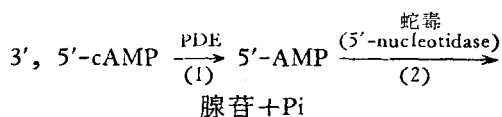


# 一种快速可靠的 3', 5'-cAMP 磷酸二酯酶活力测定法

张林华 吴兆锋 刘秉文 蓝天鹤

(华西医科大学生物化学教研室, 成都)

磷酸二酯酶 (PDE; E. C. 3. 1. 4. 17.) 催化 cAMP 分解为 5'-AMP, 它与质膜上催化 cAMP 生成的腺苷酸环化酶配合, 共同控制细胞内 cAMP 含量. 因此, 观察 PDE 活力变化对于研究环腺苷酸在细胞代谢调控中的作用具有重要意义. PDE 活力测定多采用放射性同位素标记的 cAMP 为底物. 由于一般粗酶样品中同时存在多种 5'-核苷酸酶, 使 5'-AMP 分解而引起误差, 因此常将经 PDE 作用后生成的 5'-AMP 转化为腺苷测定. 基本反应如下.



将阴离子交换树脂直接加入反应液中, 吸附除去 cAMP 后, 离心取上清液测定腺苷的放射性, 即可代表 PDE 活性. 此法称作 "Batch" 技术<sup>[1]</sup>. 该法简便, 应用较广, 但水溶性体积较大, cAMP 与腺苷分离不全, 空白较高. 作者采用酸化树脂的方法, 调整实验条件, 避免了水溶性体积较大带来的不便, 建立了一种快速可靠的 PDE 测活方法.

## 一、材料与方 法

### 1. 材料

<sup>3</sup>H-cAMP, 比放射性为 23 Ci/mmole, 放化纯度 95% (上海原子核所). 腺苷, Merck 公司

从而使可纯化的领域大为扩展. 加之较传统亲和层析更优越, 而具有广阔应用前景. 笔者认为, 不久这一技术将在对生物大分子结构和功能的研究中直接发挥作用. 同时, 和在其它方面的应用一样, 迫切需要对 McAb 理化及特定生物学性质的深入了解, 以建立更高效、快速、适应性强及应用更广泛的亲和层析方法.

### 参 考 文 献

[1] Hissey, P. H. et al.: *J. Immunol. Methods*, **78**, 211, 1985.  
 [2] Updyke, T. V. and G. L. Nicolson: *ibid.*, **73**, 83, 1984.  
 [3] Bird, P. et al.: *ibid.*, **71**, 97, 1984.  
 [4] Nielsen, L. S. et al.: *Biochemistry*, **21**, 6410, 1982.  
 [5] Le, J. et al.: *J. Immunol. Methods*, **69**, 61, 1984.  
 [6] Hsiung, L. M. et al.: *Biochem. J.*, **203**, 293, 1982.  
 [7] Lundblad, A. et al.: *J. Immunol. Methods*, **68**, 227, 1984.  
 [8] Lindmark, R. et al.: *ibid.*, **62**, 1, 1983.

[9] Langone, J. J.: *ibid.*, **55**, 277, 1982.  
 [10] Schneider, C. et al.: *J. Biol. Chem.*, **257** (18), 10766, 1982.  
 [11] Fornstedt, N.: *FEBS*, **177**(2), 195, 1984.  
 [12] Perry, G. A. et al.: *Prep. Biochem.*, **14**(5), 431, 1984—85.  
 [13] Bazin, H. et al.: *J. Immunol. Methods*, **71**, 9, 1984.  
 [14] Stanker, L. H. et al.: *ibid.*, **76**, 157, 1985.  
 [15] Steward, M. W. and A. M. Lew: *ibid.*, **78**, 173, 1985.  
 [16] Jacobsen, C. et al.: *ibid.*, **50**, 77, 1982.  
 [17] Cook, J. et al.: *Mol. Immunol.*, **22**(5), 531, 1985.  
 [18] David, F. et al.: *ibid.*, **22**(3), 339, 1985.  
 [19] Li, C. K. N.: *ibid.*, **22**(3), 321, 1985.  
 [20] Friguet, B. et al.: *J. Immunol. Methods*, **77**, 305, 1985.  
 [21] Tigyi, G. J. et al.: *Mol. Immunol.*, **21**(10), 889, 1984.  
 [22] Randle, B. J. et al.: *J. Immunol. Methods*, **77**, 25, 1985.  
 [23] Chao, J. et al.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **801**, 244, 1984.

