

结 论

糖的对氨基苯甲酸乙酯衍生物制备简便、快速,其紫外吸收基团有利于 HPLC 分离纯化时的检测,疏水性的增加又使它具有良好的液态二次离子质谱性能,灵敏度可以和 HPLC 相匹配,具有电荷分别位于还原端及非还原端的、能解释糖链序列结构的碎片离子,离子的相对强度又能反映糖链中糖元的联接及分枝状况,是一种较理想的天然寡糖链的痕量测定方法。

参 考 文 献

1 孙册,莫汉庆编. 代谢(二). 北京: 科学出版社,1988

- 2 蒋可, Burlingame A L. 化学通报, 1990; (6): 30
- 3 Egge H. *Mass Spectrum Rev*, 1987; 6: 331
- 4 Burlingame A L, McCloskey J A eds. *Biological mass spectrometry*. Amsterdam: Elsevier, 1990
- 5 Biermann C J, McGinnis G D eds. *Analysis of carbohydrates by GLC and MS*. Boca Raton: CRC Press, 1988
- 6 Tomiya N *et al. Anal Biochem*, 1987; 163: 489
- 7 Wang W T *et al. Anal Biochem*, 1984; 141: 366
- 8 Webb J W, Jiang K *et al. Anal Biochem*, 1988; 169: 377
- 9 Byrd J C, Tarentino A L *et al. J Biol Chem*, 1982; 257: 14657
- 10 Abeth W *et al. Anal Chem*, 1982; 54: 2029

蛋白激酶 C 活力的非同位素酶解测定法*

张泽林 刘燕燕 卢波 张慧

(华西医科大学药学院, 成都 610044)

提 要

在磷脂酰丝氨酸和 Ca^{2+} 存在下,活化的蛋白激酶 C 以 ATP 为磷的供体使组蛋白 H1 磷酸化。用 Dowex-1 柱层析分离反应后的 ADP 与 ATP,再用酸性磷酸酶水解 ATP 的磷酸酯键,测定磷的含量,建立了蛋白激酶 C 活力的非同位素酶解测定法。此法可靠易行。CV = 5.2%。

关键词 蛋白激酶 C, 活力测定

蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 是一种 Ca^{2+} 和磷脂依赖性蛋白激酶, 它被第二信使二酰基甘油 (diacylglycerol, DG) 激活后, 广泛参与由肌醇脂质信使系统介导的生理生化效应^[1]。研究 PKC 的生物学特性和功能已成为近年来生物化学和分子生物学研究的重要课题^[2]。目前, 国外都采用 ^{32}P - γ -ATP 磷酸化组蛋白 H1 (histone H1) 来测定 PKC 的活力。虽然同位素法灵敏度高, 但仪器试剂昂贵, 条件要求高, 不易进行。我们建立了非同位素酶解定磷法来测定 PKC 的活力, 方法可靠

适用, 介绍如下。

1 材料与方法

1.1 材料 组蛋白 H1 (histone H1), L-磷脂酰丝氨酸 (PS), ATP, ADP, 甘油二油酸酯 (diolein), DEAE 纤维素 (DEAE-cellulose), 酸性磷酸酶 (type IV-S) 均为 Sigma 产品。二硫苏糖醇 (DTT), Dowex-1 (氯型 X-8, 200-400 目) 为 Serva 产品。苯甲基磺

* 国家自然科学基金资助项目。

收稿日期: 1991-01-24 修回日期: 1991-03-28

酰氟 (PMSF) 为 Merck 产品。Sephadex G25 (Pharmacia)。其它试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 PKC 粗酶的制备 参考文献[3]并加以改进。取新鲜或冰冻保存的猪脾脏 250g, 加 2 倍体积的缓冲液 A (20mmol/L Tris-HCl, pH7.5, 2mmol/L EDTA; 0.5mmol/L PMSF; 1mmol/L DTT), 在 Predom 匀浆器中匀浆 2min, 14000g 离心 40min, 弃去沉淀。上清液经玻璃棉过滤后, 加固体硫酸铵至 25% 饱和度, 搅拌 1h, 100000g 离心 40min。取上清液, 加固体硫酸铵至 50% 饱和度, 搅拌、离心同前步, 弃上清。沉淀溶于少量含 1mmol/L DTT 的双蒸水中, 过 Sephadex G25 柱脱盐, 收集蛋白部分, 上经缓冲液 A 预平衡的 DEAE-cellulose 柱 (15cm × 2.2cm)。先用缓冲液 A 洗柱至无蛋白流出后, 再依次用含 0.05mol/L 和 0.1mol/L NaCl 的缓冲液 A 洗脱, 收集 0.1mol/L NaCl 洗脱峰, 超滤浓缩, 分装, 4℃ 保存。以上操作均在 0—4℃ 进行。

