

图 2 DANABITC 的硅胶薄板层析图

1. 图 1 中 B(DANABITC); 2. 图 1 中 A₁ (a-杂质; b-DANABITC)。层析系统: 苯作溶剂, 展层 30 分钟。层析后经淀粉-碘化钾-氯气法显色^[7]。

结晶 605 毫克(产率为 24%)。经硅胶薄板层析鉴定为纯品(图 2 中 1)。再以热丙酮重结晶得深红色针状结晶(回收率为 50%)熔点: 125—126℃。元素分析: 分子式 C₁₉H₁₆N₄S, 计算值: N(16.87), S(9.64); 实验值: N(16.85), S(9.50)。

中间体 I、II 及产品(DANABITC)的聚酰胺膜层析 R_f 值列表如下:

样品名称	R _f 值		蒸盐酸后层析斑点颜色
	系统 I	系统 II	
中间体 I	0.48	0.67	灰 绿
中间体 II	0.80	0.75	洋 红
DANABITC	0.05	0.97	青莲蓝

系统 I: 冰乙酸:水=1:2 (V/V)。

系统 II: 甲苯:正己烷:冰乙酸=2:1:1 (V/V)。上行, 室温, (10—15 分钟)。

参照 Chang 等^[1,2]方法用此试剂标记精氨酸, 丙氨酸, 脯氨酸, 甲硫氨酸; 并测定胰岛素 B 链 N 端(苯丙氨酸)及胰岛素 N 端(苯丙氨酸和甘氨酸), 说明试剂标记效果良好。

本工作得到潘家秀和刘望夷同志指导, 诸宝珍同志承担元素分析工作, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Chang, J.Y. et al.: *J. Chromatogr.*, **132**, 303, 1977; *Biochem. J.*, **153**, 607, 1976.
- [2] Chang, J.Y. et al.: *FEBS Lett.*, **93**, 205, 1978.
- [3] Pon, C.L., et al.: *FEBS Lett.*, **101**, 157, 1979.
- [4] Wittmann-Liebold et al.: *FEBS Lett.*, **108**, 69, 1979; **108**, 75, 1979.
- [5] Jochims, J. C. et al.: *Angew. Chem. Internat. Ed.*, **6**, 174, 1967.
- [6] 刘望夷、丁敏芳、徐梅倩, 待发表。
- [7] 潘家秀等编:《蛋白质化学技术》, 科学出版社, 1962 年, 第 20 页。

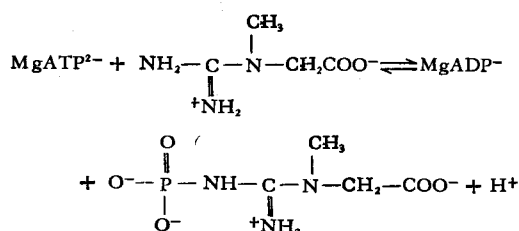
[本文于 1980 年 11 月 27 日收到]

pH-比色法测定肌酸激酶活力

姚启智 邹承鲁

(中国科学院生物物理研究所)

肌酸激酶是参与细胞能量代谢、与肌肉收缩及 ATP 的再生有直接关系的重要激酶。它催化肌酸与 ATP 间的转磷酸化反应:



1954 年 Kuby 等人^[1]首次自兔肝中纯化了此酶, 并获得结晶。此后, 对该酶的基本特性, 催化机制、亚基结构等方面开展了大量的工作^[2-4]。自从近年来发现其同功酶的变化, 是心肌梗塞、肌肉失调等疾病临床诊断的重要指标以来, 更引起了人们的广泛重视。无论是肌酸激酶结构功能的研究, 还是作为临床诊断, 都需要测定它的活力, 而目前一般文献报道的测活方法, 操作比较复杂, 费时费力, 或是要求特殊的

仪器设备,为目前我国大多数实验室所不具备。本文介绍一种适合于一般实验室条件的简易的肌酸激酶的测活方法。

肌酸激酶在催化正向反应时,随着 ATP 向肌酸上转磷酸化的同时,生成等克当量的 H^+ ,其最适 pH 为 7.5—9.0,是一宽阔的平台状^[2]。在此范围内,测定 H^+ 生成速度,可作为酶活力的指标。我们从数种 pH-指示剂中选择了百里酚蓝(thymol-blue)作为 pH 指示剂,建立了在国产分光光度计上即可进行的 pH-比色测定肌酸激酶活力的分光光度法。

