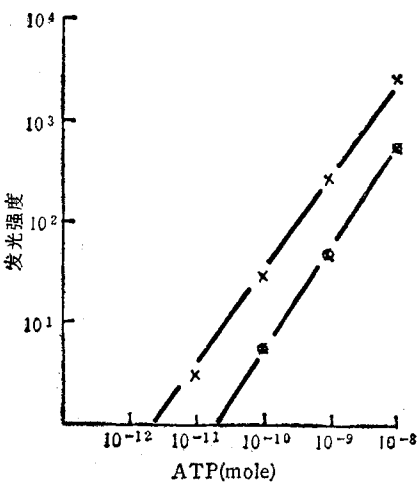


图 5 0.5mgml^{-1} 荧光素酶液测试 ATP
×—× 加荧光素 ○—○ 不加荧光素

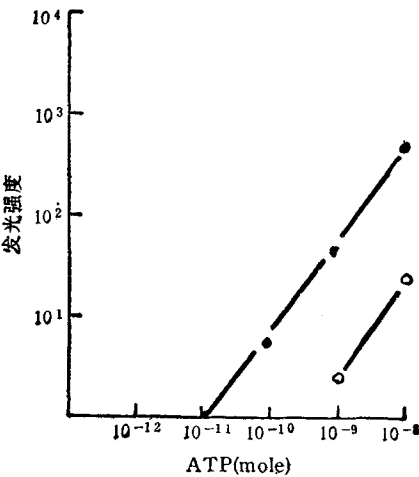


图 6 0.1mgml^{-1} 荧光素酶液测试 ATP
●—● 加荧光素 ○—○ 不加荧光素

定 ATP 的最低量分别接近 10^{-12} 和 10^{-11}mole 。

四、贮放一年的荧光素酶制剂的反应活性变化

将贮存 (-15°C) 一年的荧光素酶制剂配成 3mgml^{-1} 的浓度, 在每毫升酶液中外加 1000ng 或不加荧光素, 分别以这两种酶液去测定不同浓度的 ATP 标准液, 结果见图 7。贮存一年的荧光素酶与 ATP 反应的最高灵敏度是 10^{-13}mole , 而外加荧光素到饱和后, 其发光强度可以增加十几倍, 而反应灵敏度由 10^{-13}mole ATP 增加到 10^{-14}mole ATP。

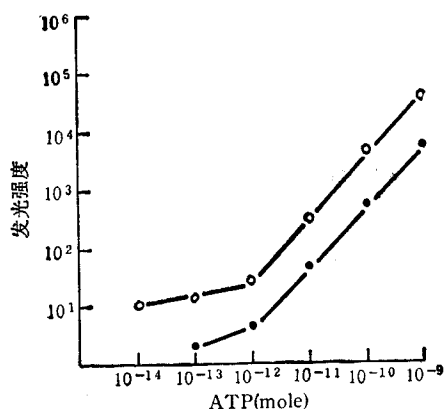
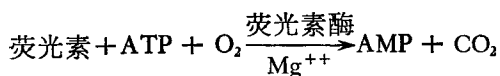


图 7 贮存一年的荧光素酶反应活性

○—○ 加荧光素 ●—● 不加荧光素

讨 论

荧光素酶催化的发光反应是:



+ hr + 氧化荧光素

反应生成物 AMP 和氧化荧光素是荧光素酶的竞争性抑制剂^[9,10], 它们抑制常数分别为 $2.4 \times 10^{-4} \text{mol/L}$ 和 $2.3 \times 10^{-7} \text{mol/L}$ 。氧化荧光素在荧光素酶的催化下象荧光素一样地发生反应, 但没有光发射^[11]。荧光素在有氧气的条件下会发生氧化^[12], 生成脱氢荧光素(氧化荧光素), 现已从萤火虫尾中分离得到了脱氢荧光素^[12]。荧光素酶配成溶液后, 在室温置放, 由于上述原因, 反应活性下降, 放置时间越长, 反应活性下

降越多。荧光素酶粉剂在制备和贮放过程中, 反应活性也可能由于以上原因下降, 但是都可以在添加荧光素后, 得到恢复并提高。作为商品的粗荧光素酶, 包括国外的产品^[13], 一般不用添加荧光素就可以用于测定 ATP 的量, 如果外加荧光素后, 可以适当减少荧光素酶的用量, 从而降低了抑制终产物的浓度、内源 ATP 和内源本底光发射, 提高了测定的灵敏度。但过分的降低荧光素酶浓度后, 使酶浓度成为影响测定 ATP 灵敏度的重要因素, 即使在反应系统中加荧光素至饱和, 发光强度的增加也是有限的。

参 考 文 献

- [1] 王维光:《植物生理学通讯》, (4), 38, 1982.
- [2] 李有则等:《实验生物学报》(13), 257, 1980.
- [3] 顾增辉、徐本美:《植物生理学通讯》, (5)55, 1983.
- [4] 林振武等:《科学通报》, (15), 945, 1983.
- [5] 许宁、刘天培:《中国药理学报》, (7), 44, 1986.
- [6] 李冰、张坤诚:《黄渤海海洋》, 2(2), 87, 1984.
- [7] 吴永强等:《植物生理学报》, 11(3), 286, 1985.
- [8] Morton, R. A. et al.: *Biochemistry*, 8, 1598, 1969.
- [9] Lundin, A.: *Clinical and Biochemical Analysis* vol. 12: *Clinical and Biochemical Luminescence*. Marcel Dekker INC, New York and Basel, 45, 1982.
- [10] Lemasters, J. J. et al.: *Biochemistry*, 16, 456, 1977.
- [11] Rhodes, W. C. et al.: *J. Biol. Chem.*, 233, 1538, 1958.
- [12] White, E. H. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 337, 1963.
- [13] Webster, J. J. et al.: *J. Appl. Biochem.*, 1, 471, 1979.

[本文于 1987 年 1 月 5 日收到]

(上接第 49 页)

结合氨基酸分析得知修饰 2 分钟时大约修饰 2—5 个羧基。这几个羧基与活性部位关系紧密, 但并不直接参与蛋白质与 Fe_4S_4 和 FeMoCo 的结合。

本实验承赵宗键同志和本校分析教室的帮助, 在此表示感谢。

参 考 文 献

- [1] 郭莉莉等:《生物化学和生物物理进展》, 6, 1982.
- [2] V. K. Shah et al.: *Biochim. Biophys. Res Comm.*, 81, 232, 1978.
- [3] 张龙翔编《生物化学实验方法和技术》北京大学, 1982.
- [4] Philip, H. Petra: *Biochemistry*, 10, 3163, 1971.

[本文于 1987 年 2 月 5 日收到]