1.2.2 PKC 活力测定 反应总体积为 1ml, 其中含下列试剂 (终浓度): 组蛋白 H 1mg, 10mmol/L $MgCl_2$, 1mmol/L $CaCl_2$, 1mmol/L ATP, diolein 5 μ g, PS 100 μ g, 25mmol/L Tris-HCl, pH7.5 及 PKC 酶液适量。对照管不加 PS 和 diolein。测定酶活力时, 先将除酶液以外的其它溶液混匀, 30℃ 预热 5min, 再加入酶液起始反应, 30℃ 水浴摇床中准确保温 10min, 立即将试管置于沸水浴中 1min 终止反应。冷却后离心除去蛋白沉淀, 上清液中加入 1ml 氯仿-甲醇 (2:1V/V), 在振荡器上振荡 1min, 抽提脂溶性物质, 2000g 离心 5min, 小心吸出水层, 再重复前步处理 1 次。水层含 ATP 和 ADP, 用 0.1mol/L NaOH 调此溶液的 pH 为 7.9, 上经双蒸水淋洗过的 Dowex-1 柱 (1ml), 控制流速为 0.5ml/min。上样毕, 分别依次用双蒸水、5mol/L 甲酸、5mol/L 甲酸-0.8mol/L 甲酸铵溶液洗柱, 每 0.5ml 收集 1 管, 于 260nm 波长测定吸光度。收集 5mol/L 甲酸-0.8mol/L 甲酸铵液的洗脱峰, 内

含未反应的 ATP。用 2.5mol/L Tris 调 pH 为 5.0, 加入酸性磷酸酶液, 使酶的用量为每管 300 μ g, $MgCl_2$ 加至 50mmol/L, 35℃ 水浴反应 30min 后, 按文献报道的方法测定磷的含量^[4]。对照管和测定管的磷含量之差为 ATP 的消耗量, 即可表示 PKC 的活力。一个酶活力单位定义为: 每分钟使组蛋白 H1 磷酸化而消耗 1nmol P_i 所需的酶量。

1.2.3 蛋白质含量测定 按 Bradford 法^[5]。

2 结 果

2.1 反应产物的分离、鉴定与回收

反应后的产物 ADP 与未反应的底物 ATP 可经 Dowex-1 柱层析而得到分离。图 1 中的峰 1 是来自酶制剂中的未与 Dowex-1 结合的其它核苷类物质^[6]。峰 2 和峰 3 分别为 ADP 和 ATP。在本实验条件下, 所用洗脱液在 2.0ml 内即可将 ATP 全部洗出。反应后所得的 ADP 和 ATP 分别与标准 ADP 和 ATP 混合做 Dowex-1 柱层析, 显示完全重迭的洗脱峰 (图 2)。用已知含量的 ATP 标准品过 Dowex-1 柱, 回收率可达 96%。

