

本文采用 NBT 显色法测定 AST 同工酶, 因还原型 NBT 呈蓝色, 可显示清晰的两条同工酶谱带, 显色强度与酶活力成正比。本法设备要求简单, 试剂可由中生公司提供, 一般临床生化实验室皆可开展。主要临床价值在于: AST-m 存在于细胞内线粒体中, 当心肌或肝细胞坏死, 线粒体膜通透性增加时, AST-m 大量释放引起血清中活力增高。因此, 可判断心肌及肝脏损害的严重程度。当心肌、肝脏组织损害严重时 AST-m 明显升高。鉴别诊断某些肝脏疾病, 慢性活动性肝炎时 AST-m 往往升高, 而慢性迁延性肝炎时多数正常^[7]。原发性肝癌时高于肝硬化、恶性胆道梗阻高于良性胆系疾病。酒精性肝损害时 AST-m 往往明显上升, 而丙氨酸移换氨基酶 (ALT) 总活力升高

不明显。此为区别于病毒性肝炎的主要特征之一。临床动态观察血清 AST-m 活性变化, 对急性心梗、重肝患者病情及预后估价有重要意义。

参 考 文 献

- 1 Bergmeyer H U, Tutzing G N, Bowers J *et al.* Clin Chem, 1977; **23**: 884
- 2 叶应妩主编, 临床实验诊断学, 北京: 人民卫生出版社, 1989: 669
- 3 Inagaki N, Kamisaki Y, Kiyama H *et al.* Brain Res, 1985; **325**: 336
- 4 徐克成, 实用内科杂志, 1986; **6** (12): 634
- 5 Sampson E J, Miller S A, Mckneally S S *et al.* Clin Chem, 1978; **24**: 1805—1812
- 6 石玉玲, 广东生化通讯, 1986; **3** (1): 27
- 7 陈国兴, 临床肝胆病杂志, 1986; **2** (4): 207

用 Fura-2 双波长荧光法测定 神经细胞内游离钙*

卢步峰 黄治森

(镇江医学院生化研究室, 镇江 212001)

鲁友明

(海军神经生物学研究中心, 南京 210049)

摘要 采用新型 Ca^{2+} 荧光指示剂 Fura-2 建立双波长荧光法测定分离的大鼠神经细胞内游离钙浓度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$)。结果显示, 在静息状态下, 其 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 为 $109 \pm 12 \text{ nmol/L}$ 。30mmol/L KCl 可显著增加 $[\text{Ca}^{2+}]_i$, 并且 KCl 的这种效应呈一定的剂量依赖关系, 提示该法灵敏、可靠。

关键词 荧光指示剂 (Fura-2)、细胞内游离钙, 神经细胞, 大鼠

Fura-2 {2-[6-双乙酸基-5-(2-双乙酸氨基)-5-甲苯氨乙氧基]-2-苯骈呋喃基-5-噻唑酸五钾盐} 属第二代荧光指示剂, 其荧光强度高, 对 Ca^{2+} 选择性好, 测定灵敏等优点, 是国外研究 Ca^{2+} 在生命科学中生理、生化功能的重要手段之一^[1,2]。目前, 国内大部分实验室均采用

Fura-2 单波长荧光法^[3,4], 未能充分利用 Fura-2 固有优点, 故直接影响到测定的准确性和可靠性。本文报道采用 Fura-2 双波长荧光法测

* 江苏省自然科学基金资助项目。

收稿日期: 1993-05-18, 修回日期: 1993-08-27

定分离的大鼠神经细胞内游离钙浓度 ($[Ca^{2+}]_i$), 证明此法灵敏可靠.

1 材料和方法

1.1 试剂

Fura-2/AM, Sigma 产品; 胰蛋白酶, Difico 进口分装; Triton X-100, USA 进口分装; 其余试剂均为国产分析纯.

