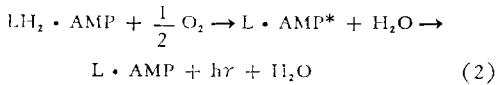
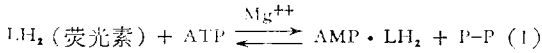


微量 ATP 的荧光素酶分析方法的研究

李立人 孙炳荣

(中国科学院上海植物生理研究所)

利用荧光素酶发光系统、测定 ATP 及有关的代谢物和酶的方法首先为 McElvoy^[1] 和 Strechler^[2] 报道。荧光素酶系统的发光机制可归纳为二步反应:



由于这一反应系统简单、快速、灵敏、专一性强,因此,不仅在生命科学研究中有重要的用途^[3,4,5],而且在工农医生产中,也得到日趋广泛的应用^[6,7]。

本文旨在说明: 1. 自己装置的测量仪器灵敏度高,可测定系统中 10^{-15} moles ATP 的变化、重复性好,相对误差小于 1%, 2. 研究 ADP 对 ATP 测定的影响, 3. 比较不同提取方法,对叶子中 ATP 含量测定结果的影响。

材料和方法

仪器结构和操作: 发光测定仪结构见图 1。测定时,先在 2 毫升的比色杯中注入 0.5 毫升的样品,然后用注射器快速注入 1.5 毫升荧光素酶溶液,同时记录发光系统的发光动力学曲线。

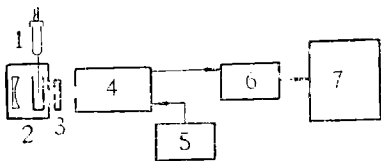


图 1 发光测定仪结构图

(1) 注射针 (2) 暗盒、光学元件、比色杯 (3) 滤光片 (4) 光电倍增管 (EMI 9558B) (5) 高压电源 (6) 补偿器或前置放大器 (可用静电计、也可用具有场效应管,作为输入级的一般放大器) (7) 记录仪 (XWT-200)

荧光素酶制备: 称取萤火虫尾 100 毫克,加少量缓冲液 (0.05M 甘氨酸、1mM EDTA, 0.1% 牛血清蛋白, 10mM MgSO_4 , 用 KOH 调节到 pH7.4) 在 4℃ 研磨,放暗室中 2—3 小时后,于 4℃ 1500g 离心 15 分钟,倾出上清液,用缓冲液稀释到 50 毫升。此酶制剂存放在冰箱中 (4℃)、三天内酶活力不变。放在 -15℃ 的冰箱内,一个月内酶活力保持稳定。

标准 ATP 溶液制备: 取上海生物化学研究所东风试剂厂生产的 ATP- Na_2 (含量 90% 以上)用重蒸馏水配成 $10^{-3}M$ 溶液, 1N NaOH 调 pH7.4—7.7; 放置于 -15℃ 水箱备用。

菠菜叶子中 ATP 提取法: (1) 加热提取法。称菠菜叶子 2g 加 4 毫升蒸馏水; 低温研磨; 立即置于沸水浴上煮沸 15 分钟后离心, 取上清液存冰浴中待测。(2) 过氯酸提取法。称菠菜叶子 2 克, 同研钵一起放低温冰箱中冷却; 然后用 6% 冷的过氯酸溶液 40 毫升研磨; 并用 3M 碳酸钾中和; 再离心, 上清液放冰浴中待测。

结果与讨论

一 ATP 加荧光素酶系统发光强度与时间曲线测定

将过量的荧光素酶 (2 毫克虫尾/毫升) 注入 ATP 溶液中, 得系统的发光强度对时间响应曲线 (图 2)。酶液注入 ATP 溶液的速度快慢直接影响着最大发光强度 $I_{\max}$, 当酶液量一样, ATP 浓度也相同时, 注入酶液速度快的 $I_{\max}$ 大于注入速度慢的 $I_{\max}$, 但 I_0 基本相同 (图 3) 发光强度相对误差小于 1%, 因此选用 I_0 与 ATP 浓度的函数关系, 作标准曲线。

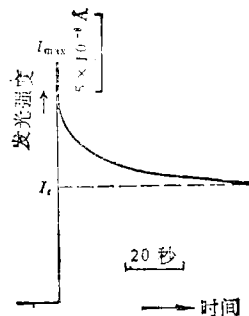


图 2 荧光素酶 + ATP 系统发光曲线

ATP 浓度: 7×10^{-10} moles/0.5

毫升; 酶液 1.5 毫升。

$I_{\max}$: 系统发光的最大强度。

I_0 : 时间 (0) 的发光强度。

二 标准曲线制作

在上述测定系统中, 我们用 10^{-14} — 10^{-9} moles, 及 10^{-10} — 10^{-9} moles 二种范围的 ATP 内进行作图 (图