2.2 PKC 活力测定的影响因素

2.2.1 PKC 浓度对活力测定的影响 结果见图 3。本实验选择酶蛋白用量为 0.3mg 左右。

2.2.2 PKC 作用时间对活力测定的影响

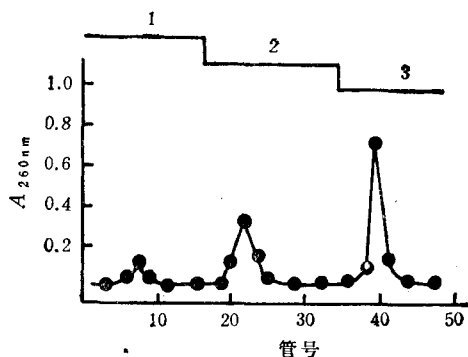


图 1 Dowex-1 柱层析洗脱曲线

洗脱液: 1: 双蒸水; 2: 5mol/L 甲酸; 3: 5mol/L 甲酸-0.8mol/L 甲酸铵

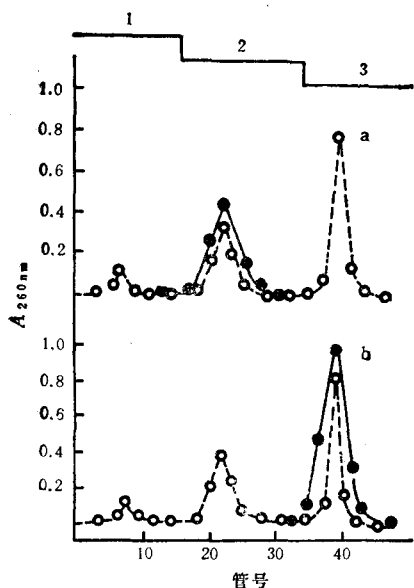


图 2 酶反应产物与标准物的 Dowex-1 柱层析比较
a. ADP; b. ATP; ——— 标准物;
○-----○ 酶反应产物

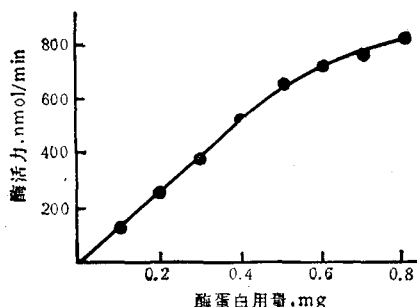


图 3 PKC 浓度对活力测定的影响

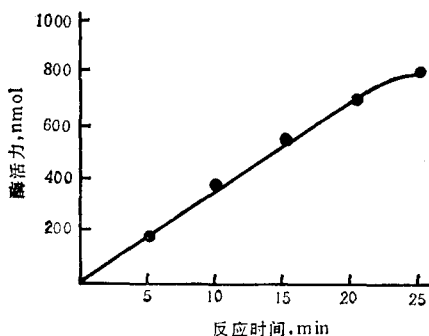


图 4 PKC 作用时间对活力测定的影响

如图 4 所示, 在 0—20min 内, PKC 活力的增加呈直线。本实验选定反应 10min。

2.2.3 酸性磷酸酶用量及作用时间对

PKC 活力测定的影响 由图 5 可见, 酸性磷酸酶的用量为每管 300 μ g 时, 水解反应进行到 25 min 时, 反应速度已不再增加。降低酶用量为每管 100 μ g 时, ATP 水解的时间超过 1h。

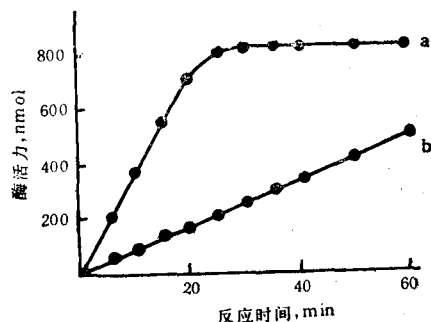


图 5 酸性磷酸酶用量及作用时间对 PKC 活力测定的影响
酸性磷酸酶用量: a. 每管 300 μ g; b. 每管 100 μ g

2.2.4 底物组蛋白 H1 和 ATP 的浓度对 PKC 活力测定的影响 在组蛋白 H1 用量为 1 mg, ATP 浓度为 1mmol/L, 30 $^{\circ}$ C 反应 10 min, PKC 用量在 10—300 μ g 时, 所得值都在反应曲线的直线部分。

2.3 重复性

同一 PKC 制剂做 9 个平行管测定其活力, $CV = 5.2\%$ 。

3 讨 论

通过测定 ATP 的消耗量可确定 PKC 的活力。但如果 PKC 制剂不纯, 混杂的某些激酶和水解酶也可消耗 ATP, 干扰 PKC 活力测定。已知 PS 和 diolein 是 PKC 的特异性激活剂, 设立对照管(不加 PS 和 diolein)可消除其它酶对 PKC 活力测定的干扰^[3]。此外, 我们用腹水瘤细胞的匀浆提取液直接测定 PKC 活力, 虽也能取得满意结果, 但对照管中的 ATP 消耗量较高, 提示匀浆提取液中含有较多的可消耗 ATP 的酶及其天然底物。因此, 采用经不同步骤纯化过的酶制剂进行活力测定, 由于纯化过程可以不同程度地去除其它消耗 ATP 的酶及其天然底物, 使对照管 ATP 消耗量减少, 测定结果更稳定, 更准确。