材料与 方法

1. 试剂 肌酸: E. Merk 产品,进口分装;含量 99%。

ATP: Boehringer 产品;纸电泳鉴定含量 97%。

牛血清白蛋白: 生物物理所制备厂产品;含量 91%。

甘氨酸,醋酸镁等化学试剂均为北京化工厂出品;分析纯。

2. 材料 兔肌肌酸激酶的提纯是按 KubyB 法^[3]自兔骨骼肌中用乙醇分级沉淀一次重结晶。

3. 测活条件 每 3 毫升测活液中含有 40 mM 肌酸, 4mM ATP, 5mM $Mg(AC)_2$, 0.1 毫升 0.1% 百里酚蓝, 0.3 毫克牛血清白蛋白, 5 mM 甘氨酸-NaOH 缓冲液(pH9.0),最后以 0.2 M NaOH 将 pH 值精确校准至 9.0。

如用有恒温装置的双光束分光光度计测活时,样品杯与对照杯均加入同样 3 毫升测活液,保温 10 分钟后(光吸收差值应为 0),于样品杯内加入 5—20 微升酶液,立即于不同的时间间隔(15 秒或 30 秒)测定其光吸收差值(ΔA),测得 ΔA /秒后,依据 $[H^+]$ 标准曲线(图 2)计算其比活力: 比活力 = $[H^+]$ 微克当量/分。毫克蛋白。

如用国产 72 型或 751 型分光光度计测活时,对照杯内含 2 毫升测活液和 1 毫升 5 mM 甘氨酸-NaOH 缓冲液(pH9.0),样品杯为 3 毫升

测活液,以保证测活液的初始光吸收值在 0.5—0.7 范围内。向样品杯内加入 5—20 微升酶液后,于不同时间间隔(15 秒或 30 秒)测定其光吸收值,计算出 ΔA /秒后,按 $[H^+]$ 标准曲线(图 3)计算其比活力。

结 果

1. pH-指示剂的选择 用于 pH 比活法测活的指示剂应具备如下条件: 一是 pH 变色范围应在 7.5—9.0 附近;二是在酸性和碱性范围内光吸收差值较大;三是光吸收值应与 H^+ 浓度变化呈线性关系。百里酚蓝的 pK 值 9.2, pH 变色范围为 7.5—11,颜色自黄色变为蓝紫色。当在 pH11 与 pH7 时,波长为 597 毫微米的光吸收差值最大(图 1)。光吸收值随 $[H^+]$ 变化情况详见下节。

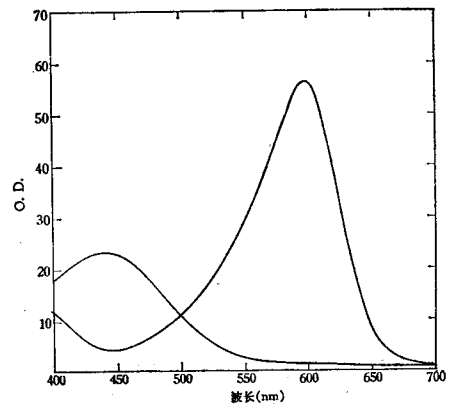


图 1 0.04% 百里酚蓝在不同 pH 下的吸收光谱

2. $[H^+]$ 标准曲线 向 3 毫升测活液内逐渐加入 HCl 标准溶液(0.01027N, 30—210 微升),同时测定其对应的光吸收值,制得 $[H^+]$ 标准曲线。(用双光束分光光度计测定时,对照杯内同时补加等量的缓冲液,用国产 72 型等单光束分光光度计测定时,可适当增加 HCl 当量浓度,减少加入 HCl 体积,如最终加入 100 微升 HCl,开始测活液即取 2.95 毫升。)我们于“日立”556 型分光光度计上测定了 10℃、15℃、25℃、30℃、35℃ 五个不同温度下的 $[H^+]$ 标准曲线(图 2),于 72 型分光光度计上测定了室温 23℃ 下的 $[H^+]$ 标准曲线(图 3)。实验结果

表明,光吸收 A 值与 $[H^+]$ 呈良好线性关系;百里酚蓝可以作为 pH-比色测活方法中的指示剂。

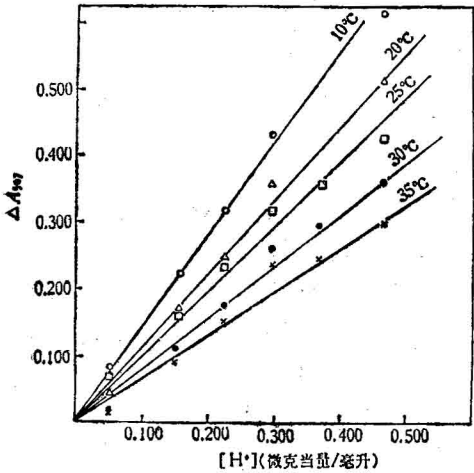


图 2 $[H^+]$ 的标准曲线
(“日立”556 分光光度计)