1.2 方法

1.2.1 测定原理 Fura-2 因有较强的亲水性难以进入细胞, 在其负性基团部位结合上亲脂的乙酰羧甲基酯成为 Fura-2/AM 后, 与细胞温孵时易透过细胞膜, 胞浆内酯酶可将 Fura-2/AM 水解为 Fura-2, 后者与胞浆内游离的 Ca^{2+} 结合, 形成 Fura-2- Ca^{2+} 复合物. Fura-2 及其与 Ca^{2+} 结合的复合物其最大激发光波长分别为 380nm 和 340nm, 其发射光的强度与 Ca^{2+} 浓度呈比例, 据此可以测定 $[Ca^{2+}]_i$.

1.2.2 细胞悬液制备 细胞悬液制备参考 Dildy 等^[5]的方法, 并稍作改进. 雄性 SD 大鼠, 体重 $198 \pm 20g$, 断头处死, 取全脑立即置于 pH7.4 的冰 Hanks 液 (含 $1.3mmol/L$ $CaCl_2$) 中, 用 Hanks 液冲洗 2—3 次, 剪碎后, 置脑组织于 5—10 倍体积的 0.125% 胰蛋白酶中, 于 $37^\circ C$ 轻轻搅拌 20min. 以冰 RPMI 1640 培养基 (含 0.5% 牛血清白蛋白) 中止消化. 过 220 目筛网后, 滤液以 $1500r/min$ 离心 5min, 再以 Hanks 液洗 1 次, 最后用 RPMI 1640 培养基制备成一定密度 (10^5 — 10^7 个/ml) 的细胞悬液, 经台盼蓝排斥试验检查, 细胞成活率达 95% 以上.

1.2.3 Fura-2 负载及荧光测定 上述细胞悬液 (总体积 1ml) $37^\circ C$ 预温 5min 后, 加入 Fura-2/AM (终浓度 5 — $7\mu mol/L$). $37^\circ C$ 恒温振荡 30—45min. 负载后细胞以含 0.2% 牛血清白蛋白的 Hanks 液洗 2 次. 测定前, 细胞预先于 $37^\circ C$ 复温 2—3min.

1.2.4 Fura-2 荧光测定 荧光测定采用岛津 RF-5000 型荧光分光光度计. 测定条件: 激发狭缝和发射狭缝宽度均为 10nm, 以 340nm 和

380nm 波长激发, 500nm 波长发射, 响应因子 0.02, 激发波长变换时间 1s. 测定时依次记录静息时和激动剂加入后的 340nm/380nm 荧光比值 (R). 根据下列公式, 可以测到的 R 值和 Fura-2/ Ca^{2+} 解离常数 (K_d) 算出 $[Ca^{2+}]_i$ ^[1]. $[Ca^{2+}]_i = K_d(F_o/F_s)(R - R_{min})/(R_{max} - R)$ 式中 R_{max} 和 R_{min} 分别为最大和最小的荧光比值, 亦即是在存在大于 $1mmol/L$ 游离 Ca^{2+} 浓度和存在至少高于此 Ca^{2+} 浓度 2 倍的 EGTA 情况下, 分别加入 0.09% Triton X-100 后所测定的荧光比值. F_o 和 F_s 分别代表 Ca^{2+} 为零和饱和状态下, 在 380nm 波长测得的荧光强度. K_d 值为 $224nmol/L$. 在计算 $[Ca^{2+}]_i$ 之前, 应减去在没有负载 Fura-2 的细胞中测到的自发荧光.

2 结 果

2.1 Fura-2 负载和 R 值

图 1 显示大鼠神经细胞在不同条件下的 340nm/380nm 荧光比值 (R). 在静息时, R 值

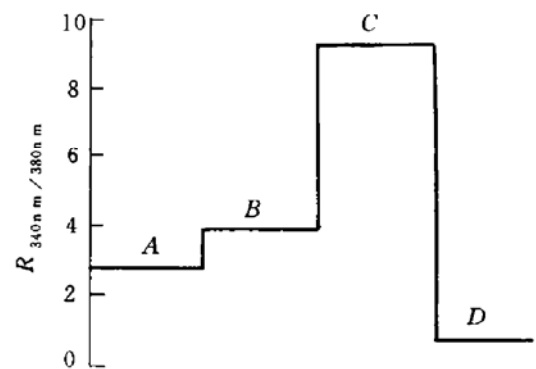


图 1 大鼠神经细胞 340nm/380nm 荧光比值变化示意图

A: 正常负载 B: 加 KCl C: 加 Triton X-100 D: 加 EGTA

大于 1, 说明 Fura-2/AM 进入细胞后, 胞内酯酶对它的水解, 继而其与胞内游离 Ca^{2+} 的结合均良好. 加入 KCl 后, R 值明显升高, 证明此时有胞外 Ca^{2+} 的进入. 加入 Triton X-100 后, R 值升高至最大, 提示细胞破碎, 所有游离 Fura-2 均与 Ca^{2+} 结合 (R_{max}). 加入 EGTA (pH

