

研究快报

一种新的测定蛋白激酶活性的方法

——毛细管电泳测定蛋白激酶 A 的活性*

万 谦 陈长征 李伯良 夏其昌

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

摘要 建立了以毛细管电泳为基础的测定蛋白激酶 A 活性的新方法, 可作为激酶测活的通用方法. 此法基于底物及其磷酸化产物很容易在毛细管电泳中分开, 且酶活力可用积分值计算. 同时又发展了连续进样技术, 能在一次电泳中同时进行 10 个以上的酶活性测定. 新方法操作简单, 灵敏度和精确性均优于常规的同位素法.

关键词 蛋白激酶 A 活力, 磷酸化, 毛细管电泳

蛋白激酶 A 是第二信使系统的关键酶之一, 它的作用是众所周知的. 其活性检测目前常用同位素法, 误差较大, 我们建立了一种灵敏, 可靠, 安全的毛细管电泳检测法.

蛋白激酶 A 测活常用七肽 kemptide (LRRASLG) 为底物, 其中 Ser 为磷酸化位点, 它在磷酸化前后呈现一个负电荷的差异, 用电泳可容易地分开, 再利用毛细管电泳仪的在线检测, 对产物进行精确定量, 从而计算出酶的活力. 图 1 是电泳图谱.

通过对各种条件的优化, 我们建立了一种新的测活方法: 在 10 μ l 的反应体系中, 各种试剂的最终浓度为 MOPS 50mmol/L, MgCl₂ 10mmol/L, DTT 50mmol/L, 并含有 2.5 μ g BSA 以及适量的酶, 最终 pH 为 7.0, 30 $^{\circ}$ C 反应 10min, 加入 2 μ l 250mmol/L 磷酸终止反应, 接着用毛细管电泳分析, 计算比活力 $(U/mg) = \frac{A}{A_s M t}$, 式中 A 为产物的标准化峰面积, A_s 为每皮摩尔产物的标准化峰面积, t 为反应时间(min), M 为反应酶量(mg).

进一步对测活方法做了酶含量曲线和时间曲线, 都在较大范围呈现线性, 说明了其作为测活方法的可靠性.

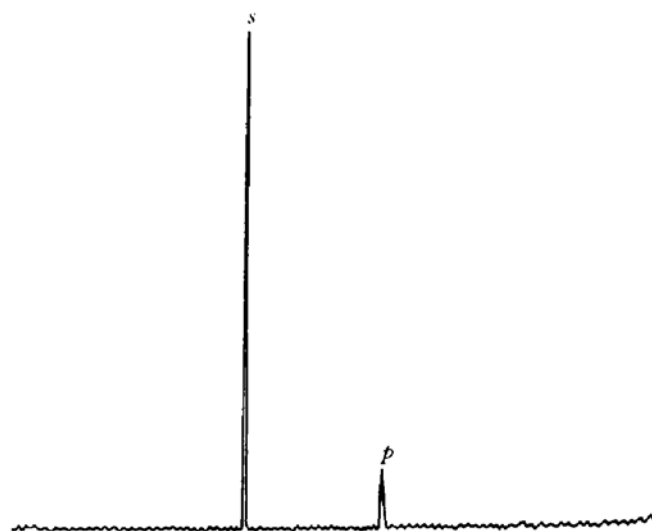


图 1 底物和产物的毛细管电泳图谱

S 代表底物, P 代表产物. 电泳条件: ABI 270A 毛细管电泳仪, 电泳缓冲液为 pH4.0 的磷酸缓冲液 (50mmol/L Pi, 5mmol/L NaCl), 电压 23kV, 电流 22 μ A, 进样时间 1.0s (进样量约 3.5nl).

在相同条件下对四个平行样品进行测定, 发现相对标准偏差仅 2%, 说明了新方法具有较好的重复性.

