

肺泡巨噬细胞内微量 ATP 的测定

王 家 双

(南京市鼓楼医院麻醉科)

肺泡巨噬细胞是肺脏正常防御功能的重要组成部分和第一道防线,是常居于呼吸道内主要的细胞群体。由于它们容易获得并且纯度高,所以多年来已被广泛用作研究正常机体内单核巨噬细胞系统功能的一个重要材料。

ATP 在正常机体的组织、细胞的各种生理活动过程中占有非常重要的地位。本文报道参考 Beutler 和 Stanley 的荧光素酶和 ATP 特异性结合而产生生物发光的方法^[1,2],以 Tris-硼酸缓冲液抽提加煮沸法进行肺泡巨噬细胞内微量 ATP 的测定。

材 料 和 方 法

一、试剂

1. 标准品 ATP 西德 Mannheim 公司产品,纯度 >95%;
2. 荧光素酶 上海植物生理研究所产品。

(4) pH 的影响。实验证明,同一样品, pH 8.75 时 OD_{492} 为 0.299 ± 0.004 , 而 pH10 时 OD 值增加到 0.45 ± 0.001 , 此时溶液光密度最大。pH 也使最大吸收峰改变,如 pH7.21 时,最大吸收峰在 786nm。

综上所述,本法的优点是: (1) 敏感性高。(2) 可直接用于测定匀浆及膜结合蛋白质,不需预处理。(3) 减少干扰。(4) 节约试剂。(5) 方便、简便、快速。一块比色板,可放 96 个样品,1—2 分钟测定完毕,并打出数据,整个过程只需 30—60 分钟。特别适用于大批样品的定量分析,可为蛋白定量的自动化提供有利条件。

本法尚不能消除干扰物质的干扰,特别是

二、缓冲液

1. 0.1M 硼酸缓冲液 (pH7.4, 含 40mM 硫酸镁);
2. 0.01M 磷酸缓冲液 (pH7.4, 含 4mM 硫酸镁);
3. 0.04M Tris-硼酸缓冲液 (pH9.2);
4. 0.17M Tris-氯化铵缓冲液 (pH7.2)。

三、ATP 标准液

取标准品 ATP ($ATP-Na_2$) 加去离子水配成 $10^{-3}M$ 浓度的 ATP 母液,置 $-5^{\circ}C$ 到 $-10^{\circ}C$ 保存备用。其他浓度的 ATP 标准液均在临测定前取母液稀释到所需浓度。

四、测定仪器 YSJ-1 型液体闪烁计数器 (上海标准计量局实验工厂产品)。

五、标本制备

取健康成年兔,经耳缘静脉注入 10—15 毫升空气处死,无菌操作下迅速打开胸腔,仔细游

EDTA 干扰还是很明显的。

参 考 文 献

- [1] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 193: 265, 1951.
- [2] 管原洁、副岛正美(张旭译):《蛋白质的定量法》第二版 108—152 页,农业出版社,北京,1981.
- [3] 张龙翔等:《生化实验方法和技术》,165—167 页,人民教育出版社,北京,1981.
- [4] Schuel, H. et al.: *Anal. Biochem.*, 20: 86, 1967.
- [5] Ji TH: *Anal. Biochem.*, 52: 517, 1973.
- [6] Wang, C. et al.: *Anal. Biochem.*, 63: 414, 1975.
- [7] Dulley, J. R. et al.: *Anal. Biochem.*, 64: 136, 1975.

[本文于 1986 年 1 月 31 日收到]

离出两肺(不可有任何损伤),离断支气管后以4℃的兔生理盐水(Lock's液)40—60毫升/次,进行支气管肺泡灌洗,连续灌洗4—5次,洗出液置一处,1000—1500转/分低温离心10分钟,用吸管轻轻吹打,除去细胞团表面的乳白色粘液层,倾去上清。用4℃的Tris-氯化铵缓冲液溶去红细胞,再以4℃兔生理盐水冲洗离心两次,调至 $1.5-2.0 \times 10^6$ /毫升,取3毫升细胞悬液至试管内,1500转/分低温离心5分钟,倾去上清后加入3毫升Tris-硼酸缓冲液(TBB)悬浮肺泡巨噬细胞,立即置沸水浴中煮沸10分钟,速冷却后5000转/分离心5分钟,取上清液-70℃贮存备用。

六、测定总容积和方法

测定管总容量为6毫升,硼酸缓冲液(含有荧光素酶,测定前即刻加入),磷酸缓冲液、标本液(样本管)或标准ATP液(标准管)以1:1:1比例加入闪烁杯内。打开液体闪烁仪后,将荧光素酶加入闪烁杯内,即以非符合测定方式测定放射性脉冲数,计数时间为0.1分钟。

七、标准曲线制作及标本ATP量计算

荧光素酶用硼酸缓冲液于测定前临时配制,如提前配制应置0℃—4℃环境中保存,由于荧光素酶活力随时间变化而逐渐下降,所以每次测定必需随时制作标准曲线方才可靠。测定完毕以标准管发光强度的对数值(log)为纵坐标,以标准ATP浓度的负对数值(-log)为

