

水中后, 与考马斯亮蓝乙醇液混合并定容至 1000 ml, 即为显色液. 测定时, 取 4 ml 显色液与 1 ml 蛋白质浓度适中的样品混合即可比色测定.

参 考 文 献

- 1 Peterson G L. Anal Biochem, 1979; **100**: 201
- 2 Peterson G L. Methods in Enzymology, 1983; **91**: 95
- 3 郭敏亮, 姜涌明等. 食品科学, 1993; (7): 10
- 4 Guo M L, Jiang Y M. Food Chem, 1996; **55**: 373
- 5 Bradford M M. Anal Biochem, 1976; **72**: 248
- 6 Kirazov L P, Venkov L G, Kirazov E P. Anal Biochem, 1993; **208**: 44
- 7 Pande S V, Murthy M S R. Anal Biochem, 1994; **220**: 424
- 8 Bozimowski D, Artiss J D, Zak B. J Clin Chem Clin Biochem, 1985; **23**: 683
- 9 Splittgerber A G, Sohl J. Anal Biochem, 1989; **179**: 198
- 10 Read S M, Northcote D H. Anal Biochem, 1981; **116**: 53
- 11 Compton S J, Jones C G. Anal Biochem, 1985; **151**: 369
- 12 Marshall T, Williams K M. Anal Biochem, 1992; **204**: 107

Effect of Ingredients of Coomassie Brilliant Blue Color-developing Reagent on Protein Assay. Guo Minliang, Jiang Yongming (*Basic Science Division, Jiangsu Agricultural College, Yangzhou 225009, China*).

Abstract The coomassie brilliant blue (CBB) protein assay first developed by Bradford became an alternative for an ever-increasing number of researchers because of its simplicity, rapidity and being free from interference by some common laboratory reagents which have been shown to affect the lowry assay. Despite all its advantages, many problems have been encountered by researchers in using this procedure. One of the main drawbacks of this procedure is the nonlinearity which has been noted since Bradford developed the CBB-protein assay. The effect of ingredients in color-developing reagent on the absorbances at 465 nm and 595 nm, of free CBB and protein-binding CBB mixture was tested respectively. The results showed that the main factor which affects the linearity of calibration curve is H^+ concentration. A new color-developing reagent formula which consists of CBB, HCl and NaCl, may improve the nonlinearity.

Key words coomassie brilliant blue, protein assay, linearity

鼠肝抽提液中磷酸酶活性终止方法的改进

梁智群 李湘萍 杨胜远

(广西大学工业实验中心, 南宁 530004)

摘要 改进了一种分析磷酸酶活性的终止酶反应方法. 该方法通过在酶反应进行到一定程度时, 在反应混合物中加入酶反应终止液 (1 mol/L NaOH-0.2 mol/L EDTA), 从而使测定更简捷、精确.

关键词 磷酸酶, 酶活性测定, 酶反应终止液

蛋白磷酸酶是细胞内信息传递的关联物质, 生物体细胞内信息的传递是通过蛋白质的磷酸化和脱磷酸化来完成的, 而蛋白磷酸酶催化蛋白质的脱磷酸化^[1,2]. 另外, 碱性磷酸酶作为抗体标记物质, 灵敏度要比辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase) 高 10 倍以上, 已广泛用于免疫细胞组织化学和酶免疫测定, 在

抗肿瘤研究和食品工业中也有应用.

磷酸酶的活性测定常用两种方法^[3]: 一是选择适当的磷酸激酶, 由 [^{32}P] 标记 ATP 制得 ^{32}P 标记磷酸化蛋白质, 让磷酸酶作用于该种磷酸化蛋白, 测定 ^{32}P 磷酸的游离量

来确定酶活性. 这种方法特异性强, 但操作复杂、成本高, 易受环境条件限制. 二是用对硝基酚磷酸作基质, 测定酶反应生成物在 400~410 nm 吸光值的上升, 这种方法简单、快速, 得到了广泛的应用. 但这种方法常用 NaOH 终止酶反应^[4], 而 NaOH 常常干扰测定结果, 我们对终止酶反应方法进行了改进.

1 材料与方法

1.1 材料

对硝基酚磷酸 (*p*-nitrophenyl phosphate), 巯基乙醇 (2-mercaptoethanol, MCE)、苯甲磺酰氟 (phenylmethane-sulfonyl fluoride, PMSF), 美国 Sigma 出品; 碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase), 日本 MBL 公司出品; 其他为分析纯试剂.

