

鸟氨酸脱羧酶活性微量测定法

范慕贞 曹淑兰 马宇玲

(中日友好医院临床医学研究所生化室, 北京)

提 要

本文采用一种简单,微量反应系统,根据 ^{14}C -鸟氨酸释放的 $^{14}\text{CO}_2$ 量测定鸟氨酸脱羧酶 (ODC) 的活性,酶反应在置于液闪计数瓶内的玻璃小管中进行,释放的 $^{14}\text{CO}_2$ 被瓶内滤纸片上的海胺吸收。实验结果表明,加酸释放 $^{14}\text{CO}_2$ 后 30 分钟 $^{14}\text{CO}_2$ 吸收已达最大值,且吸收量与释放量成正比,酶反应测定证明 $^{14}\text{CO}_2$ 释放速度在 40 分钟内保持恒定。ODC 活性与酶浓度呈线性关系,此方法不仅用于 ODC 活性测定,而且亦可用于其他脱羧酶活性的测定。

鸟氨酸脱羧酶 (ODC, EC4, 1,1, 17) 是多胺生物合成的限速酶,多胺是生物界普遍存在的一类多阳离子脂肪胺^[1],它在生物大分子的合成^[2,3]及细胞生长调节中^[4]起重要作用,多胺的生物合成及其相关的酶活性在快速生长的细胞和再生组织及恶性增生的细胞中都有明显的增加^[5],促癌物的研究表明,促癌作用与 ODC 的诱导有关^[5,6],并认为 ODC 的诱导是促癌物引起细胞改变的最早事件^[7],因而 ODC 活性测定可作为鉴定促癌物,筛选抗癌药及研究促癌机理的有用指标,而且这种快速易行的方法比起用长期致癌或阻断癌变的实验来鉴定促癌物或筛选抗癌药要方便得多,本文改进了原有测定方法^[8]用简便的装置和微量反应体系可进行 ODC 或其他脱羧酶活性的测定。

从表 2 可以看出,盐酸胍、尿素均可使本法的显色度降低。7M 尿素可使显色度降低 22%; 0.5M 盐酸胍可使显色度降低 30%,而 4M 盐酸胍可使显色度降低 53%。值得注意的是 Triton x-100 可以严重干扰本法的显色。因此,在柱层析洗脱液中如含有这类去污剂时,必须设法予以去除后,才能用本法进行监测。

材 料 与 方 法

1. 培养细胞 人早幼粒白血病细胞 HL₆₀, 在含 20% 小牛血清的 1640 培养基中于 37℃, 5% CO_2 培养箱内培养,换新鲜培养基后第二天用于酶活性测定。

2. 酶液制备 培养细胞经离心收集,用 PBS 溶液洗三次, 1×10^6 细胞最后悬浮在 400 微升溶细胞的缓冲液 (EDTA, 10mM; 磷酸吡哆醛, 40mM; 二硫苏糖醇, 2mM; 氟化钠, 5mM; PMSF, 0.5mM; 甘油, 10%; 磷酸缓冲液, pH7.2, 50mM) 中,置液氮反复冻化三次,显微镜下证明细胞已完全破碎,超速离心 (40000rpm, 60 分钟, 4℃) 后的上清液作为酶液 (作为 100% 酶浓度)。

参 考 文 献

- [1] Bitter, T. et al.: *Anal. Biochem.*, 4, 330, 1962.
- [2] Heinegård, D.: *Chemica Scripta*, 4, 199, 1973.
- [3] Ford, J. D. et al.: *Anal. Biochem.*, 84, 539, 1978.
- [4] Jeansonne, N. et al.: *J. Chromatogr.*, 354, 524, 1986.

