

pH-比色法测定 CaATPase 活力

陈 兰 英

(中国医学科学院心血管病研究所, 北京)

提 要

基于 ATP 被酶水解后 H⁺ 生成的速度作为酶活力的指标, 在 560nm 波长和 pH 7.4, 以酚红作指示剂, 建立了 pH-比色测定肌浆网 CaATPase (Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase) 活力的分光光度法。方法简易, 可观察反应进行的过程。SR CaATPase 对底物 ATP 的 K_m = 97.4 μmol/L; 在 22—42℃ 间求得活化能 (E_{Ca}) = 20.40 千卡。用本法初步观察了汉防己甲素(简称汉甲)对酶的抑制作用。

肌浆网 (sarcoplasmic reticulum, 简称 SR) 钙泵蛋白作为钙运转载体, 主要参与主动运送 Ca²⁺ 到 SR 内。Ca²⁺ 在 SR 的跨膜转运, 不仅在生理情况下涉及细胞内、外间的钙平衡和肌肉收缩与松弛等重要功能, 且在病理情况下还与细胞死亡和心血管疾病有关。

为研究 SR 的结构与功能的关系, 需要建立一个简便可靠和易于直接观察反应进行的方法。ATPase 催化底物 ATP 水解产生等克当量的 H⁺, 最适 pH 6.5—7.5, 在此范围内测定 H⁺ 生成的速度可作为酶活力的指标。本文在 560nm 波长, 以酚红作指示剂建立了 pH-比色测定 SR CaATPase 活力 (pH7.4) 的分光光度法。

材 料 和 方 法

试剂 牛血清蛋白 (BSA)、组氨酸 (L-histidine) 和乙二醇双乙胺醚-N, N' 四乙酸 (EGTA) 为 Sigma 产品。ATP-Na₂ 和酚红分别为 Mannheim 和 E. Merck 产品。CaCl₂ 和

蔗糖分别为 MC/B (USA) 和 Schwarz/Mann Inc. 产品。汉防己甲素系浙江金华制药厂生产。其余为国产保证或分析试剂。

SR 制备 参考 Katz 等人^[1]方法, 从兔骨骼肌中提取, 悬浮于 10% 的蔗糖溶液内。

蛋白质测定 按 Lowry^[2] 法, 以 BSA 为标准。

SR Ca ATPase 活力测定 总 ATPase (Total ATPase) 活力: 2 毫升反应液中内含 40mmol/L 组氨酸, 120mmol/L KCl, 12 μmol/L CaCl₂, 5mmol/L MgATP, 0.003% 酚红, pH 7.4。基础 ATPase (Basal ATPase) 活力: 上述反应液中省去 CaCl₂, 加入 1mmol/L EGTA。总 ATPase 活力减去基础 ATPase 者即为 Ca ATPase (即 Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase 或 Ca²⁺-dependent ATPase) 活力。采用日立 200 型 (带恒温装置) 的双光束分光光度计, 在对照和样品杯中各加 2 毫升反应液, 25℃ 平衡 10 分钟后, 置 560nm 波长处调节吸光度为 0, 加入 10 μl SR 蛋白到样品杯中以起动反应, 用记录仪描记 3

北京, 1981 年, 165—167 页。

[4] Holme, D. J. et al.: *Analytical Biochemistry*, Longman Inc., New York, 1983, p. 394.

[5] Ohnishi, S. T. et al.: *Anal. Biochem.*, 1978, **86**, 193.

[6] 薛国政等: 《生物化学与生物物理进展》, 1986 年, 5,

60。

[7] Alexander, R. R. et al.: *Basic Biochemical Methods*, Wiley J. & Sons, Inc, 1985, p. 14.

[本文于 1987 年 5 月 28 日收到]

分钟内吸光度差值 (ΔA_{560}) 的变化(或以手工记录每 15 秒钟时的 ΔA_{560})。酶活力以每分钟 ΔA_{560} 的变化 ($\Delta A_{560}/\text{分}$) 或以比活力即每分钟每毫克蛋白释放 H^+ 的微克当量数 (微克当量 $H^+/\text{毫克} \cdot \text{分}$) (简写 a) 表示。后者由实测 $\Delta A_{560}/\text{分}$ 值, 依据 $[H^+]$ 标准曲线(图 2) 和酶浓度再计算得出。

结 果

一、酚红的吸收光谱

有关 pH 比色法指示剂应具备的条件参看文献^[3]。根据 SR CaATPase 的最适 pH 在 6.5—7.5, 选用酚红 ($pK = 8.0$), 变色范围为 pH 6.4 (黄色)—8.4 (红色)。0.001% 酚红在 pH 8.4 时吸光度值在 560nm 最大。相反, pH 6.4 时最低 (图 1)。利用 560nm 时, 酚红在碱性和酸性范围内吸光度差值较大的特点, 可监测酶活力。

