

技术与方法

酪氨酸酶活性的微量分析

杨 昌 凤

(武汉大学环境科学系)

提 要

本文介绍了两种灵敏、精确和较简便的酪氨酸酶活性的微量分析技术。其中之一是 $[^3\text{H}]$ -酪氨酸分析,直接测羟基化的酪氨酸量。根据测得的“总 dpm”、“酶样品 dpm”和“空白 dpm”计算出微量样品中酪氨酸酶的活性。另一种方法是将各个含酶样品通过 SDS-PAGE 分离和适当处理,放入含多巴的磷酸缓冲液中染色,待深棕色的酶带完全显现后,再经过固定等,直接将凝胶进行光密度扫描,根据各酶带吸收峰的高度即可测出酶活性的相对变化。

关键词 酪氨酸酶, $[^3\text{H}]$ -酪氨酸分析,多巴染色

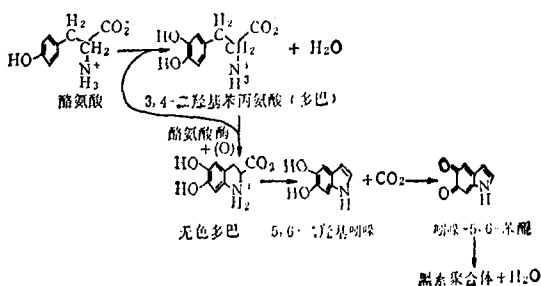
酪氨酸酶 (tyrosinase) 在人和高等动物体内苯丙氨酸及酪氨酸的代谢中起着重要的作用。机体内的某些苯丙氨酸转变为酪氨酸,然后经过酪氨酸酶的作用,从 3,4-二羟苯丙氨酸(多巴)到形成黑色素,成为正常皮肤的一种色素。此酶活性的高低又与黑色素形成的速率有关。缺乏此酶的人将会引起白化病。因此,酪氨酸酶活性的微量分析具有重要的理论意义和实用价值。这里介绍两种我们曾用过的方法,都十分灵敏而精确,也较简便。

一、样品的制备

按每 4×10^6 个细胞加 1ml 1% Triton X-100 (在 0.1mol/L 磷酸缓冲液中, pH7.4), 4°C 震荡 1h, 8800g 离心 5min, 保留上清液。然后用 0.35g Bio-bead SM-2 在 4°C 下温和摇动 2h, 以去掉过量的 Triton X-100 (Bio-bead SM-2 的处理按照 Holloway 的方法进行), 8800g 离心 10min, 该上清液即为供分析用的含酶样品, 并需立即使用。

二、酶活性的测定

1. 基本原理(见以下反应式):



2. 测定方法

(1) $[^3\text{H}]$ -酪氨酸分析

此方法是直接测酪氨酸羟基化的活性, 亦即测羟基化的酪氨酸量 (H_2O 由 $3\text{-}^3\text{H}$ 形成), 而非依赖产物的形成。

首先将 $20\ \mu\text{l}$ (1mCi/ml, SA 200 mCi/mmol) $[^3\text{H}]$ -酪氨酸于室温下用 N_2 抽干, 然后溶于 0.4ml 含抗菌素和牛血清清蛋白 (0.1mg/ml) 的溶液中, 称为 A 液。将 A 液与 2 倍的

0.1mol/L 磷酸缓冲液 (pH7.4) 充分混匀, 供作空白测定, 称为 B 液。将 A 液与等量的酪氨酸 (0.05mmol/L) 和等量的多巴 (0.05mmol/L) 充分混匀, 供作酶活性测定, 称为 E 液。

将样品 10 μ l 与 15 μ l E 液充分混匀, 在 37 $^{\circ}$ C 下保温 1h 后, 取出 20 μ l 加入 0.98ml 含 0.1g Celite 545 和 0.1g Norit A 的 5% (W/V) 三氯乙酸中, 于室温下震荡 2h, 8800g 离心 10min, 取 0.4ml 上清液再离心一次, 最后取 0.2ml 上清液加进 10ml 水溶胶 (Aquasol) 中进行放射性测量, 以其每分钟的计数值作为“酶样品 dpm”。另外, 再取 20 μ l 反应混合物加入 0.98ml 不含 Celite 545 和 Norit A 的 5% 三氯乙酸中, 进行同样的操作, 以其每分钟的计数值作为“总的 dpm”。