[本文于 1987 年 3 月 9 日收到]

3. $^{14}\text{CO}_2$ 回收测定 反应装置如图 1 所示, $\text{Na}_2^{14}\text{CO}_3$ 用 1mM Na_2CO_3 溶液稀释至计数约为 10000cpm/20 微升的溶液, 取 20 微升 $\text{Na}_2^{14}\text{CO}_3$ 稀释液放入小管底部, 在液闪计数瓶内置一张点有 20 微升 1M 的海胺的滤纸片 ($0.5 \times 2\text{cm}$), 20 微升 2M 柠檬酸溶液加入小管后立即盖紧瓶盖于 37°C 水溶液中保温 不同时间后, 分别取出小管弃去, 瓶内加入 5 毫升闪烁液 (PPO, 3%; POPOP, 0.3%; 甲苯) 置液体闪烁计数器计数 (Beckman, LS 9800), 以最大吸收值作为 100%。

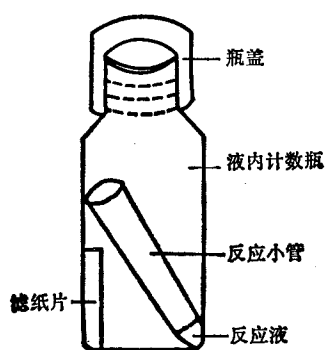


图1 ODC 活性测定反应装置

4. ODC 活性测定 酶反应总体积为 20 微升。预先在小瓶内放有一张点有 20 微升 1M 海胺溶液的滤纸片, 10 微升反应试剂 (磷酸缓冲液, 100mM, pH7.2; 磷酸吡哆醛, 0.01mM; L-鸟氨酸, 0.5mM; L-[1- ^{14}C] 鸟氨酸, $0.08\mu\text{Ci}$) 加入小管底部(图 1), 再加 10 微升酶液后立即将瓶盖拧紧, 于 37°C 水浴中振摇 30 分钟, 开盖加 20 微升 2M 柠檬酸终止反应, 迅速拧紧瓶盖, 再振摇 1 小时后取出小管弃去, 瓶内加 5 毫升闪烁液计数, 酶活性以 pmole/hr 表示。空白管终止反应后再加酶液, 实验管均用三个平行管。

5. 蛋白质测定 按 Lowry 等人方法^[9], 以人血清清蛋白为标准。

6. 试剂 L-[1- ^{14}C]-鸟氨酸 (57mCi/mmoLe, Amersham UK), DTT (Serva), PMSF (Merck), 磷酸吡哆醛 (Sigma), 人血清清蛋白 (Fluka AG), 1640 培养基 (GIBCo Lab),

$\text{Na}_2^{14}\text{CO}_3$ (北京 401 所送给), 二氟甲基鸟氨酸 (2-DFMO, Merrell Dow Research Center)。

结 果

1. $^{14}\text{CO}_2$ 回收率测定

为了检查本文所用反应装置和实验操作能否保证得到满意的 $^{14}\text{CO}_2$ 回收和完全回收所需的最少时间, 观察了 $\text{Na}_2^{14}\text{CO}_3$ 与酸反应后 $^{14}\text{CO}_2$ 的释放和被碱吸收的回收率, 其结果如图 2 所示, $^{14}\text{CO}_2$ 的回收率随时间延长而增加, 反应 30 分钟后, 回收率达 100%, 用不同量的 $\text{Na}_2^{14}\text{CO}_3$ 与酸反应 30 分钟后, 释放的 $^{14}\text{CO}_2$ 被碱吸收的量与加入的 $\text{Na}_2^{14}\text{CO}_3$ 量呈线性关系(图 3)。

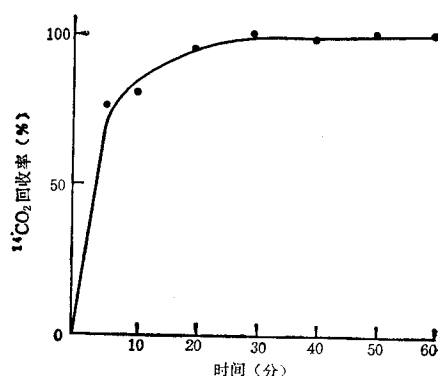


图2 $^{14}\text{CO}_2$ 回收与时间的关系 ($n=4$)

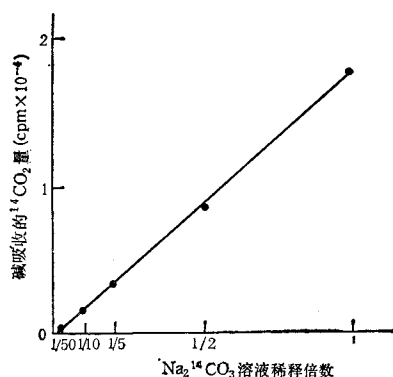


图3 $^{14}\text{CO}_2$ 的吸收效率曲线

2. ODC 反应时间曲线

以 HL₆₀ 培养细胞作被测样品, 选用鸟氨酸底物浓度为 0.5mM, 在一定酶浓度 (90 微克细胞蛋白/10 微升) 条件下, 反应 40 分钟内 ODC 反应速度即 $^{14}\text{CO}_2$ 释放量与时间呈线性关系(图