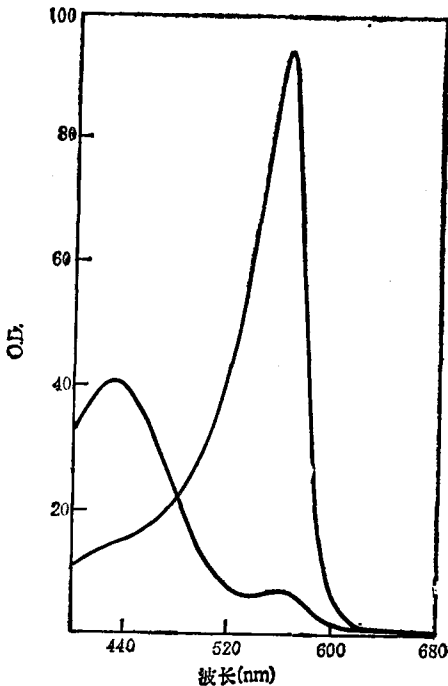


图 1 0.001% 酚红在不同 pH 下的吸收光谱

二、 $[H^+]$ 标准曲线

在各含 2 毫升反应液的样品杯和对照杯内分别加入 20—200 微升的 0.00985mol/L HCl

和 40—120mmol/L 的组氨酸—KCl 缓冲液 (pH 7.4), 于 25°C、35°C、40°C 和 50°C 分别测定 ΔA_{560} , 得到 $[H^+]$ 标准曲线(图 2), 其斜率为 1 微克当量 $H^+/\text{毫升}$ 所产生的 ΔA_{560} 的变化。结果表明 ΔA_{560} 与 $[H^+]$ 呈线性关系

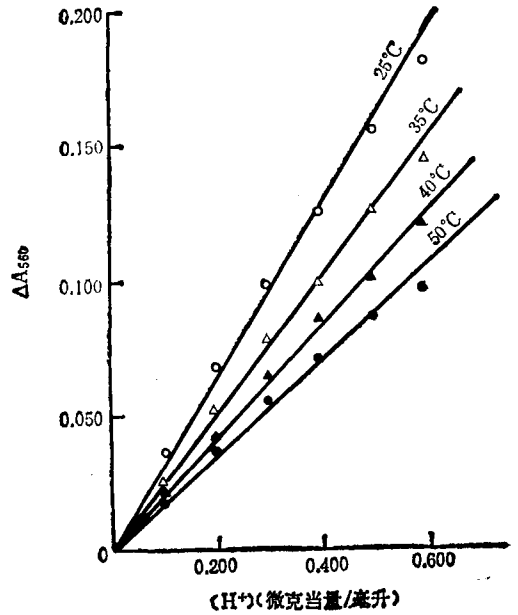


图 2 氢离子浓度的标准曲线

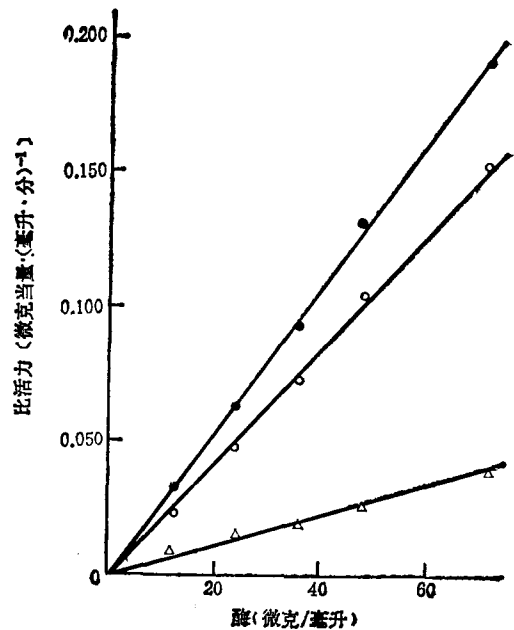


图 3 酶浓度曲线

○—○ Ca ATPase ●—● Total ATPase △—△ Basal ATPase

($r = 0.999$), 酚红可作为 pH-比色测活法的指示剂。随温度升高, 由 $[H^+]$ 的变化所引起 ΔA_{560} 的变化也减小。若以 25°C 时的斜率为 100, 则 30°C、35°C、40°C 和 50°C 时的结果分别为 25°C 时的 80%、83%、68% 和 55%。

三、酶浓度曲线

本实验条件下(25°C, pH7.4), SR 蛋白低于 72 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, 酶反应速度与酶浓度间呈线性关系(图 3) ($r = 0.999$)。