[本文于 1985 年 4 月 17 日收到]

产品。cAMP, 西德产品。蛇毒(眼镜王蛇), Sigma 公司产品。阴离子交换树脂(Dowex-1, 氯型, 200—400目), Serva 公司产品。树脂经碱和酸处理后, 于40—50°C 烘干。称取适量树脂用 3mM HAc 配制。

## 2. 方法

### (1) PDE 粗酶的制备

大白鼠断头处死, 取出所需组织(肝、脑、肌肉、肾、心、脂肪等)。称取适量, 按 1/10 (W/V) 加入匀浆介质(50mM Tris-HCl, pH7.5, 5mM MgSO<sub>4</sub>), 在玻璃匀浆器内于冰浴中制成匀浆。离心, 1,000 × g 10 分钟。取上清液, 置 0—4°C 冰箱保存, 五天内活力无明显改变。

### (2) PDE 活力测定

酶反应液含有 50mM Tris-HCl, pH7.5, 5mM MgSO<sub>4</sub>, 75mM 巯基乙醇, 25μM cAMP (2 × 10<sup>4</sup>cpm), 加入适量粗酶提取液, 总体积

为 200μl。另外, 以加入匀浆介质代替酶液作为空白对照管。总计数管则不加酶样品而用匀浆介质补充使总体积为 400μl。上述各管于 35°C 保温 10 分钟后置沸水浴内准确加热 1 分钟终止反应。室温自然冷却, 每管加入 50μl 蛇毒(1 mg/ml), 混匀后, 继续于 35°C 保温 15 分钟。再于沸水浴内加热 1 分钟灭活。冷却后, 加入 50μl 10mM 腺苷作为载体, 在电磁搅拌器上不断混匀下再加入 200μl 25% (W/V; 3mM HAc) Dowex-1 树脂糊(总计数管不加), 置振荡器上混匀, 并于 2,500rpm 离心 5 分钟。取上清液 200μl 于闪烁瓶内, 加入 3ml 无水乙醇和 7ml 闪烁液(0.4% TP 或 PPO; 0.01% POPOP 的二甲苯溶液)于液体闪烁谱仪上计数测定。

粗酶蛋白含量按 Bradford 法<sup>[2]</sup>测定, 以牛血清白蛋白为标准。PDE 活力表示法:

$$a. \text{ } ^3\text{H-cAMP 水解率} = \frac{\text{样品管 cpm} - \text{对照管 cpm}}{\text{总计数管 cpm} - \text{对照管 cpm}} \times 100\%$$

$$b. \text{ cAMP 百分转化率} = \frac{5 \times 10^3 \text{ pmol cAMP} \times (\text{样品管 cpm} - \text{对照管 cpm}) \times 100\%}{(\text{总计数管 cpm} - \text{对照管 cpm}) \times \text{蛋白量 (mg)} \times \text{反应时间 (分)}}$$

## 二、结果

### 1. 底物 <sup>3</sup>H-cAMP 及 cAMP 对 PDE 活力的影响

将 <sup>3</sup>H-cAMP 与 cAMP 配成在 200μl 反应液中比放射性为 1.2、2.4、4.8 × 10<sup>4</sup>cpm/25μM

cAMP, PDE 活力随之而线性增加(见图 1)。我们选择, 35°C 保温 10 分钟, pH7.5, 200μl 反应液中 cAMP 浓度为 25μM 时, <sup>3</sup>H-cAMP 放射性为 2 × 10<sup>4</sup>cpm 为宜(仪器对 <sup>3</sup>H 的测定效率为 65%)。

