

## 利用分光光度法测定 ATP 酶的水解活力

李生广      孙 珊

(中国科学院生物物理研究所)

1960 年 Pullman 等<sup>[1]</sup>首先在 ATP 再生系统存在下用分光光度法测定了 ATP 酶水解活力,因为此法在高浓度 Pi 条件下也能使用,且更适宜测定初速度,因而国外不少实验室相继使用。使用此法时需要丙酮酸激酶 (PK) 和乳酸脱氢酶 (LDH) 以及高纯度的腺三磷 (ATP) 等,所以目前国内用它测定 ATP 酶活力虽有报道<sup>[2]</sup>但数量很少。我们用中国科学院生物物理所生化制备厂生产的丙酮酸激酶 (内含乳酸脱氢酶活力) 和北京市五星啤酒厂生产的高纯度 ATP (大于 98% 纯度),将 Pullman 的实验体系稍加修改,在 340nm 处顺利地测定了 ATP 酶的水解活力。

上述方法原理是: 当体系中有  $Mg^{+2}$  时 ATP 酶水解 ATP 为 ADP (腺二磷) 和无机磷,继而丙酮酸激酶将烯醇式丙酮酶 (PEP) 中的高能键磷转到 ADP 上,重新生成 ATP,同时产生丙酮酸,这时在还原辅酶 I (NADH) 存在下乳酸脱氢酶将丙酮酸转变为乳酸,并使 NADH 氧化为氧化型辅酶 I (NAD)。这一系列酶促反应中 ATP 的水解和 NADH 的消耗是等克分子的。NADH 在 340nm 处有特定的吸收峰,因此只要测定 340nm 处光密度的减少量,通过计算,求出 ATP 的水解量,即可知道 ATP 酶的活力单位和比活力。在这种连续的酶促反应中,必须加入过量的 pK 和 LDH 避免 pK 和 LDH 催化的反应速度限制 ATP 酶水解反应速度,以保证准确地测量 ATP 的水解量。

反应体系为: 每毫升反应液中  $42\mu$  moles Tris-马来酸 pH8.0,  $1.67-2.5\mu$  moles  $MgSO_4$ ,

$1\mu$  mole PEP,  $0.15\mu$  mole NADH,  $1\mu$  mole ATP, 1.73 单位 pK (原液  $5\mu$ l, 内含 0.7 单位 LDH), 反应总体积为 2ml。

测定 ATP 酶水解活力时,先将 Tris-马来酸,  $MgSO_4$ , PEP, NADH, pK (含 LDH) 及适量水混合,  $30^\circ C$  预保温 3'—5',再加入 ATP, 保温 30"—1', 然后加入猪心线粒体  $F_1$ -ATP 酶, 立即在 340 nm 处测光密度随时间的变化 (间隔 5 秒或 10 秒连续记录) 然后按公式计算 ATP 酶的活力。活力单位是按每分钟水解  $1\mu$  mole ATP 定为 1 个单位。

按下列公式计算比活力:

$$\text{比活(单位/毫克酶蛋白)} = \frac{\Delta A_{340}}{t(\text{分})} \times \frac{1}{V(\text{ml})} \times \frac{1}{C(\text{mg/ml})} \times 2 \times \frac{1}{6.22}$$

式中:  $\Delta A_{340}$  为  $t$  时间内  $A_{340}$  下降值  
 $t$  (分) 为测得  $\Delta A_{340}$  所经历的时间 (以分计算)

$V(\text{ml})$ : 所加样品的体积 (以毫升计算)

$C(\text{mg/ml})$  ATP 酶的浓度 (以毫克蛋白/毫升计算)

2: 反应的总体积 (2ml)

6.22 为 NADH 的消光系数

我们使用 Beckman 分光光度计,在上述条件下,30 秒内测得的酶活力在 0.026—0.260 单位范围内呈线性关系 (见图 1)。

同一个 ATP 酶样品用本法测活与用定无机磷法测活进行了比较,所得结果是一致的。

使用这种方法,需注意以下几点:

