

# 谷氨酸脱羧酶放射测量法的改良及应用\*

胡元元\*\* 何善述

(同济医科大学基础医学院生物化学教研室, 武汉 430030)

**摘要** 用 NaOH 代替苯乙胺作为  $^{14}\text{CO}_2$  的吸附剂, 改进谷氨酸脱羧酶 (GAD) 活性的放射测定方法, 结果发现 NaOH 为吸附剂组内变异系数为 9.6%, 以苯乙胺为吸附剂组内变异系数为 31.9%; 以 NaOH 为吸附剂 72 h 后测量其放射活性仍稳定不变, 以苯乙胺为吸附剂者 1 h 后放射性活性即下降 47%, 6 h 后已降低至本底水平;  $^{14}\text{CO}_2$  重吸收实验亦证明以苯乙胺为吸附剂吸附的  $^{14}\text{CO}_2$  6 h 内已有 80% 以上重新被 NaOH 吸附; 以 NaOH 作为吸附剂测定 GAD 的活性, 在 0.39~17.8 mg 脑组织样品范围内 GAD 量与  $^{14}\text{CO}_2$  生成量之间有线性关系. NaOH 代替苯乙胺作为  $^{14}\text{CO}_2$  的吸附剂测定 GAD 的活性其灵敏度提高 1.66 倍. 用此方法测定组织和细胞内 GAD 活性证明其具有良好的重复性和稳定性, 值得推广应用.

**关键词** 谷氨酸脱羧酶, 放射测定法, 苯乙胺, NaOH

**学科分类号** Q555.1, Q503

谷氨酸 (Glu) 和  $\gamma$ -氨基丁酸 (GABA) 作为中枢神经系统兴奋性和抑制性神经递质, 在神经系统疾病的发病中起重要作用, 尤其是 Glu 和 GABA 的平衡失调, 在某些疾病如癫痫发病中的作用近年来已引起人们广泛的关注. 已知谷氨酸脱羧酶 (GAD) 是将 Glu 脱羧而生成 GABA 的关键酶, 检测 GAD 活性有助于了解组织细胞中 Glu 和 GABA 的代谢, 传统的检测方法是采用苯乙胺作为  $\text{CO}_2$  的捕获剂<sup>[1]</sup>. 我们在实验中发现苯乙胺捕获  $\text{CO}_2$  不稳定, 而改用 NaOH 代替苯乙胺, 结果稳定. 同时将反应时间延长一倍, 非标记谷氨酸底物减少一半, 灵敏度可提高 1.66 倍. 并采用本方法分别测定了大鼠脑皮质及海马培养神经元细胞内 GAD 活性.

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

Sprague-Dawley 大鼠由同济医科大学动物中心提供, 谷氨酸、UL- $^{14}\text{C}$  谷氨酸、磷酸吡哆醛均为 Sigma 公司产品, 马桑内酯 (CL) 为华西医科大学制药厂产品, 其他试剂为国产分析纯试剂, 西安二六二厂 FG 型  $\beta$ -液体闪烁计数器.

### 1.2 方法

#### 1.2.1 样品制备:

a. 动物处理及取样: 雄性 Sprague-Dawley 大鼠 21 只, 体重 165~215 g, 随机分为 3 组: 对照组, 7 只大鼠在取样前未经任何处理. CL 诱发癫

痫组, 7 只大鼠在戊巴比妥腹腔麻醉下经一侧侧脑室注入 2  $\mu\text{l}$  CL, 5~10 min 后出现大发作, 2 h 后取样. MK-801 组, 7 只大鼠先经腹腔注射 MK-801 (Dizlocipine, 是 NMDA 的非竞争性拮抗剂) (0.1 ml/kg) 1 h 后取样. 取样时断头处死动物, 快速取脑皮质或海马加入 10 倍预冷的匀浆缓冲液中制备匀浆, 匀浆缓冲液含甘油 20% (体积比), 0.13% Triton X-100,  $1 \times 10^{-4}$  mol/L 谷胱甘肽,  $0.1 \times 10^{-3}$  mol/L 磷酸吡哆醛,  $10^{-3}$  mol/L  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ,  $10^{-2}$  mol/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 6.8. 8 000 g 4  $^\circ\text{C}$  离心 15 min, 收集上清用于检测酶活性.

b. 海马神经元培养: 无菌取新生 SD 大鼠海马组织, 0.125% 胰酶消化 1.5 min, 悬浮于含 10% 胎牛血清和 20% 小牛血清的 DMEM/F12 培养基中, 按  $1 \times 10^6$  个/ml 接种于培养板, 37  $^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养, 第三天换培养基一次, 第六天换无血清培养基 Neurobasal/B27, 加入 100  $\mu\text{mol/L}$  CL 培养 24 h 后, 换无血清培养基, 同时加入 MK-801 60  $\mu\text{mol/L}$ . 再培养 24 h 后收集细胞用于谷氨酸脱羧酶 (GAD) 活性的测量.