>8.3) 后, R 值降至 1 以下, 显示此时 Fura-2 均处于未结合形式 ($R_{\min}$).

在 37°C, Fura-2/AM 终浓度为 5—7 $\mu\text{mol/L}$ 条件下, 负载不同时间后, 测定负载细胞 R 值, 发现 30—45min 后达到最好负载效果. 与此同时, 有限地改变细胞悬液密度 (10^5 — 10^7 个/ml), 并不影响 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的测定. Fura-2 负载后, 通过观察在细胞悬液中加入 40 $\mu\text{mol/L}$ MnCl_2 前后的 R 值和 340nm 处荧光强度的变化, 可检测负载后细胞的漏出率, 发现室温下, 细胞内 Fura-2 的漏出率较少, 30min 内不超过 5%; 随时间延长, 漏出率增加, 1h 时, 漏出达 10%. 这个问题可以通过测定前冲洗细胞或缩短测定时间 ($<10\text{min}$) 解决.

2.2 静息状态下 $[\text{Ca}^{2+}]_i$

在细胞外 Ca^{2+} 为 1.3mmol/L 情况下, 应用本法测得的神经细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 为 $109 \pm 12\text{nmol/L}$ ($\bar{x} \pm s$, $n=9$).

2.3 KCl 对 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响

图 2 显示, 在细胞外 Ca^{2+} 为 1.3mmol/L 时, KCl 对神经细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 影响的剂量关系. 在待测细胞悬液中加入 30mmol/L KCl 可使 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 增加 58% ($P < 0.01$, $n=9$); 而 15mmol/L KCl 致 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的增加仅 17%; 在 60mmol/L KCl 时, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的增加达最大 (79%). 继续增加 KCl 浓度, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 不再增加.

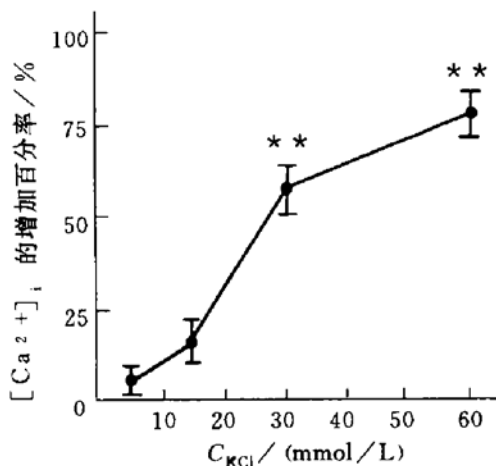


图 2 KCl 对神经细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响

** $P < 0.01$ (与静息状态相比, $\bar{x} \pm s$, $n=9$).

3 讨 论

Fura-2 是 80 年代发展起来的新一代 Ca^{2+} 荧光指示剂, 与 Quin-2 相比, 其主要优点是 Ca^{2+} 结合后, 具有很高的荧光强度. 这一优点不仅能提高测定的敏感性, 而且使其对细胞浆 Ca^{2+} 的缓冲作用大大减少或消失^[1]. 另外, 由于 Fura-2 与 Ca^{2+} 结合后的激发光谱峰值 (从 380nm 到 340nm) 有较大的漂移, 用这二个光谱的荧光比值作为指标, 不仅能提高观察的信号, 而且可基本不受细胞密度及 Fura-2 浓度的影响而测定和计算出 $[\text{Ca}^{2+}]_i$. 这也正是单波长测定法所无法比拟的.