(1) PK 制剂中含有 LDH, 所以使用前可按方法 [3] 检查 LDH 活力, 并按不低于要求量加入反应体系。同一个实验也可测出 NADH 实际含量, 并可根据称出量, 计算 NADH 的百分含量。

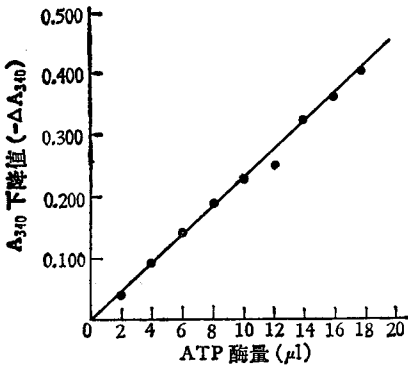


图1 不同 ATP 酶量与水解活力的关系

条件见正文, ATP 酶浓度是 0.2mg 蛋白/ml

(2) 如果遇到问题, 可按如下步骤鉴定反应体系是否正常, a) 按测定方法操作, 加入 ATP 和 ATP 酶之前,  $A_{340}$  一般应在 1,000 左右。如果数值太低或连续下降则表明 NADH 含量低, 或体系中有使 NADH 氧化的杂酶等。b) 按量加入 ATP, 重测  $A_{340}$ , 除因自然稀释浓度变化导致  $A_{340}$  降低外, 一般  $A_{340}$  应基本不变或变化不大, 且很快停留在一个固定值。如  $A_{340}$  迅速下降, 则说明 ATP 不纯, 含有一

定量的 ADP。下降值越大, ADP 含量越高。出现此种情况不能用此法测活。c) 按量加入 ATP 酶后, 应能迅速反应,  $A_{340}$  规律下降。如  $A_{340}$  不变化, 可加入 ADP 检查, 若  $A_{340}$  能迅速下降, 说明 ATP 酶没有活力; 如  $A_{340}$  仍不变化, 则应考虑 PK 或 LDH 有问题, 或活力不高, 或未加入。

(3) 欲测定的 ATP 酶样品, 应预先检查有无使 NADH 氧化的杂质。即反应体系中不加 ATP, 而加入样品后看  $A_{340}$  有无下降。如不降低, 则可用此法。如稍有下降, 必须扣除空白对照。如下降甚大, 则不能用此法测活。

总之, 与测无机磷方法相比, 此法快速, 简便, 经济, 使用 ATP 酶量少 (我们的实验中只使用测无机磷方法的 1/10 酶量), 适于监测反应速度, 高浓度 Pi 存在时仍可使用。

我们还用这个方法测定了人血红细胞膜的钠钾泵 ATP 酶, 反应过程中膜蛋白用量仅为 20μg/ml, 远远小于测无机磷法的膜用量, 可能更适于临床上应用。

## 参 考 文 献

- [1] Pullman, M. E. et al.: *J. Biol. Chem.*, 235(11), 3322, 1960.
- [2] 黄芬等: 《实验生物学报》, 14, 117, 1981.
- [3] Tietg, N. W.: *Fundamental of Clinical Chemistry*, 434, 1970, W. B. Sacendess Company.

〔本文于1983年3月16日收到〕

# 聚丙烯酰胺凝胶电泳蛋白带的特异快速染色法

李成文 时华富 邵军石

(中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京)

目前在各类聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 中, 对凝胶中蛋白带的染色, 均采用考马斯亮兰 G 或 R 染液, 国内外文献报告的种类繁多的染色方法, 均可使不含蛋白的凝胶着色, 且需较长时间脱色才能观察结果。因而常常影响结果的判断。为克服上述缺点, 我们建立了一种对各种

PAGE 技术均可使用的特异、快速又灵敏的考马斯亮兰 G 的染色法, 不仅简单易行, 而且背景不染色。

## 一、材料与试剂

1. 狗血清、小牛血清、牛血清白蛋白 (BSA,