采用非同位素酶解定磷法测定 PKC 活力,

还必须满足两个基本条件: a. 将反应液中的产物 ADP 与底物 ATP 分开; b. 定磷时, 使 ATP 中磷的非酶促酸水解的呈色反应降到最低限度。我们选用 Dowex-1 柱层析分离 ADP 和 ATP, 分离效果很好。在 1ml 柱中 ATP 的洗脱体积稳定在 2.0ml 以内, 所得产物与标准 ATP 有完全相同的 Dowex-1 柱层析洗脱曲线(图 2)和 TLC 图谱。文献报道用 0—5mol/L 甲酸梯度洗脱, 可有效地将 AMP 和 ADP 分开^[6], 本法只需得到分离纯化的 ATP, 因此, 在实际测定酶活力时可直接用 5mol/L 甲酸把除 ATP 以外的其它核苷和核苷酸类物质洗去, 再洗脱 ATP。用酸性磷酸酶水解 ATP 时, 应保证 ATP 中的 P_i 尽可能完全水解释放。酸性磷酸酶的活力及用量对该法的影响很大, 应特别注意不同来源、不同型号的酶的适宜用量。

本实验所用酶用量为每管 300 μ g, 35 $^{\circ}$ C 反应 30 min, ATP 的 P_i 水解可达最大值(见图 5)。此外, 由于 ATP 中的磷酸酯键也可被酸性定磷液水解, 使比色过程中 A 值不断增高。如果反应液中存在未酶解的 ATP, 则其非酶促水解将严重干扰酶活力测定。我们利用柠檬酸淬灭非酶促水解产生的 P_i 的颜色反应^[4], 磷显色后, 颜色至少在 3h 内十分稳定。

参 考 文 献

- 1 Takai Y, Kishimoto A, Kawahara Y *et al. Adv Cyclic Nucleotide Res*, 1981; 14: 301
- 2 Nishizuka Y. *Nature*, 1984; 308: 693
- 3 Schatzman R C, Raynor R L, Fritz R B *et al. Biochem J*, 1983; 209: 435
- 4 徐友涵, 宋铿华. 生物化学与生物物理进展 1986;(4): 64
- 5 Bradford M M. *Anal Biochem*, 1976; 72(1): 248
- 6 Cooper T G. *J Biol Chem*, 1971; 246(2): 3451

ATP 生物发光分析测量瘤细胞药物敏感性

康 建 董宝印 姜志明 初俊杰

(沈阳军区总医院医学实验科, 沈阳 110015)

提 要

基于细胞 ATP 水平与细胞存活率成正相关, 采用生物发光技术分析瘤细胞经药物作用后胞内 ATP 水平, 可反映药物对细胞的毒性程度, 且具有简单灵敏, 快速定量的特点。

关键词 ATP, 生物发光, 瘤细胞, 药敏试验

细胞药敏试验可反映细胞经不同药物作用后细胞动力学特征, 是基础和临床细胞生物学研究中的重要手段。迄今, 常用的药敏方法主要包括集落法、同位素掺入法和染料摄入法, 但这些方法都存在一定的问题。本研究基于细胞死亡后, 胞内 ATP 经酶促催化迅速降解, 用生物发光法测量细胞内 ATP 水平以监测药物对细胞的毒性效应。用 HL₆₀ 和 SMMC₇₇₂₁ 细胞株对实验条件及影响因素进行了探讨, 现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 细胞 细胞株系人早幼粒白血病细胞 (HL₆₀), 人肝癌细胞 (SMMC₇₇₂₁)。所有细胞均于 RPMI1640 培养液 (GIBC, USA) 加 10% FCS 中生长。

1.2 抗癌药及其对瘤细胞量效曲线的测定 选用药物为丝裂霉素 C (MMC, 日本 Ko-