用胰蛋白酶消化法制备大鼠神经细胞, 方法简便易行, 经与非酶消化的机械性分离相比, 此法对细胞无明显损伤作用, 并且在实验过程中一值保持存活. 用此细胞悬液, 结合我们所建立的 Fura-2 双波长荧光法测定 $[\text{Ca}^{2+}]_i$, 结果与文献 [5, 6] 报道一致.

钾离子是一种可兴奋细胞去极化剂, 当神经细胞去极化到一定程度, 则可激活细胞膜上 L 型电压依赖性钙通道, 使细胞外 Ca^{2+} 内流, 导致 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高^[6]. 在分离的神经细胞, 我们成功地用 Fura-2 观察到这种去极化诱发的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高, 这与文献 [6] 采用脑片所获结论相符. 应用同法, 我们还观察了藜芦碱、尼莫地平致分离的神经细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的变化 (待另文发表). 从而进一步证明该法灵敏、可靠.

参 考 文 献

- 1 Gryniewicz G, Poenie M, Tsien R Y. J Biol Chem, 1985; **260**: 3440
- 2 Cobbold P H, Rink T J. Biochem J, 1987; **248**: 313
- 3 李明, 王峻峰, 韩济生等. 药学报, 1991; **26**: 890
- 4 程锦轩, 张一彬, 段全虹等. 中国药理学通报, 1992; **8**: 198
- 5 Dildy J E, Leslie S W. Brain Res, 1989; **499**: 383
- 6 Benavides J, Scatton B, Perrier. J Cereb Blood Flow Metab, 1991; **11**: S719

A Test Paper Method for Rapid Detecting β -Galactosidase. Yuan Suli, Fu Li, Zhang Qijiu. (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; **21** (3): 271

A X-Gal test paper method for detecting β -galactosidase has been developed. This method is based on the degradation of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -galactoside, a chromogenic substrate, into blue 5-bromo-4-chloro-indole by the reaction of β -galactosidase. Advantage of the method is that it not only consumes X-gal less, but it is also more simple and convenient than the previous method. The present method is suitable for detecting a large number of the colonies containing gene encoding for β -galactosidase from an agar plate.

Key words X-gal test paper, β -galactosidase, gene cloning

Agarose Gel Electrophoresis Staining With NBT for AST Isoenzyme Measurement. Shi Yuling, Chen Yanhong, Liu Xun. (*Wuhan Gen. Hosp., Guangzhou Mil. Reg., Wuhan 430070*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; **21** (3): 273

Mammalian aspartate aminotransferases (AST • EC • 2 • 6 • 1 • 1) exist in two predominant forms: one mitochondrial (AST-m) the other of cytosolic origin (AST-c). The electrophoretic migration rate of AST-c is between α - and β -glubulin, and the electrophoretic migration rate of AST-m is similar to γ -

glubulin. The method of solid blue B dye with electrophoresis on agarose is not sensitive to AST-m. So the nitroblue tetrazolium (NBT) dye is used instead of the solid blue B dye.

Key words aspartate aminotransferase isoenzyme, nitroblue tetrazolium dyes, agarose gel electrophoresis

Determination of Intracellular Free Ca^{2+} Concentration in Neurocytes with Fura-2 Double-Wavelength Fluorecent Technique. Lu Bufeng, Huang Yisen, Lu Youming. (*Department of Biochemistry, Zhenjiang Medical College, Zhenjiang 212001*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; **21** (3): 275

The intracellular free Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) was measured in isolated neurocytes prepared from *Sprague-Dawley* rats with Fura-2 double-wavelength fluoremetry. The results showed that the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ of the resting neurocytes in Ca^{2+} -containing solution was $109 \pm 12 \text{ nmol/L}$ ($\bar{x} \pm s$, $n=9$). KCl (30mmol/L) markedly evoked $[\text{Ca}^{2+}]_i$ of the neurocytes ($P < 0.01$, $n=9$), and the rises of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ by KCl is a concentration-dependent response. These results suggest that the adoption of Fura-2 double-wavelength fluoremetry in dissociated rat neurocytes in a useful and relatively easily applicable technique for monitoring intracellular Ca^{2+} changes.

Key words Fura-2, intracellular free calcium, neurocytes, rat