4)。

3. ODC 活性与酶浓度

在底物鸟氨酸浓度足够及其他条件一定的情况下(见材料与方法),观察了反应 30 分钟时 ODC 活性与酶浓度变化的关系,图 5 表明 ODC 活性随酶浓度的增加而增加。

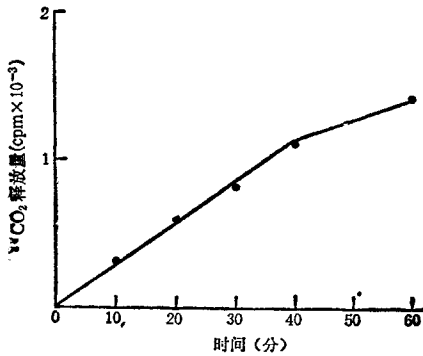


图 4 $^{14}\text{CO}_2$ 释放量与反应时间的关系

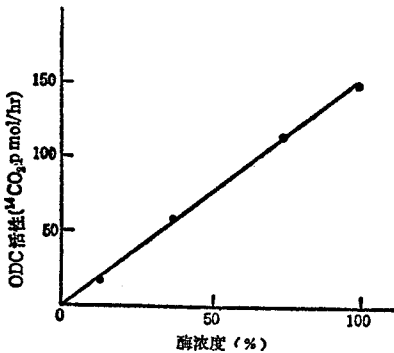


图 5 ODC 活性与酶浓度的关系

表 1 DFM 对 HL₆₀ 细胞 ODC 活性的影响

DFMO 浓度 (mM)	ODC 活性 ($^{14}\text{CO}_2$ cpm/mg 蛋白质)
0	41000
0.5	12500
1.0	4000
2.0	3227

4. ODC 的不可逆抑制剂对 ODC 活性的影响

HL₆₀ 细胞在含有 ODC 不可逆抑制剂二氟甲基鸟氨酸 (DFMO) 的培养基中培养 72 小时后测定 ODC 活性,结果表明 ODC 活性随 DFMO 浓度的增加而减小(表 1)

讨 论

ODC 催化鸟氨酸脱羧生成腐胺及 CO_2 , 因而可在一定条件下根据生成的腐胺或 CO_2 来测定 ODC 活性。ODC 在多数动物的可溶性蛋白中只占极少的量,根据提纯酶的比活性计算该酶浓度约为 $1 \times 10^{-9} \text{M}$,而且处于休止或非增殖状态的成年动物细胞中 ODC 活性很低,故 ODC 活性测定多用较灵敏的放射分析法,其中之一是用放射性同位素 ^{14}C 标记鸟氨酸的羧基,收集释放的 $^{14}\text{CO}_2$ 进行测量,二是 ^{14}C 均匀标记的鸟氨酸经脱羧后生成 ^{14}C 标记的腐胺,通过离子交换柱层析分离、收集 ^{14}C -腐胺进行测定。后一种方法虽然灵敏度较高,但必需将生成的 ^{14}C -腐胺与 ^{14}C -鸟氨酸分开,因而操作繁琐费时,且影响回收,前一种方法是将释放的 $^{14}\text{CO}_2$ 直接用碱吸收,省去了分离底物与产物的操作,减少了影响回收的因素,本文即采用了这类方法,常规的方法所用酶反应体积较大(200 微升至 1.5 毫升),故相应用的 ^{14}C -鸟氨酸量也较多(0.25 μCi 至 1 μCi)^[10],我们所用的反应体积仅 20 微升,含 ^{14}C -鸟氨酸为 0.08 μCi 反应装置简便,既节省价格昂贵的标记化合物,而且 $^{14}\text{CO}_2$ 回收满意,在一定反应时间内,酶反应速度维持恒定,酶活性与酶浓度呈线性关系 ($r = 0.9968 \pm 0.0053, n = 6$) 能满足酶活性测定的基本要求,定量测定结果可靠灵敏(500cpm 可被检出)。用此方法我们研究了 ODC 不可逆抑制剂对 HL₆₀ 细胞 ODC 活性影响。结果表明,ODC 活性随抑制剂量的增加而减小,也说明该方法是可行的。本文所述 ODC 活性微量测定方法是筛选、鉴定促癌物和抗癌药及多胺代谢调节和癌变机理研究中的有用方法,但需要注意的是由于方法微量,要求操作准确方能得到满意结果。