1.2 方法

1.2.1 磷酸酶粗液提取: 参照文献 [5] 进行. 将 12 g 小白鼠肝脏加入 60 ml 的磷酸钠缓冲液 (浓度 10 mmol/L, pH 7.0, 含 0.5 mmol/L 蔗糖、5 mmol/L EDTA、1 mmol/L PMSF), 匀浆后离心 (10 000 g, 4℃, 1 h), 取上清液再离心 (55 000 g, 4℃, 1.5 h). 上清液在冰浴内用 1 mol/L 乙酸调 pH 至 5.2, 再次离心 (55 000 g, 4℃, 1.5 h), 上清液用 1 mol/L K_2HPO_4 调 pH 至 7.0, 加入硫酸铵至 60% 饱和度, 搅拌 30 min, 离心 (10 000 g, 4℃, 1 h), 沉淀用适量的 10 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (浓度 10 mmol/L, pH 7.0, 含 5 mmol/L MCE, 5% 甘油) 溶解, 并将该溶液在相同缓冲液中 4℃ 透析过夜. 离心后 (55 000 g, 4℃, 1.5 h), 其上清液作为酶粗提取液.

1.2.2 磷酸酶活性的测定: 按文献 [6] 略加改动进行. 反应混合液 1 ml 中含 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 20 mmol/L KCl, 30 mmol/L $MgCl_2$, 0.1% MCE, 5 mmol/L 对硝基酚磷酸, 以及适当酶液, 在 25℃ 下监测 400 nm 处吸光值对时间的变化量. 酶活力以每分钟在 400 nm 吸光值增加 0.010 定义为一个酶活力单位.

1.2.3 蛋白质含量的测定: 根据 Bradford 方法^[7], 应用 Bio-Rad 公司生产的蛋白质测定试剂测定样品中总蛋白, 标准蛋白为 BSA (牛血清白蛋白).

2 结 果

从 12 g 小白鼠肝脏可得到 15 ml 酶粗提液, 蛋白浓度为 20 g/L, 酶活力为 831.6 U/mg.

在终止酶反应的对比实验中, 酶粗提液和酶反应基质混合物在标准酶活性测定条件下, 反应 10 min 后, 分别加入 0.2 ml 下列各反应终止液: H_2SO_4 、HCl、NaOH (浓度均分别为 2 mol/L、1 mol/L、0.5 mol/L、0.1 mol/L)、 H_3PO_4 (浓度分别为 20%、10%、5%)、NaF (100 mmol/L) 和焦磷酸钠 (100 mmol/L). 结果在加入 NaOH 的试验组中, 均产生沉淀, 在加入 H_2SO_4 , HCl, H_3PO_4 的试验组中, 酶反应生成物在 400 nm 处颜色马上消失. 说明常用的酸、碱酶反应终止液在磷酸酶活性测定法中是不能应用的. 另外, 当加入磷酸酶失活剂 NaF、焦磷酸钠时, 也发生沉淀现象.

图 1 是酶反应 10 min 后, 在酶反应液中

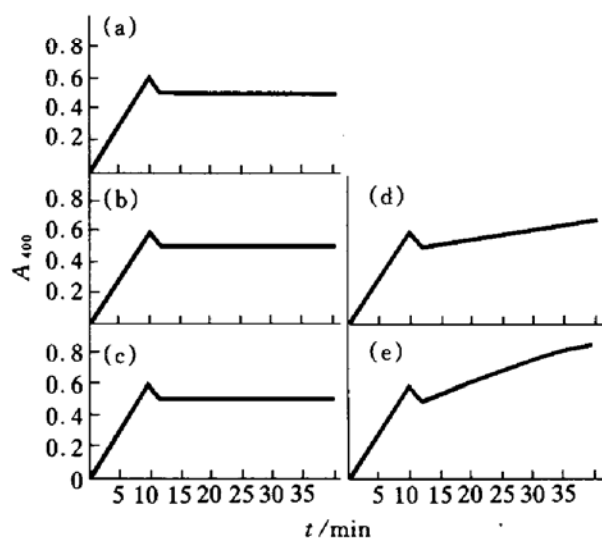


图 1 不同浓度 NaOH-0.2 mol/L EDTA 混合液对鼠肝磷酸酶粗提液活性测定的影响

(a) 2 mol/L NaOH-0.2 mol/L EDTA; (b) 1 mol/L NaOH-0.2 mol/L EDTA; (c) 0.5 mol/L NaOH-0.2 mol/L EDTA; (d) 0.1 mol/L NaOH-0.2 mol/L EDTA; (e) 0.2 mol/L EDTA.

加入不同浓度 NaOH 及 0.2 mol/L EDTA 混合液时光吸收对时间的扫描结果. 当混合液的 NaOH 浓度在 0.5 mol/L 以上时, 酶反应能被有效地停止, 并无沉淀产生; 当把 NaOH 浓度保持在 1 mol/L, 而改变 EDTA 浓度 (例如 EDTA 分别为 0.05、0.1、0.2、0.4 mol/L) 时, 结果表明: 当 EDTA 浓度为 0.05 mol/L 时, 有沉淀产生, EDTA 浓度在 0.1 mol/L 以上时, 无沉淀产生. 这些实验结果说明, 要有效地终止酶反应, 又无沉淀产生, 混合液中的 NaOH 浓度应在 0.5 mol/L 以上, EDTA 浓度应在 0.1 mol/L 以上.