(下转第 270 页)

衰老过程核酸含量变化趋势一致^[8]。但是否与四膜虫老化过程中 DNA 合成减少或 DNA 损伤修复功能减退有关, 还需要进一步研究。

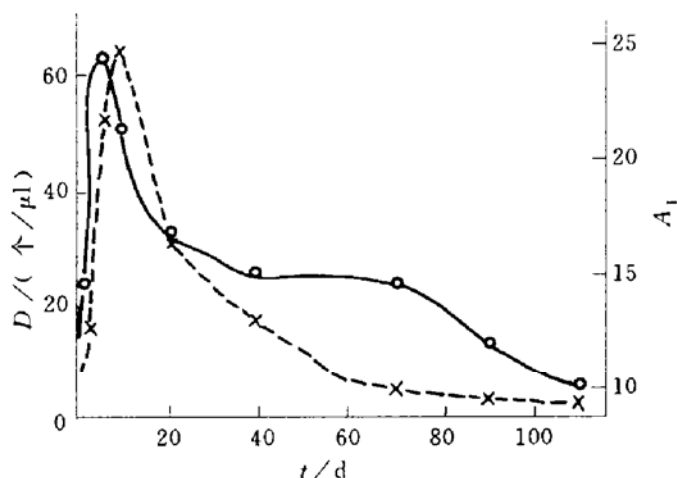


图2 四膜虫 DNA 含量与虫口密度在生长周期内的变化比较

横坐标为培养天数; 左边纵坐标 D 为虫口密度; 右边纵坐标为核积分光密度值, 代表 DNA 相对含量。

本实验中 DNA 含量与虫口密度在生长周期中呈正相关性, 而且 DNA 含量高峰在对数生长期, 比虫口密度高峰提前 2—4d. 表明: 只有当四膜虫细胞 DNA 复制等为活跃的细胞

繁殖阶段做好物质基础以后, 细胞繁殖才能进入对数生长期高峰阶段。同时, 随着细胞衰老, 虫口密度不断减少, 细胞分裂能力下降, DNA 含量也不断降低, 两者变化趋势基本一致, 说明了 DNA 含量变化与衰老有直接关系, 生物体衰老与遗传物质的变化有着密切联系。

致谢 感谢湖北医科大学实验中心电镜室的曾祥新技师, 梁浩麟主任对本研究工作的大力支持和帮助。

参 考 文 献

- 1 Ma H J, Nagata T. Cell Mol Biol, 1990; 36 (1): 73—84
- 2 Culling C F A 著, 孔庆雷译. 组织病理学与组织化学技术手册. 北京: 科学出版社, 1982 年; 242—248
- 3 胡匡祐. 细胞生物学杂志, 1984; 6 (3): 136—141
- 4 刘洪祥, 王兆一, 王凤荣. 中华物理医学杂志, 1981; 3 (2): 100—102
- 5 李素文, 霍满鹏, 成汝萱. 中华物理医学杂志, 1989; 11 (2): 104—107
- 6 Corliss J O. In: Elliot A M ed. Biology of Tetrahymena. Dowden Hutchinson and Ross Inc, 1973: 1—51
- 7 韦 正, 刘亚伦. 中华物理医学杂志, 1989; 11 (1): 29—33
- 8 张佩德, 梁靖威, 谭坚贞. 老年学杂志, 1987; 7 (3): 56—59

(上接第 267 页)

新方法也有一定的局限性, 即不能象同位素法那样在短时间内分析大量样品。为此, 我们进行技术改进, 创立了连续进样分析技术, 可以在原来分析一个样品的时间里同时分析多达十个样品, 在一定程度上解决了问题。我们多次用到这样的工作方式, 收到了较好的效果。图 2 是对反应酶量相同, 反应时间不同的多个样品的分析。

由于新方法的反应体积是 $10\mu\text{l}$, 同位素法的反应体积是 $50\mu\text{l}$, 同量的酶用新方法测定时酶浓度比同位素法高 5 倍, 导致新方法比同位素法测出的活力大约高一个数量级, 说明了新方法灵敏度更高。