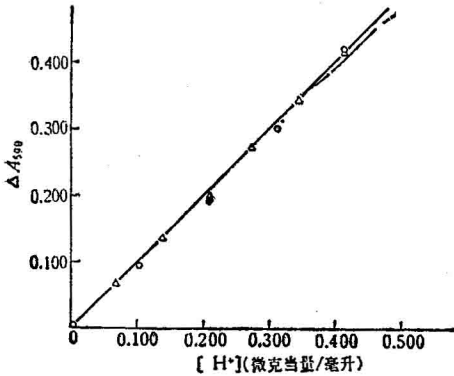


图 3 $[H^+]$ 的标准曲线
(23°C)(72 型分光光度计)

3. 不同酶浓度下反应速度测定 用 pH-比色法测定不同温度,不同酶浓度的反应速度(图 4、图 5)。结果表明,当用“日立”556 分光光度计测定时:酶浓度在低于 50 nM 30°C、62.5 nM 18.5°C 和 75 nM 4°C 时,均呈良好的线性关系;当用 72 型分光光度计于 23°C 下进行测定时,在酶浓度低于 62.5 nM 时,也呈良好线性关系,说明用本法测活在一定酶浓度范围内,反应速度正比于酶浓度。

4. 米氏常数 (K_m) 测定 为了解 pH 比色测活法中底物浓度效应,分别测定了肌酸及 ATP 的 K_m 值。当以肌酸为度量时,选用 4 mM

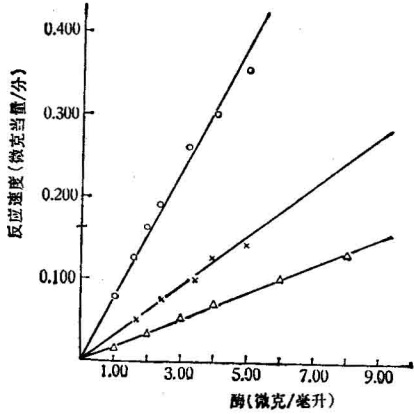


图 4 不同酶浓度下的反应速度
(“日立”556 分光光度计)
○—○ 30°C ×—× 18.5°C △—△ 14°C

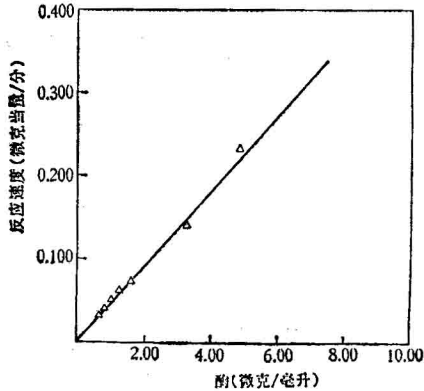


图 5 不同酶浓度下的反应速度
(72 型分光光度计)(23°C)

ATP 和 Mg^{2+} 浓度,结果发现肌酸浓度大于 24 mM 时,有明的抑制现象。当以 ATP 为度量时, Mg^{2+} 浓度随 ATP 浓度而变,肌酸浓度则选用 24 mM,在 30°C 时,测得结果用 Lineweaver-Burk 双倒数法作图(图 6),得到 K_m -ATP 为 1.33 mM, K_m -Cr 为 16.2 mM。

5. 温度效应 一般说来,在远低于酶蛋白变性温度时,酶活力随温度升高而升高。考虑到临床诊断时的实际情况,一般实验室又不具备恒温测活装置,因而我们用同一酶在 9°C、15°C、20°C、25°C、30°C、35°C 六个不同温度下,测定酶的反应速度,并以 $\log a$ (比活力)对 $\frac{1}{T}$ 作图(图 7),得到了较好的线性关系,据此计

