

一种适用于眼晶状体 Na^+ , K^+ -ATPase 活性检测的改良无机磷测定法

汪俊军

(南京军区南京总医院, 生化科, 南京 210002)

朱汉民

(上海市华东医院老年医学研究所)

关键词 ATPase, 无机磷测定

目前膜 ATPase 的活性测定主要是利用 ATP 再生系统^[1], 以及测定 ATP 水解所释放的 P_i 的方法^[2]. Fiske 和 Subbarow 于 1925 年创立的用钼酸铵显色测定 P_i 的方法至今仍被广泛应用于 ATP 酶的测定^[3], 但此法的缺点是在显色过程中会造成有机磷的水解, 影响 P_i 的测定尤其是在测定角膜和细胞组织中的 ATP 酶活性过程中. Beginski 和 Zak^[4] 曾用柠檬酸盐与显色后所剩余的钼酸作用以消除有机磷水解释放的无机磷和钼酸的进一步反应, 由于加入了酸性物质使蛋白质在无机磷显色反应发生之前出现凝集. 为了便于比色, 必须离心除去沉淀, 而离心的过程又促使有机磷水解. 本文采用加入十二烷基磺酸钠(SDS)做酶反应的终止剂, 阻止 ATP 进一步水解释放 P_i , 同时因 SDS 又是蛋白增溶剂, 因而此法不仅灵敏度高, 标本量少, 同时不受有机磷和蛋白质的影响, 特别适用于检测诸如晶状体等组织内 Na^+ 、 K^+ -ATPase 酶的活性^[5,6].

材 料 和 方 法

1. 试剂 无机磷标准系上海生物制品所产品, SDS 为 Serva 公司产品, 其他试剂均为分析纯.

2. 仪器 岛津 UV-240 型分光光度计.

3. 试剂配方 A. 120g SDS 加蒸馏水溶至 1L, B. 60g 抗坏血酸用 1mol/L HCl 溶至 1L, C. 10g 钼酸铵加蒸馏水溶至 1L, D. 10g 钼酸铵、120g SDS 加蒸馏水溶至 1L, E. 20g 柠檬酸钠、20g 偏亚磷酸钠、20ml 醋酸加蒸馏水溶至 1L. (B 试剂临用前配制)

4. 测定方法 根据蛋白浓度的高低, 采用两种检测方法: 方法 1: 适用于低蛋白含量标本, B、C 试剂按 1:1 配成 BC 溶液; 方法 2: 适用于高蛋白含量标本, B、D 试剂按 1:1 配成 BD 溶液.

5. 操作步骤 取样本 50 μl 加入 A 溶液 50 μl 后充分混匀(漩涡式振荡器), 3min 后加入 BC (或 BD) 溶液

100 μl , 室温放置, 3—10min 内加入 E 溶液 150 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 10min (或室温放置 20min), 于岛津 UV-240 分光光度计 850nm 处比色 (显色液在 35 小时内色泽稳定).

结 果

1. 方法 1、2 的显色液吸收峰扫描图 见图 1, 最大吸收峰均为 850nm.

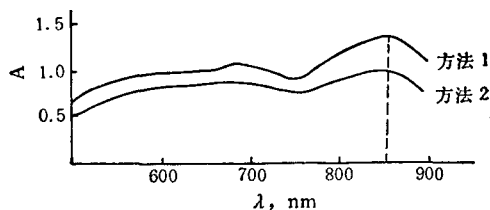


图 1 λ -A 扫描图

2. 标准曲线 两种方法在 0.05—0.6mmol/L 的无机磷浓度下, 吸光度与浓度均有良好线性关系 (图 2).

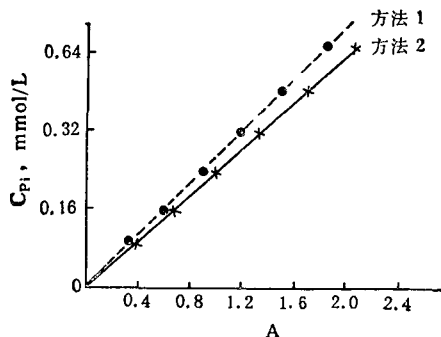


图 2 C_{P_i} -A 曲线

3. 方法考核 本法灵敏度极高, 检测下限为 10^{-7} mmol/L, 当 P_i 浓度变化 0.1mmol/L 时, $A_{850\text{nm}}$ 处 (下转第 243 页)

丙烯酸凝胶(电泳后立即转渍, 不需缓冲液平衡)平铺于硝酸纤维素膜上。用阴极缓冲液浸透的两张滤纸平铺于凝胶上,(注意各层之间勿留气泡。)将阴极电极板轻轻盖上, 接通电源, 槽盖为负极, 槽底为正极。维持恒电流, 一般 $4 \times 10\text{cm}$ 的胶用 100mA 电流。室温下转渍 120min 。(胶面积小转渍时间可相应缩短。)

免疫检测^[1]