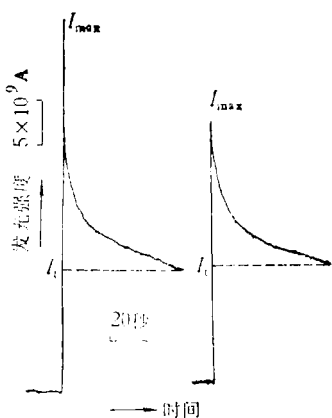


图3 不同注入酶液速度对 I_{max} 的影响
(测定液组成同前)

4、5), 发现在 10^{-14} — 10^{-10} moles 范围内发光强度 I_x 和 ATP 成函数关系 (图 4), 这是由于在特定工作电压下的光电倍增管接收的发射光与光阴极产生的光电流是双相关系所引起。为了避开双相曲线的转折点, 必须选择合适的光电倍增管工作电压。但是在实际工作中, 不会遇到如此宽的工作浓度范围; 有了如图 4 这样四个数量级的工作曲线范围已足够。然而必须指出, 当在测定 10^{-14} — 10^{-10} moles ATP 变化时, 必须提高放大器的灵敏度或改变倍增管的高压, 使在这范围的直线斜率增加。这对测定微量 ATP 变化是非常重要的。

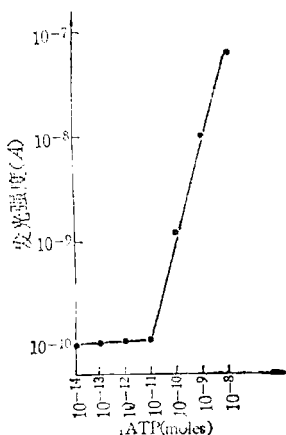


图4 标准曲线

发光强度数值是在发光液混合 1 分钟时的读数; 测定液组成同图 2。

此外, 在同一数量级内, 不同量 ATP 与发光强度也呈线性关系 (图 5)。

必须指出, 当用新鲜的酶制剂时, 由于酶活力随时间变化而下降, 因此在定量测定 ATP 时, 必须随时制作标准曲线。但由于反应液组成不一样, 用作工作

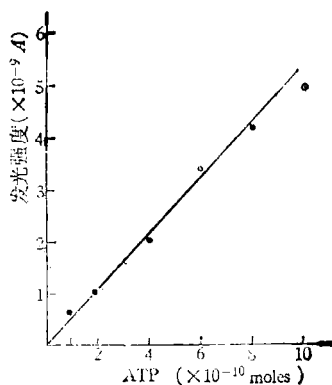


图5 标准曲线 (测定液组成同前)
发光强度数值是在发光液混合 1 分钟时的值数。

曲线的方法对 ATP 进行定量分析误差较大, 因此也可以采用内标法定量测定 ATP, 即首先测出未知 ATP 样品的发光强度 I_x , 待发光达到稳定后, 加入在线性范围内的、已知浓度的 ATP (图 6), 再测其发光强度 I_k 。最后按下式求出未知 ATP 的浓度: $C_x = \frac{I_x}{I_k} \times C_k$ 式中 C_x 、 C_k 已知分别为测定系统中未知和已知 ATP 的浓度, I_x 、 I_k 分别为未知和已知 ATP 浓度的实测发光强度。当 $C_k = 1.25 \times 10^{-10}$ moles 从图 6 中可求得 $C_x = 2.7 \times 10^{-10}$ moles。

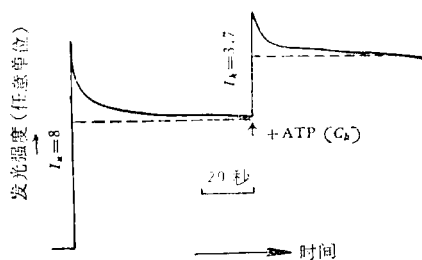


图6 内标法测定 ATP 含量

三 ADP 对样品测定的影响

由于粗的荧光素酶制剂中有肌酸激酶的存在, 因此 ADP 的存在会干扰 ATP 的正确测定。从图 7 和表 1 看出, 无论 ADP 与 ATP 的比例为多少, 最初发光高峰基本相同; 在 $ADP/ATP = 10$ 情况下对光发射曲线形状影响不大; 但 ADP 浓度增加到 ATP 的 25 倍以上时, 发光曲线过了高峰后, 曲线形状显著不同。这是由于肌酸激酶的反应速度远远低于荧光素酶, 因此在测定初速情况下, 可显示出荧光素酶单独的反应, 但在发光高峰过后, 由于肌酸激酶的作用, 使 ADP 转化为 ATP, 因而同原有的 ATP 一起呈现出不同的发光强度。这说明当样品中存在 ADP 时必须测初速的高峰值。但必须注意注入酶制剂的速度保持恒定。