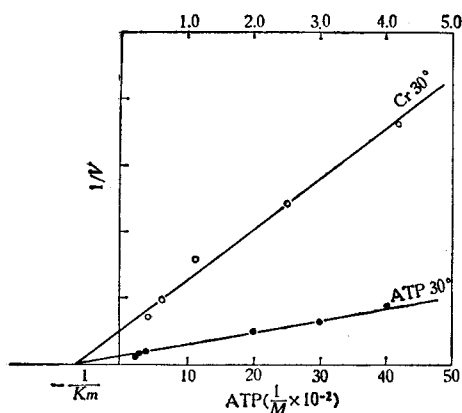


图 6 K_m -Lineweaver-Burk 作图

算其活化能 E 值为 16.42 千卡。根据这一数值, 可将不同温度下实际测得之酶活力, 换算成同一温度下的酶活力进行比较。应该注意的是——方面指示剂的光吸收值是随 $[H^+]$ 变化的, 另一方面, 这种变化又因温度的变化而异, 因而对于某一温度来说均应测定该温度的 $[H^+]$ 标准曲线, 作为计算活力的依据。

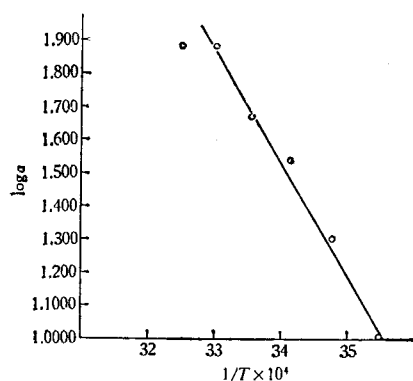


图 7 Arrhenius 经验方程作图法求活化能

讨 论

1. 关于肌酸激酶的测活方法, 目前文献上介绍的大体上有三种: 一是 Kuby 等人早年建立的停点定磷法, 即在不同的时间间隔内终止反应, 用定磷法测定反应产物磷酸肌酸的含量^[5]; 此法操作繁琐, 目前不常采用。第二种是偶联酶法^[6], 正向反应时是以丙酮酸激酶与乳酸脱氢酶作为偶联工具酶, 逆向反应时是以 6-磷酸葡萄糖脱氢酶, 己糖激酶作为工具酶; 这种

测活方法反应体系复杂, 工具酶活力明显影响测活, 又有明显的潜伏期, 这样对于酶的修饰及动力学方面的工作就不适用。此外, 测活用的辅酶 II, 磷酸肌酸都是较贵重的试剂, 所需紫外分光光度计也是一般实验室所不具备的, 因此, 有它一定的局限性。第三种是目前大多数文献上采用的 pH-stat 法(恒 pH 法)^[8], 它的原理是随着反应进行, 生成 H^+ , 自动滴加微量碱, 以中和其 H^+ , 使反应体系维持恒 pH, 根据一定时间内消耗的碱量计算其酶活力。这一方法虽然避免了上述两种方法的缺点, 但是我国目前大多数实验室还没有恒 pH 的特殊仪器设备。而采用百里酚蓝作指示剂的 pH-比色测活法, 不但简易可行, 而且只要有国产 72 型或 751 型分光光度计即可。

2. 一般国产 72 型分光光度计没有恒温装置, 为了比较不同温度下的酶活力, 我们以“日立”556 型分光光度计测定了六种不同温度下的反应速度, 并依据 Arrhenius 方程作图法求得其活化能 E 值, 在任意温度下 (T_2) 测得的酶活力 (a_2) 后, 代入下列方程式:

$$\log \frac{a_2}{a_1} = \frac{E(T_2 - T_1)}{2.303RT_1T_2}$$

即可求出另一温度 (T_1) 的活力 a_1 。

3. 本法的依据是测试反应生成物中 $[H^+]$ 的变化, 因而测试液初始的 pH 值十分重要, 每次一定要精确校准。不同实验室、不同仪器条件、不同温度下都首先应该按实际测活条件, 预先制作出该条件下的 $[H^+]$ 标准曲线。在测试过程中, 空气的 CO_2 明显干扰测试系统的 pH 值, 因而测活液一经校准 pH 后, 要立即使用, 不可久放。在测定时, 比色杯上要加盖子或盖以湿滤纸片, 防止 CO_2 的吸收。

pH-比色测活法应用于临床诊断时, 测试样品多为血清或体液, 可能对测活反应体系内的 $[H^+]$ 变化有一定的缓冲作用, 此时可在制作 $[H^+]$ 标准曲线时, 加入同样量的健康人的血清或体液, 即在血清或体液存在下计算 $[H^+]$ 与光吸收变化的关系。另外, 关于血清或体液内存在磷酸酯酶或肌激酶等是否会干扰测定的问题,