为了得到空白的计数值, 还须用不加酶样品而代之以 10 μ l 1mol/L 磷酸缓冲液与 15 μ l B 液进行与上述步骤相同的操作, 所得的总计数与本底计数之差即为“空白 dpm”。

酶活性的计算, 以在实验条件下每 min 代谢 1 μ mol/L 酪氨酸所需的酶量作为该酶的一个活性单位。

酪氨酸酶活性 (U)

$$= \frac{\text{总的酪氨酸 } (\mu\text{mole}) \times 2}{60 \text{ 分(时间)}}$$

$$\times \frac{\text{酶样品 dpm} - \text{空白 dpm}}{\text{总的 dpm} - \text{空白 dpm}}$$

(2) 多巴染色

将各个含酶样品通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (浓缩胶 5%, 分离胶 10%) 进行分离。待染料到达电泳胶的前沿时, 取出凝胶先浸入 0.4 mol/L 磷酸缓冲液 (pH6.8) 中, 摇动两次, 每次约 5min。再用 0.2mol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.8) 重复此项操作。之后, 将凝胶浸入多巴液 (每 ml 0.1mol/L、pH6.8 的磷酸缓冲液中含 2mg 多巴) 染色, 在室温下温和震荡 14h 左右, 便可见深棕色的酶带逐渐显现出来。当酶带的颜色不再继续加深时, 可用含 10% 冰醋酸和 25% 甲醇的溶液浸洗凝胶两次, 每次约 10 min。接着用 50% (W/V) 三氯乙酸固定 2h, 再用上述溶液浸洗两次, 最后用清水洗净, 直接将凝胶置于玻板上进行光密度扫描。根据各酶带吸收峰的高度, 即可测出酶活性的相对变化。

参 考 文 献

- 1 Hearing V J *et al. Biochem J*, 1976; 157: 549
- 2 Holloway P. *Anal Biochem*, 1973; 53: 304
- 3 Kuan K N *et al. Biochem J*, 1979; 177: 981
- 4 Townsend D *et al. Anal Biochem*, 1984; 149: 345

[本文于1989年4月3日收到]

(上接第238页)

这个现象提示: 随着细胞的增龄, 细胞内荧光物质增加。这与有关报道^[4]一致。在 365nm(EX) 与 436nm(EM) 处也有类似现象。

人胚肺二倍体成纤维细胞和 DPH 溶液温育后的荧光光谱与激发光谱 (图略), 激发峰位出现蓝移, 由 384nm 移至 366.4nm, 荧光峰位也出现蓝移现象, 由 440nm 移至 436nm, 荧光强度比单纯 DPH 溶液增大 60 多倍, 比单纯人胚肺二倍体成纤维细胞增大 20 多倍。从荧光理论可知, 在极性溶剂中, 由于被激发分子处于 Franck-Condon 激发态很不稳定, 很快到达平衡激发态并消耗能量, 而在非极性溶剂中或极性较小的溶剂中, 无此现象或消耗能量较小。因此, 发荧光的分子、当它由极性溶剂转到非极性溶剂或极性较小的溶剂时, 荧光峰位往往出现蓝移。由此可见, DPH 是结合在脂肪分子上非极性的烃链区。

36 代细胞 P 值为 0.27 ± 0.024 (4 例), 46 代细胞 P 值为 0.34 ± 0.031 (4 例), 差异显著。由此可知 46 代细胞膜脂流动性显著小于 36 代细胞膜脂流动性, 人胚肺二倍体细胞膜脂流动性随传代而减小的原因, 尚需进一步研究。可能与老化红细胞膜脂流动性下降^[7]相似, 与膜脂质过氧化损伤有关。

参 考 文 献

- 1 野沢义则, 生化学, 1975; 47(2): 52
- 2 Inbar M *et al. Europ J Cancer*, 1977; 13: 1231
- 3 Lenaz G *et al. J Bioenergetics*, 1975; 7: 223
- 4 Shinitzky M *et al. Biochim Biophys Acta*, 1978; 515: 367
- 5 Watford R *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 1977; 76: 869
- 6 曹锡清等, 生物化学与生物物理进展 1986; (4): 53
- 7 姜招峰等, 生物化学与生物物理进展 1989; 16(3): 234

[本文于1989年5月20日收到]