1. 封闭 将转渍后的硝酸纤维素膜放入含 0.5% 干酪素的 TBS 溶液中(在温水浴中溶解, 离心取上清液备用), 在室温下轻轻振荡 1h 。

2. 结合 将封闭后的硝酸纤维素膜转入第 1 抗体溶液, 在室温下轻轻振荡 1h , 或置于 4°C 冰箱中过夜。

3. 洗膜 硝酸纤维素膜用 TTBS 溶液洗 10min , 再用 TBS 洗两次, 每次 10min (在摇床上轻轻振荡)。

4. 偶联第二抗体: 把洗好的硝酸纤维素膜放入第二抗体溶液中, 偶联 1h 。

5. 洗膜: 重复第三步操作。

6. 显色: 把硝酸纤维素膜转入二氨基联苯胺溶液, 加入 $5\mu\text{l}$ H_2O , (30%) 开始显色。轻轻摇动器皿, $5-6\text{min}$ 后出现棕红色染色带。显色时避免见光。显色后硝酸纤维素膜用蒸馏水冲洗, 在空气中干燥后保存。显色过快或过慢应相应改变 1 抗或 2 抗的

用量。1 抗或 2 抗溶液用过后可保存在 -20°C 冰箱, 反复使用数次, 每次可适当添加 1 抗或 2 抗溶液。显色液的量可根据硝酸纤维素膜大小增减。

结果和讨论

用半干式电转渍仪转渍后的凝胶用考马斯亮蓝染色, 以检查转渍效果, 结果表明凝胶上没有染色带, 转渍效率可达 100% 。转渍后的硝酸纤维素膜用氨基黑染色呈现出清晰的染色带。图 1 (图版 IV) 为固氮酶铁蛋白免疫转渍图, 染色带清晰, 此方法是研究固氮酶活性调节的有力工具。

参考文献

- 1 Towbin H *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979; 76:4350
- 2 Burnette W N *et al.* *Anal Biochem*, 1981; 112:195
- 3 Towbin H *et al.* *J Immunol Meth*, 1984; 72:313
- 4 北京科普仪器厂, KP-34 型电转说明书
- 5 Rio-Rad Catalogue, 1989; 161-162
- 6 Laemmli U K. *Nature*, 1970; 227:280
- 7 Hawkes R *et al.* *Anal Biochem*, 1972; 119:142

[本文于 1990 年 3 月 12 日收到,

7 月 3 日修回]

(上接第 244 页)

吸光度变化 0.08 。批内、批间平均 CV 分别为 2.3% 和 4.9% 。回收率为 $96\%-99\%$ 。

讨论

1. SDS 质量很关键, 国产 SDS 杂质多效果不理想, 需重结晶处理。进口分装的 SDS 质量可靠。

2. BC 或 BD 溶液 6 小时内稳定, 其色泽应为黄色或略绿黄色, 若转为绿色或蓝色, 表明已污染应弃去。

3. BC (或 BD) 试剂一经加入, E 试剂应在 10min 内加入, 只有加入 E 试剂(含有柠檬酸钠)才能终止显色反应。若样品中仅无机磷存在时, E 溶液加入的时间长短对显色变化影响不大; 若有机磷存在时, E 溶液加入过迟 (12min 以后), 5mmol/L ATP 就会使有机磷释放出无机磷使其与剩余的钼酸作用, 导致吸光度增加, 如图 3 所示。

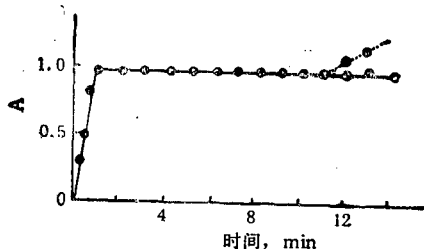


图3 t-A 曲线

4. 两种方法不受下列因素的干扰 4mmol/L

ATP、 1mol/L NaCl、 100mmol/L KCl、 1mol/L (NH_4), SO_4 , 100mmol/L Hepes, 100mmol/L Tris. 方法 1 不受 EDTA 影响, 方法 2 不受 MgCl_2 、甘油影响。

对蛋白质的耐受力:

方法 1 当蛋白浓度达 1mg/ml BSA、 12mg/ml 人血清蛋白、 2mg/ml 晶体蛋白时; 方法 2 当蛋白浓度达 20mg/ml BSA、 50mg/ml 人血清蛋白、 12mg/ml 晶体蛋白时, 检测结果均不受影响。

总之, 与使用 ATP 再生系统分析 ATPase 相比, 测定酶反应体系中释放的无机磷含量无需高纯度的 ATP 和复杂的外加酶系(丙酮酸激酶、乳酸脱氢酶等), 是一种简便的分析方法, 加上本法所特有的高灵敏度, 不受有机磷水解及高浓度蛋白质的影响, 故特别适用于蛋白含量高, ATP 酶活性低的晶体组织 Na^+ 、 K^+ -ATPase 的检测。

参考文献

- 1 Pullman M E *et al.* *J Biol Chem*, 1960; 235:3322
- 2 徐友涵, 倪基德. 生物化学与生物物理进展, 1985; (5): 57
- 3 Fiske C H, Subbarrow Y. *J Biol Chem*, 1925; 66: 357
- 4 Baginski E S *et al.* *Clin Chim Acta*, 1960; 5:834
- 5 Zigler S J *et al.* *Trends Biochem Sci*, 1981; 6:133
- 6 Chifflet S *et al.* *Analytical Biochemistry*, 1988; 168:1

[本文于 1990 年 4 月 25 日收到,

9 月 9 日修回]