我们认为,在本方法的测活条件下(pH9.0)磷酸单酯酶可能会水解磷酸肌酸,但不会有新的 H^+ 解离发生,即不会引起 $[H^+]$ 变化,因而磷酸酯酶应该是不会干扰 pH-比色法的测定。肌激酶的存在会明显干扰正、逆两个方向的偶联酶法测活结果,但是肌激酶在将 ADP 转化为 ATP 和 AMP 时,不涉及 H^+ 浓度变化,同样不会干扰 pH-比色法测定。最后需要说明的是,若将 pH-比色测活方法应用于临床诊断,在血清样品用量, $[H^+]$ 标准曲线,与其它方法活力单位的比较等方面还需要做进一步的工作。

参 考 文 献

- [1] Kuby, S. A. et al.: *J. Biol. Chem.*, **209**, 191, 1954.
- [2] Watts, D. C.: *The Enzymes*, **8**, 384, 1963.
- [3] Kuby, S. A.: *The Enzymes*, **6**, 515, 1962.
- [4] Bickerstaff, G. F. et al.: *Inter. J. Biochem.*, **9**, 1, 1978.
- [5] Noda, L. et al.: *Methods in Enzymol.* **II**, 605, 1955.
- [6] Tanzer, M. L. et al.: *Biochemistry*, **8**, 1083, 1969.
- [7] Oliver, I. J.: *Biochem. Biophys. Acta*, **142**, 587, 1967.
- [8] Mahowald, T. A. et al.: *J. Biol. Chem.*, **237**, 1535, 1962.

[本文于 1980 年 12 月 8 日收到]

γ 辐照对 DNA 物理化学性质的影响

马玉琴 史洪林 于明珠 刘正梅 宋学玲

(中国科学院生物物理研究所)

DNA 具有较高的辐射敏感性。研究表明,由 DNA 分子损伤引起的生物学现象都遵循着一定的规律。

本文着重讨论 $^{60}Co\gamma$ 射线辐照 DNA 稀水溶液后化学组成的改变,并给出这些变化的剂量关系。

60 krad 后,由于 DNA 分子开始辐解,相对粘度变化较为迟缓。停照后,粘度又有回升,且在第三天出现峰值。估计这和 DNA 的修复和交联有关。

一、实验条件

1. 材料 小牛胸腺 DNA, 由本所生化厂提供。蛋白质含量低于 0.5%。为避免干扰离子引入,不加缓冲剂。试剂均为分析纯。受照溶液由三蒸水配制,分别为 43.5 微克/毫升和 100 微克/毫升两种。

2. 照射 $^{60}Co\gamma$ 射线源强 4000 克镭当量,照射距离 20 厘米。剂量率 $1350 \pm 5\%$ rad/分。受照溶液盛在 20 毫升带盖硬质玻璃管中(以 Frick 剂量计标定)。辐照后立即放入暗箱,在 2—4 小时内分析测定。

二、实验结果和讨论

1. DNA 溶液粘度受照后下降 DNA 分子的双螺旋缠绕结构使它有极大的粘度。 γ 辐照后由于 DNA 分子变性和降解,受照溶液的相对粘度随辐照剂量的增加而降低(图 1)。在 0—60 krad 范围内, η 值呈一汤匙状下降,这是 DNA 辐射诱发性变区。在这个区域内受照溶液的相对粘度变化为 8—10%, 剂量超过

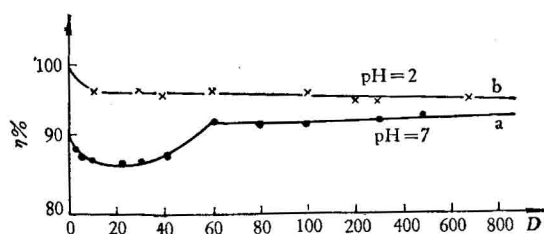


图 1 γ -辐照后小牛胸腺 DNA 相对粘度的下降

2. 氢离子浓度的变化 实验结果表明,在 2—25 krad 的剂量范围, γ 辐照主要是使 DNA 分子变性。由于氢键断裂,受照溶液中 H^+ 浓度增加 14.3—34.0%。辐照超过 100 krad, H^+ 浓度增加到 45.0% 左右。这时 DNA 分子几乎全部降解。

3. 无机磷酸的释放 3', 5'-磷酸二酯键和脱氧核糖的联结构成了 DNA 骨架。水辐解形成的 $OH\cdot$ 自由基,攻击 DNA 分子,通过双分子复合和单分子衰变反应,释放出无机磷酸,使 DNA 出现链断裂损伤。