### 2. 酶浓度对 PDE 活力的影响

PDE 是具有复杂动力学的酶体系。本法

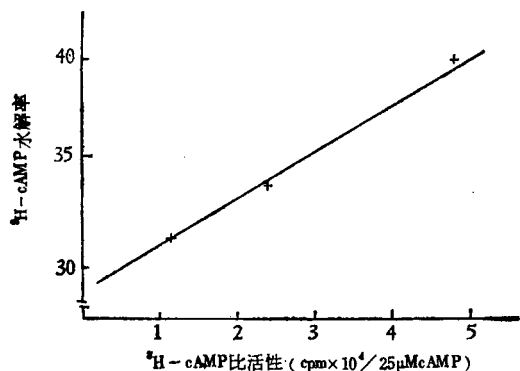


图 1 <sup>3</sup>H-cAMP 比活性对 PDE 活力的影响  
含 120μg 脑匀浆蛋白的反应液 200μl,  
35°C, 10 分钟

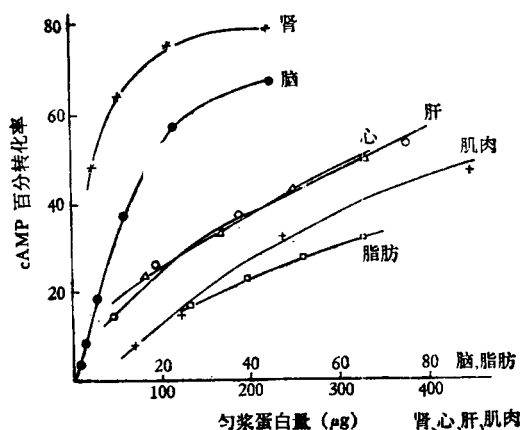


图 2 酶浓度对 PDE 活力的影响

测定的主要是与膜结合存在的低  $K_m$  值 PDE。测定样品时,应选择“酶浓度-反应”曲线中的直线部分为合适的酶用量(见图 2)。

### 3. 反应时间对 PDE 活力的影响

由图 3 可见,在 0—20 分钟内, PDE 活力随反应时间增加而增加。

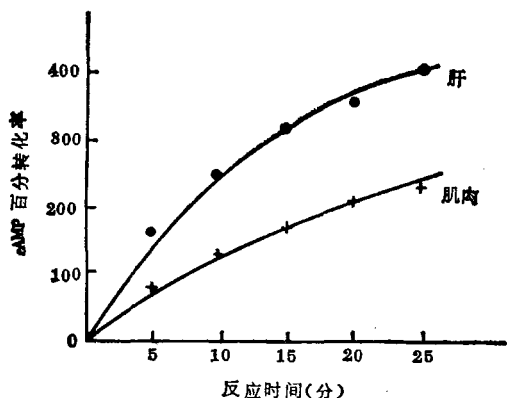


图 3 反应时间对 PDE 活力的影响

### 4. Dowex-1 型树脂分离 cAMP 及腺苷效果的鉴定

文献报道,用 30% 乙醇<sup>[3]</sup>,或用 3mM HAc<sup>[4]</sup>代替水配制阴离子交换树脂,或用 0.1M NaHCO<sub>3</sub> 作为阴树脂柱层析洗脱液<sup>[5]</sup>能改善 cAMP 的分离,及腺苷和 5'-AMP 酶解产物的回收。我们实验中发现,用 3mM HAc(pH3) 配制的树脂分离 cAMP 和腺苷效果较好。利用紫外吸收和放射性测定经 25% (W/V; 3mM HAc) Dowex-1 阴树脂 200 $\mu$ l 处理后 cAMP 的清除及腺苷的回收情况见表 1。

表 1 Dowex-1 阴树脂分离 cAMP 和腺苷效果的鉴定\*

	紫外吸收测定 ( $\lambda = 260\text{nm}$ )	放射性测定 (cpm)
cAMP 清除(%)	95.9 $\pm$ 0.5( $n=5$ )	90.0 $\pm$ 0.1( $n=7$ )
腺苷回收(%)	68.9 $\pm$ 0.9( $n=14$ )	—

\* 以加入 cAMP 及腺苷后的 O.D.<sub>260</sub> 值或 cpm 为 100% 表内数据示  $\bar{x} \pm S. D$  (测定次数)

实际测定脑匀浆 PDE 活力, <sup>3</sup>H-cAMP 水解率最大值为 77.9 $\pm$ 1.2% ( $n=14$ )。这说明用紫外吸收法测得的腺苷回收率与实际回收率

基本上接近。

### 5. 重复性

同一脑匀浆样品作 9 支平行管测定 PDE 活力, C. V. = 5.1%。间隔两天测定同一肝匀浆样品,误差为 2.2% ( $n=12$ )。这表明,除 PDE 自身稳定外,测定方法具有良好的重复性。

## 三、讨 论

PDE 具有较复杂的动力学行为,以多种形式存在<sup>[6]</sup>。Thompson 和 Appleman 等<sup>[1]</sup>较早报道了两种即高  $K_m$  值 ( $1 \times 10^{-4}M$ ) 和低  $K_m$  值 ( $5 \times 10^{-6}M$ ) PDE。它们的分布、动力学性质及底物特异性不同,其作用机理及生理功能尚未阐明<sup>[6]</sup>。在作 3', 5'-cAMP-磷酸二酯酶活力测定中,我们亦观察到在一定底物浓度时,随酶量增加, PDE 活力增加呈类似 S 型曲线变化(图 2)。

任何一种 PDE 活力测定法,都应尽量使 PDE 作用的产物全部回收;在二步保温法中,还应包括 5'-AMP 分解产物腺苷,以及肌苷、次黄嘌呤、嘌呤等的回收<sup>[4,5]</sup>。最初用 Batch 技术测定 PDE 活力时,腺苷回收约为 60%,空白较高<sup>[1]</sup>。Boudreau 等<sup>[4]</sup>用 3mM HAc(pH3.0) 配制阴树脂分离,使腺苷,肌苷等主要产物(以 O.D.<sub>260</sub> 值计)几乎全部回收。与之相比,我们测得腺苷的回收偏低,但与实际测定 cAMP 水解率基本吻合。且操作简便快速,不需要浓缩或用特殊的水溶性高的大量闪烁液,更适于一般研究工作的需要。