参 考 文 献

- [1] Janne, J. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **473**, 241, 1978.
- [2] Abraham, K. et al.: *Trends in Biochemical Sciences*, **6**, 106, 1981.

视网膜组织脂质过氧化反应产物的测定

——硫代巴比妥酸荧光法

李爱群 李 燕 莫 简

(中国人民解放军第四军医大学, 西安)

提 要

作者研究了家兔视网膜组织脂质过氧化反应产物的硫代巴比妥酸 (TBA) 荧光测定法; 测定了正常家兔视网膜组织的 TBA 值; 并对视网膜铁锈症与脂质过氧化的关系进行了讨论。正常家兔视网膜组织的 TBA 值为: $0.092 \pm 0.02 \text{ nmol MDA/mg}$ 。实验结果表明, 视网膜铁锈症可使视网膜组织中脂质过氧化产物显著增高。

对血液和肝组织中脂质过氧化反应产物的测定方法已有不少报道, 但尚未见到对视网膜组织中脂质过氧化产物的荧光测定法, 故我们参考用于肝组织中的 TBA 比色法^[1-3], 建立了家兔视网膜组织脂质过氧化反应产物的荧光测定法。

水使总体积为 2.5 毫升, 再加正丁醇-吡啶溶液 [15:1(V/V)] 3.5 毫升, 摇二分钟, 4000rpm 离心 10 分钟。取上清液, 加 1 滴无水乙醇。采用日立 MPF-4 型荧光分光光度计, 以 515nm 为激发光, 测定 553nm 处的荧光强度。

$$\text{视网膜组织 TBA 值} = 0.5 \times \frac{f}{F}$$

$$\times \frac{10}{0.02} \times \frac{1}{1000}$$

$$= 0.25 \times \frac{f}{F} \text{ nmol MDA/mg 湿组织}$$

F: 标准物质 [1, 1, 3, '3-四乙氧基丙烷 (MDA) 0.5nmol] 的荧光强度。

f: 样品物质的荧光强度。

一、方法步骤

脂质过氧化物降解产物中的丙二醛与硫代巴比妥酸反应, 缩合成红色化合物, 此产物可用荧光法测定, 其最大吸收光谱与发射光谱分别为 532nm 与 553nm。

操作步骤如下: 取家兔(体重 2.0—3.0Kg) 的视网膜组织(在冰盒内剥离), 加冷生理盐水研磨二分钟, 制成 10% 匀浆液, 然后取此匀浆液 0.02 毫升, 加 8.1% SDS (Sodium dodecyl sulphate) 0.1 毫升。摇匀, 加 20% 醋酸缓冲液 (pH3.5) 0.75 毫升、0.8% TBA 水溶液 0.75 毫升、重蒸馏水 0.38 毫升, 摇匀后置 95℃ 恒温水浴中加热 1 小时。然后, 以流水冷却至室温, 加

二、结果与讨论

1. 实验结果表明, 丙二醛含量在 1.0nmol 范围内(或当组织匀浆量在 50 微升内), 其含量与 TBA 反应产物的荧光强度呈直线关系。

2. 样品的 TBA 荧光产物经荧光扫描, 其

- [3] 范慕贞, 《生理科学》, 6, 41, 1986.
- [4] Heby, O.: *Differentiation*, 14, 1, 1981.
- [5] Pegg, A. E. et al.: *Am. J. Physiology*, 243, C212, 1982.
- [6] Jurij, R. et al.: *Cancer Res.*, 44, 3226, 1984.
- [7] O'Brien, T. G.: *Cancer Res.*, 36, 2644, 1976.

- [8] 李士谔等: 《中国医学科学院学报》, 4, 142, 1982.
- [9] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951.
- [10] Russell, D. H. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 60, 1420, 1968.

【本文于 1987 年 3 月 16 日收到】