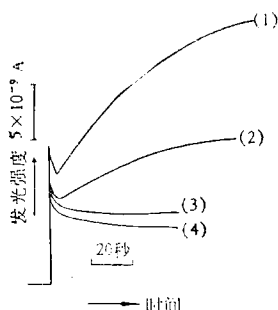


图7 不同ADP量对ATP-荧光酶系统发光的影响

(1) ATP:ADP = 1:50; (2) ATP:ADP = 1:25;
(3) ATP:ADP = 1:10; (4) ATP系统(测定液
同前, ATP量为 1×10^{-10} moles)。

表1 不同ATP/ADP时不同时间的发光高度比较

ADP/ATP	相对对照5秒时闪光高度%	
	5秒	20秒
对 照	100	54.5
10	109	63.6
25	100	86.3
50	104	12.7

四 不同提取方法对菠菜叶子中ATP测定结果的影响:

在温室培养的菠菜, 分别进行三小时光或暗处理后, 摘取叶子测定ATP, 结果见表2。可以看出, 用过

表2 用不同提取方法对ATP测定的影响

提取方法	照 光	遮 光
过氯酸法	28.3	13
水加热法	26.5	16

表中数值为相对发光值

氯酸法提取的样品, 光暗差异比水加热法大。而水加热法提取样品中的ATP, 对于照光的叶子来说, 要比过氯酸法提取样品中的ATP少, 而在遮光叶子中却相反, 这是因为叶子中肌酸激酶的耐热性高, 在照光叶子中ATP占优势时, 趋向使ATP分解, 而在遮光叶子中, ADP相对增加时, 肌酸激酶又使ADP转化为ATP, 而过氯酸提取时, 叶子中肌酸激酶立即失活, 不影响ATP的变化, 由此可以认为用过氯酸法提取叶子样品较水加热法为优越。

参 考 文 献

- [1] McElroy, W. D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **33**, 342, 1947.
- [2] Strechler, B. L. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **40**, 28, 1952.
- [3] Del Valle-Tason, S. et al.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **504**, 26, 1978.
- [4] Strechler, B. L.: *Methods of Enzymatic Analysis*. (Ed Bergmeyer, H. U.) p. 559, 1963.
- [5] Lencesters, J. J.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **55**, 1262, 1973.
- [6] Picciolo, G. L.: *Yale Sci.*, **48**, 2, 1973.
- [7] Seitz, W. R. et al.: *Anal. Chem.*, **46**, 188A, 1974.

[本文于1979年9月20日收到]

一种简易分离高纯度血清白蛋白的方法

陈建文 静国忠

(中国科学院生物物理研究所)

血清白蛋白是动物肝脏细胞分泌的一种蛋白质, 在血液循环、解毒、脂类代谢等方面执行着多种重要的生物功能。在生物化学与免疫学研究中广泛用作生物大分子(酶、抗原)的稳定剂、模型抗原以及半抗原的载体。近年来, 人们又把肝白蛋白作为研究 mRNA 的调控和蛋白质的生物合成的重要材料, 并取得了重要进展。

最早, 普遍应用硫酸铵重结晶法从血清中分离白蛋白, 但此法的选择性极差。也有人用一定的 pH 和

有机溶剂从血清中沉淀各种不同的蛋白质, 此法的专一性也较差, 而且在整个实验过程中要严格控制温度和 pH, 否则蛋白质极易变性。A. Polson^[1]等人报道聚乙二醇(PEG6000)在室温下能高度选择性地沉淀蛋白质, 采用此法从血清中沉淀白蛋白不引起变性^[2,3]但是它的选择性受 pH 和 PEG 浓度的影响, 故实际上很难使纯化的白蛋白不污染少量的球蛋白。有人采用辛酸钠保护白蛋白, 得到较好的效果^[4]。我们综合以上方法, 用辛酸钠-聚乙二醇法, 简单有效地从豚鼠血