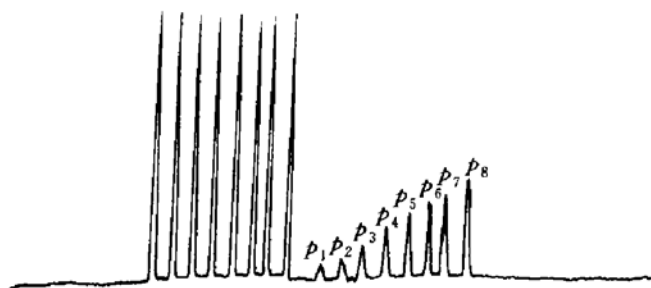


图2 连续进样图谱

S_1 — S_8 代表不同反应时间残留的底物, P_1 — P_8 代表不同反应时间的产物, 反应时间分别为 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20min.

毛细管电泳用于蛋白激酶活性测定尚未见报道, 且本方法对所有蛋白激酶的测活都适用, 期望得到更广泛的应用。

coefficient of variation (CVs) of two samples were 3.8% and 4.7%. Day-to-day coefficient of variation (CVs) was 7.0%. The correlation of immunoprecipitation method and electrophoretic procedure were consistent ($n=22$, $r=0.976$). Reference values for total LD and LD1 were 102.3 ± 16.4 U/L and 23.7 ± 4.4 U/L respectively. The ratio of LD1 to total LD was $23.1 \pm 3.9\%$. The advantages of immunoprecipitation method were: high specificity, good precision and linearity, easy operation. Immunoprecipitation method was very suitable for measuring LD1 and could adapt to the automatic analyzer.

Key words isoenzyme 1 of lactate dehydrogenase (LD1), immunoprecipitation method, anti-M antibody

New Semi-dry Technique in SDS PAGE. Guo Yaojun, Wen Tao. (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (3): 265
Shorter running time, higher resolution, simpler operation without preparation of large amount of electrode buffer is the superior character of SDS PAGE semi-dry technique. It is more convenient with buffer soaked filter strips instead of electrode buffer with filter bridge or buffer gel strips.

Key words semi-dry technique, SDS PAGE, filter strips

A New Assay for Kinase Activity: The Determination of Protein Kinase Using Capillary Electrophoresis. Wan Qian, Chen Changzheng, Li Boliang, Xia Qichang. (*Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (3): 267
A new assay of protein kinase A using capil-

lary electrophoresis has been established. It is a universal and useful method for kinase activity. The method based on principle that substrate (kemptide) and product (phosphorylated kemptide) are easily separated by capillary electrophoresis and the enzyme activity can be calculated on the integrated area. A continuous sampling technique which can analyse more than 10 samples in one run has also been developed. The new method is easy to operate and its accuracy and sensitivity are higher than that of conventional isotopic method.

Key words protein kinase A activity, capillary electrophoresis, phosphorylation

The Variation of Content in *Tetrahymena pyriformis* During Ageing. Wang Bing, Liu Bian-sheng, Xing Yiyin. (*Hubei Geriatric Institute, Wuhan 430071*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (3): 268

Digital Image Analysis is a new DNA content measuring method in cell nucleus. During the senile process of *Tetrahymena pyriformis*, change of DNA content in nucleus could be measured by this method. According to law of Beer-Lambert, cell nucleus in different growth period showed change of nuclear DNA content using level of nuclear integral optical density. The method possess quick measuring speed, well repetition, simple operation and good results. The results showed: when *Tetrahymena pyriformis* began the logarithmic growth phase, the nuclear DNA content reached peak gradually. When cell ageing gradually, the times of cell division as well as DNA content would be gradually decreased.

Key words *Tetrahymena pyriformis*, DNA content, digital image analysis, ageing