我们应用 1 mol/L NaOH-0.2 mol/L EDTA 作为反应终止液, 对市售碱性磷酸酶反应生成物的稳定性进行了跟踪 (图 2). 在 0.2 mol/L EDTA 条件下, 生成物在 400 nm 的吸光值变化很快 (图 2a), 而在 1 mol/L NaOH-0.2 mol/L EDTA 条件下, 生成物在 400 nm 的吸光值很稳定, 在至少 3960 min 内, 吸光值基本没有变化 (图 2b).

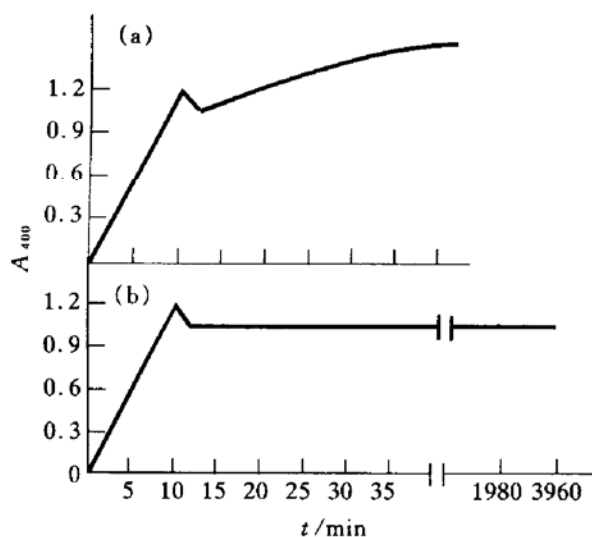


图 2 碱性磷酸酶反应生成物稳定性测定
(a) 0.2 mol/L EDTA; (b) 1 mol/L NaOH-0.2 mol/L EDTA.

3 讨 论

酶活性测定时, 常用酸、碱作为酶反应终止剂. 在用对硝基酚磷酸作基质的磷酸酶活性测定法中, 就使用了 NaOH 终止酶反应^[4]. 我们的结果表明: 在该酶活性测定中, 单独使用

酸或碱作终止剂是不适宜的. 当用酸作终止剂时, 酶反应生成的颜色迅速消失, 这是因为酸分解了酶反应生成物; 用碱作终止剂时, 酶反应液中产生沉淀, 干扰测定结果, 这是由于反应液中的 Mg^{2+} 与碱作用产生了 $Mg(OH)_2$ 沉淀所致.

本实验结果还表明: 用 NaOH-EDTA 混合液作为磷酸酶活性测定时的反应终止剂则较为理想. 一方面, 由于 EDTA 对 $Mg(OH)_2$ 的络合效应使干扰测定结果的沉淀现象得以克服, 另一方面, 又能立刻终止酶反应. 终止后的酶反应生成物也很稳定. 根据我们的结果, 混合液中 NaOH 的浓度要在 0.5 mol/L 以上, EDTA 浓度要在 0.1 mol/L 以上. 我们在后来的实验中, 把 1 mol/L NaOH-0.2 mol/L EDTA 作为酶反应终止剂, 用于以碱性磷酸酶对硝基酚磷酸的作用作为显色物质的 ELISA 方法的测定上, 证明该酶反应终止液是非常好的.

参 考 文 献

- 1 菊池九二三, 武田誠郎, 碓井裕史等. 实验医学, 1992; 10: 1225
- 2 Ingebritsen T S, Cohen P. Science, 1983; 221: 331
- 3 高井章. 实验医学, 1992; 10: 1297
- 4 蒋传葵. 工具酶的活力测定. 上海: 上海科学技术出版社, 1982: 60
- 5 Khandelwal R L, Enno T L. J Biol Chem, 1985; 260: 14335
- 6 Takai A, Mieskes G. Biochem J, 1991; 275: 233
- 7 Bradford M M. Anal Biochem, 1976; 72: 248

Improvement of Termination in the Phosphatase Activity Assay of Crude Liver Extract From Mice. Liang Zhiqun, Li Xiangping, Yang Shengyuan (The Industrial Experimental Centre of Guangxi University, Nanning 530004, China).

Abstract A phosphatase activity assay where *p*-nitrophenyl phosphate was used as substrate was improved by use of the terminating reagent containing 1 mol/L NaOH-0.2 mol/L EDTA. A better assay result was obtained.

Key words phosphatase, activity assay, enzymatic reaction terminating reagent