四、SR Ca ATPase 的 K_m 值

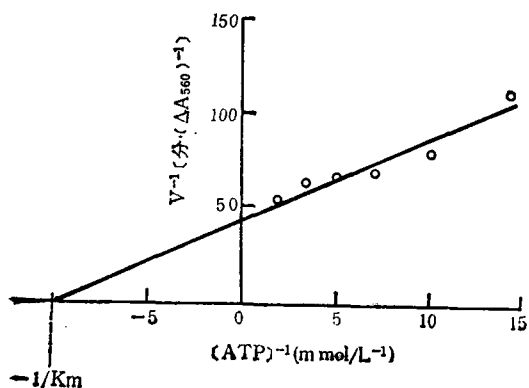


图 4 K_m —Lineweaver-Burk 作图

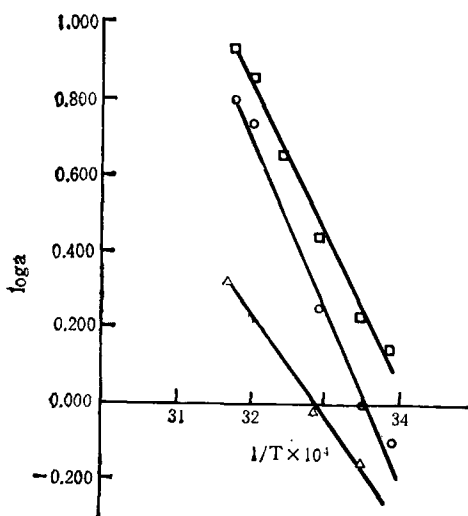


图 5 Arrhenius 经验方程求 ATPase 的活化能

○—○ Ca ATPase □—□ Total ATPase
△—△ Basal ATPase

SR CaATPase 为别构酶, 有 2 个 K_m 值^[4,5]。本文在 0.07—0.50 mmol/L ATP (5 mmol/L

MgCl₂), pH 7.4 和 25°C 时, K_m 值为 97.4 $\mu\text{mol}/\text{L}$ (图 4)。计算其协同系数 $n_H = 0.872$, 为负协同效应, 与文献值相似^[6]。

五、温度对酶活力的影响

据报道^[7] SR Ca ATPase 按 Arrhenius 方程作图, 在 20°C 时激活能有明显变化, 故本文仅观察 22°C、25°C、30°C、35°C、39°C 及 42°C 时酶反应速度的变化。在此范围内, 随温度升高, 酶活力也升高。将测得 $\Delta A_{560}/\text{分}$, 按其相同温度下的 $[H^+]$ 标准曲线和酶浓度换算成比活力(a), 以 $\log a$ 对 $1/T$ 作图, 求出总、基础及 CaATPase 的活化能 E_T 、 E_B 及 E_{Ca} 分别为 17.28、12.20 及 20.40 千卡(图 5)。应用此数据, 可将不同温度下测得的结果换算成同一温度下之比活力进行比较。

六、汉防己甲素对 SR Ca ATPase 的抑制作用

汉防己甲素(简称汉甲, 又叫粉防己碱)系从粉防己根提取的一种异喹啉类生物碱, 有抗心律失常及抗高血压等作用。采用本法, SR 蛋白为 72 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 汉甲对 SR Ca ATPase 活力有抑制作用(图 6)。在 500 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 内, 随汉甲浓度升高, 百分抑制增大, 与本实验室在 pH6.8 时, 用偶联酶法或定磷法所测结果相似。表明本法可用于开展有关酶性质等方面的研究。

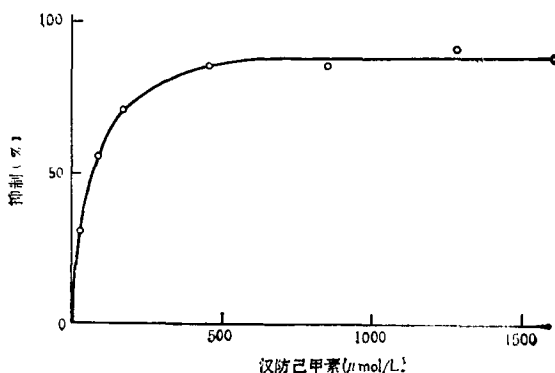


图 6 汉防己甲素对肌浆网 Ca ATPase 的抑制作用

讨 论

温度影响酚红指示剂的显色反应。随温度

升高, $[H^+]$ 标准曲线的斜率变小, 颜色反应的灵敏度降低(图1)。不同温度测活时, 应有其相应温度时的 $[H^+]$ 标准曲线。由于酶反应的温度效应, 在 22—42℃ 范围内, 应用本文依据 Arrhenius 方程作图求得的活化能 (E) (图5) 代入公式 $\log \frac{a_2}{a_1} = \frac{E(T_2 - T_1)}{2.303RT_1T_2}$, 可将实测温度 (T_2) 的结果 (a_2) 换算成所需温度 (T_1) 时的比活力 (a_1), 以校正温度对测定结果的影响。实际工作中, 在事先未测定不同温度时 $[H^+]$ 标准曲线的情况下, 由于酶活力主要通过测 $\Delta A_{560}/\text{分}$ 来反映, 也可采用 $\log(\Delta A_{560}/\text{分})$ 对 $1/T$ 作图, 求出常数 E' , 代入上式算出所需温度时的 $\Delta A_{560}/\text{分}$ 后, 再按相应温度时的 $[H^+]$ 标准曲线及酶浓度换算成比活力。