关于影响回收和空白的因素,我们发现, Dowex-1 树脂用量在 20—30% (W/V; 3mM 醋酸) 200 $\mu$ l 时,对 cAMP 的分离和腺苷的回收较为合适。加树脂后振摇或置振荡器上 15 秒至 5 分钟对 cAMP 分离和腺苷回收无影响。文献报道,终止酶反应的方法不同会影响测定空白值。我们采用加热的方法终止酶反应,发现用 7.5  $\times$  1cm 小试管在沸水浴内加热 45—90 秒钟,对测定结果没有明显的影响;但加热 5 分钟与 1 分钟比较,前者空白增高 13%。因此,应

## 一种灵敏实用的 DNase I 定量测活方法

邹国林 曹新文 史平\* 朱汝璠

(武汉大学生物系)

DNase I 的测活方法有紫外吸收法<sup>[1]</sup>、同位素法<sup>[2]</sup>和荧光法<sup>[3,4]</sup>等。紫外吸收法简便,但灵敏度较低。同位素法灵敏度高,但实验条件要求高,且操作复杂。荧光法灵敏度较高,也简便,但影响因素较多。我们建立了一种以固定化 DNA 为底物的微量紫外吸收法,它较简便,灵敏度也较高。

### 材料与 方法

**材料:** DNase I (Seravac Laboratories 出品),小牛胸腺 DNA (上海牛奶公司出品),微晶纤维素(上海试剂四厂出品),TMD 缓冲液(50mM Tris-HCl, pH7.5, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT),其它试剂均为分析纯。

**仪器:** M750UVIS-A 型微量紫外可见分光光度计。

#### 方法:

1. 小牛胸腺 DNA-纤维素的制备 参照文献<sup>[5]</sup>。

2. DNA 结合量的测定 用紫外吸收法<sup>[6]</sup>和二苯胺法<sup>[7]</sup>分别测得每克纤维素上 DNA 的结合量为 13.12 毫克和 13.39 毫克,结果一致;

确定一相对较短的加热灭活时间,使空白值较低而稳定。此外,当 <sup>3</sup>H-cAMP 放化纯度降低时易使空白增高,此时可用纸层析等方法纯化后使用。若用缓冲液(匀浆介质)代替加热灭活后的粗酶提取液作空白对照,二者无差别。

### 参 考 文 献

[1] Thompson, W. J. and Appleman, M. M.: *Bioche-*

结合率在 93% 左右。

3. 酶单位数的测定 将 DNase I 配制成一定浓度的酶溶液,按文献<sup>[8]</sup>测定每毫升酶溶液所含的酶单位数。

4. 固定化底物的微量紫外吸收法 称取一定量的 DNA-纤维素,用 TMD 缓冲液配成 DNA 浓度为 115 微克/毫升的 DNA-纤维素悬浮液。每管取 0.5 毫升上述底物,加 0.5 毫升含 0.08% Triton X-100 的 TMD 缓冲液,振荡混匀后,4000rpm 离心 5 分钟。将上清液倾出,用滤纸条吸净残留液,加 50 微升含 0.04% Triton X-100 的 TMD 缓冲液,置于 37℃ 水浴预保温,再加一定量的 DNase I,连续振荡进行酶反应。反应完毕,加 50 微升 40mM EDTA 液终止反应,4500 rpm 离心 3 分钟,取 20 微升上清液测 A<sub>260</sub> 值。

(a) 酶反应进程曲线绘制 除空白对照管外,每管加酶液 1.6 个酶单位(按文献<sup>[8]</sup>测定),按不同的时间间隔终止反应。

(b) 反应速度与酶量关系由线绘制 根据

\* 本校生化专业 81 级学生。

*mistry*, **10**, 311, 1971.

[2] Bradford, M. M.: *Anal. Biochem.*, **72**, 248, 1976.

[3] Londesborough, J.: *ibid.*, **71**, 623, 1976.

[4] Boudreau, R. J. and Drummon, G. I.: *ibid.*, **63**, 388, 1975.

[5] Rutten, W. J. et al.: *Biochimica et Biophysica Acta*, **315**, 378, 1973.

[6] Greengard, P. and Robison, G. A. (ed): *Advances in Cyclic Nucleotide Research*, Vol. **8**, 119, Raven Press, New York, 1977.

[本文于 1985 年 5 月 13 日收到]