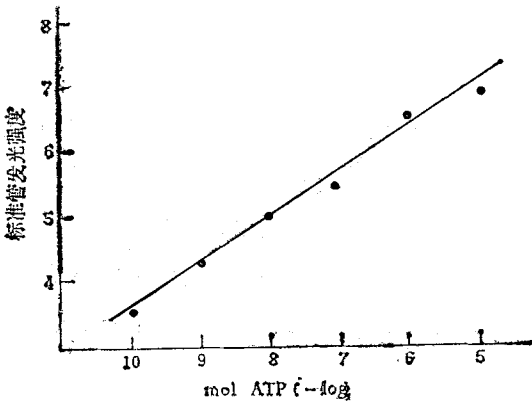


图1 标准ATP曲线
 $Y = 10.67 - 0.712X$ $r = -0.995$
纵坐标为 log

横坐标,测定数据经回归处理后划出ATP标准曲线(见图1)。样本管测得值以标准曲线为准,计算出每管ATP含量,进而算出每个肺泡巨噬细胞内的ATP含量。

讨 论

由于ATP在细胞生理活动中占有的重要地位,其含量发生改变时必然会引起机体各项功能的异常。在多种疾病病变早期,尚未出现临床症状之前,细胞内ATP水平往往就已经发生了变化。因此,对细胞内微量ATP水平的测定是一种了解细胞内能量代谢及其功能状况,分析评价药物或毒物对细胞毒性的重要手段。

肺泡巨噬细胞是一种多功能、多分泌的单核巨噬细胞群体,目前普遍认为它们与肺部感染性疾病,肿瘤及其他一些肺部疾病的发生、发展和预后都密切相关。近年来,国内外对此从不同角度展开了广泛深入地研究,随着纤维支气管镜的普及应用,支气管肺泡灌洗术也正在临床逐渐展开,这为进行人体肺泡巨噬细胞内ATP的测定提供了可能。

一、不同标本制备法对发光强度的影响

我们比较了:①过氯酸抽提法:用0℃—4℃的0.4N的过氯酸3毫升抽提细胞内ATP后,再煮沸10分钟;②蒸馏水处理法:用0℃—4℃的蒸馏水悬浮细胞,置冰箱内低渗处理20分钟,再煮沸10分钟;③TBB处理法:用TBB悬浮后立即将悬液煮沸10分钟结果见表1。

上述三种方法,以最后一种较为可靠,虽然蒸馏水处理法结果与之相近,但不如TBB处理法简便。此外,我们还用0℃—4℃的0.4N过氯酸0.5毫升和0.1%胰蛋白酶低温处理制备标本,结果均不理想。

二、标本保存时间对发光强度的影响

表 1

标本处理方法	细胞浓度	发光强度(log 值)
过氯酸(n = 5)	3×10^6	3.32 ± 1.86
蒸馏水(n = 7)	3×10^6	6.78 ± 0.18
TBB (n = 7)	3×10^6	6.90 ± 0.06

M±SD

比色法测定黄嘌呤氧化酶

吴晓生

李龙官

(镇江医学院检验系)

(上海第二医科大学附属第九医院)

黄嘌呤氧化酶 (Xanthine Oxidase, EC: 1, 2, 3, 2; 简称 XOD) 属需氧脱氢酶类, 是体内核酸代谢中一重要的酶。它由两个分子量为 140,000 的亚基所组成, 每个亚基内含有一个钼原子、两个 $\text{Fe}_2\text{S}_2(\text{SR})_4$ 原子簇和一个黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD)^[1]。该酶主要存在于哺乳动物的乳汁和肝脏中, 小肠亦含少量^[2]。其测定方法很多, 主要有分光光度法、电化学法、荧光法和放射化学法等^[7]。但均操作烦琐, 仪器设备要求高, 难以推广。本文介绍了一种简单、可靠而适用于一般实验室的 XOD 比色测定法。

方 法

一、原理:

将测定标本分别置 -70°C 保存 1—8 天及 15 天, 再分别测定其发光强度, 发现保存一周内的标本无变化, 超过一周发光值即有下降, 虽减少不多, 但可能影响测定结果。所以标本保存最好不超过一周。此外, 对照观察还表明, 一周内的标本置超低温 (-70°C) 和普通冰箱上层 (-5°C — -10°C) 保存, 其结果无差异。

三、相对最适酶、细胞浓度

通过对比, 我们所选用的最适荧光素酶浓度为 4 毫克/每测定管, 细胞浓度为 $1.5\text{—}2.0 \times 10^6$ /毫升样本。但在测定过程中有时也会因荧光素饱和效应的发生而影响结果分析。所以测定不同细胞时均各有其酶最适浓度和细胞浓度。

小 结

本法使用简便, 测定快速, 结果可靠, 并且

XOD 可催化基质中的次黄嘌呤 (或黄嘌呤) 生成黄嘌呤 (或尿酸), 与此同时产生的超氧离子 (O_2^-) 将硝基四唑蓝还原成紫红色的甲臍。根据甲臍的生成量可推算 XOD 活力。

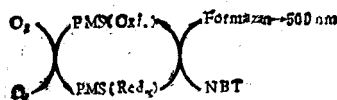
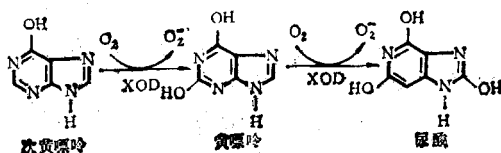


图 1

灵敏度高, 它可测得低达 10^{-12} — 10^{-15} 克分子浓度的 ATP 含量。同时实验结果较稳定, 重复性也较好。

实验中得到江苏省计划生育研究所许宁同志的大力支持, 特致谢意。

参 考 文 献

- [1] Stanley, P. E. and Williams, S. G.: *Anal. Biochem.*, 29: 381, 1969.
- [2] Beutler, E. and Baluda, M. C.: *Blood*, 23: 688, 1964.
- [3] Hammer, J. A.: *Am. Rev. Respir. Dis.*, 124: 50, 1981.
- [4] 柯一保: 《生物科学动态》, 6: 20, 1978.
- [5] Bloom, B. R. and David, J. R.: *In Vitro in Cell-Mediated and Tumor Immunity*, Academic Press, New York, San Francisco, London, 1976.

[本文于 1985 年 12 月 2 日收到]