以 0.003% 酚红作指示剂, 以 pH7.4 时最敏感, pH6.8 时的 $[H^+]$ 标准曲线的斜率仅为 pH7.4 时的 19%。若酚红浓度增大为 0.008%, 则为 45%。

测 ATPase 活力较常用的有四种方法 (1) 比色法: 其一系测定无机磷产生, 可用 Chen^[8] 氏法或 Fiske-Subbarow 方法, 以陈氏法的灵敏度较高; 此法价廉, 故常被采用, 但在有无机磷参与时不能应用, 也不能观察反应进行的过程。其二为测定丙酮酸的产生^[9]。(2) 偶联酶法: 在 340nm 波长测定 NADH 的减少, 以定量酶活力^[10]。此法灵敏, 可观察反应的动态变化和不受无机磷干扰, 但由于引入工具酶, 影响因素较多, 费用亦较高。(3) $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ Martin-Doty^[11] 法: 此法最灵敏, 但需要 ^{32}P 标记的 ATP, 费用高, ^{32}P 半衰期短, 反应系统内不能有无机磷存在。(4) pH-stat 法 (恒 pH 法)^[12]: 对酶反应产生的 H^+ , 自动滴加微量碱中和之, 使反应体系维持恒 pH, 根据消耗的碱量计算其酶活力。Martonosi 和 Feretos 报道^[12] 用 pH-stat 法, 在 pH7.4 和 24℃ 时测得 SR CaATPase 活力的结果与 Fiske-Subbarow 法的相一致。但前者需要有恒 pH 的

特殊仪器设备。

根据 pH-stat 法原理和参考姚、邹报道^[3] pH-比色法测定肌酸激酶活力的要点, 本文从几种指示剂中选出酚红作指示剂, 建立了测定 SR CaATPase 活力 (pH7.4) 的 pH-比色法。酶浓度曲线(图3)表明, 酶反应速度与酶浓度 ($<72 \mu\text{g}/\text{ml}$) 间线性关系良好, 方法可用于测定反映 SR CaATPase 性质的参数 [如 $K_m(\text{ATP}) = 97.4 \mu\text{mol}/\text{L}$, 活化能 (E_{ca}) = 20.40 千卡] 和研究药物对酶活力的影响。本法的灵敏度约与测无机磷产生的方法 (Fiske-Subbarow) 相近, 尚待进一步比较; 初步分析两批活力不同的 SR 制备, 用本法 (pH7.4) 和陈氏定磷法 (pH6.8) 所得活力的相对值, 两法一致。pH-比色法简易, 可观察反应的进行过程, 也可用于在无机磷参与下的反应。若改变反应条件, 可用于测定其它亚细胞部位 (如线粒体等) 的 CaATPase 和 Na^+ , $\text{K}^+\text{-ATPase}$ 活力, 尚需进一步验证。

阜外医院护校实习同学杜建生同志参加部分实验工作, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Katz, A. M. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1977, 252, 1938.
- [2] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265.
- [3] 姚启智等: 《生物化学与生物物理进展》, 1981, (3), 52.
- [4] de Meis, L.: *The Sarcoplasmic Reticulum*, John Wiley & Inc., New York, Chichester, Brisbane, Toronto, 1981, pp31.
- [5] Yamamoto, T. et al.: *J. Biochem.*, 1967, 62, 558.
- [6] Neet, K. E. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.* 1979, 178, 588.
- [7] de Meis, L.: *The Sarcoplasmic Reticulum*, John Wiley & Inc., New York, Chichester, Brisbane, Toronto, 1981, pp 102.
- [8] Chen, P. S. et al.: *Anal. Chem.*, 1956, 28, 1756.
- [9] Reynard, A. M.: *J. Biol. Chem.*, 1961, 236, 2277.
- [10] Adoms, R. J.: *J. Biol. Chem.*, 1979, 254, 12404.
- [11] Martin, J. B. et al.: *Anal. Chem.*, 1949, 21, 965.
- [12] Martonosi, A. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1964, 239, 659.

[本文于 1987 年 3 月 24 日收到]