**1.2.2 GAD 活性的测量:** 以 GAD 催化 Glu 生成游离  $\text{CO}_2$  的速度来反映 GAD 的活性, 取 pH 为 6.8 的磷酸钾缓冲液 ( $2.5 \times 10^{-3}$  mol/L 巯基乙醇,  $0.1 \times 10^{-4}$  mol/L 磷酸吡哆醛,  $5 \times 10^{-3}$  mol/L L-谷氨酸,

\* 国家自然科学基金资助项目 (39330210).

\*\* 通讯联系人.

Tel: 027-83691347, E-mail: huyy@public.wh.hb.cn

收稿日期: 2000-01-24, 接受日期: 2000-02-29

UL-<sup>14</sup>C 谷氨酸 0.185 × 10<sup>4</sup> Bq) 150 μl 放入 EP 管中, 将 EP 管放入闪烁瓶, 同时放入 2.5 cm × 10 cm 吸附有 50 μl 20% NaOH 或苯乙胺的擦镜纸于瓶底, 严密封盖, 通过瓶塞加入 50 μl 细胞匀浆上清于 EP 管中, 37℃ 水浴振摇 1 h, 加入 50 μl 2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 于 EP 管内中止反应, 37℃ 继续振摇 30 min, 取出 EP 管. 将装有滤膜的闪烁瓶 50℃ 30 min 烘干, 然后加 10 ml 闪烁液于瓶内, 于 β 液体闪烁仪测样本的放射性强度 (cpm) 值. GAD 的活性以每小时每毫克蛋白质样品催化生成 1 μmol CO<sub>2</sub> 的量为一个酶活性单位.

1.2.3 蛋白质测定: 采用 Lowry 法.

## 2 结果

### 2.1 重复管间的平行性

分别以苯乙胺和 NaOH 作为 CO<sub>2</sub> 的吸附剂, 反应后立即测量吸附 <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> 的放射活度. 结果显示, 以 NaOH 为吸附剂组内变异系数为 9.6%, 而以苯乙胺为吸附剂组内变异系数为 31.9%. 后者组间平行性显著低于前者.

### 2.2 结果的稳定性

将以苯乙胺和 NaOH 为吸附剂的反应各管, 加入闪烁液后分别于 0 h、1 h、6 h、24 h 和 72 h 测量其放射活性的变化 (表 1). 结果显示以 NaOH 为吸附剂各时点测量结果一致, 而以苯乙胺为吸附剂 1 h 后读数即下降 47%, 6 h 后已降至本底水平.

### 2.3 重吸收实验

将浸有 NaOH 的滤膜分别悬挂于以 NaOH 和苯乙胺为吸附剂的待测闪烁瓶中, 用以重吸收因吸

附剂不稳定而重新释放出的 <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>, 6 h 后取出上悬 NaOH 滤膜, 烤干, 加入闪烁液. 结果以苯乙胺为吸附剂上悬 NaOH 滤膜上 cpm 值高达 361, 证明以苯乙胺为吸附剂吸附的 <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> 6 h 内已有 80% 以上重新被 NaOH 吸附; 而以 NaOH 为吸附剂, 上悬滤膜 cpm 值为 28, 仅为本底水平; 说明 NaOH 吸附 <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> 后稳定, 而以苯乙胺为吸附剂生成的胺盐在闪烁液中不稳定.

### 2.4 改良后提高灵敏度

本实验在初速度范围内将反应时间延 1 倍, 未标记谷氨酸底物减少一半, 测得 cpm 值分别提高 93.38% 和 37.34%. 改良法的灵敏度比原法提高 1.66 倍. 以 NaOH 作为吸附剂测定 GAD 的活性在 0.39~17.8 mg 脑组织样品范围内 GAD 量与 <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> 生成速度之间有线性关系 (图 1).

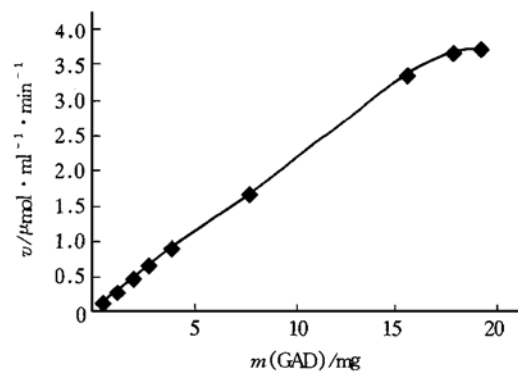


Fig. 1 Amount-effect relationship between GAD amount and initial velocity of carbon dioxide product

### 2.5 样品测定结果

采用此法检测大鼠脑组织和海马培养神经元内 GAD 活性, 结果见表 2.

Table 1 Comparison of the <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> activity detected by two kind of trap agent

| t/h            | 0 h      | 1 h      | 6 h      | 24 h     | 72 h     |
|----------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| NaOH           | 590 ± 57 | 580 ± 52 | 585 ± 53 | 584 ± 49 | 579 ± 51 |
| phenethylamine | 443 ± 96 | 237 ± 94 | 40 ± 38  | 32 ± 14  | 30 ± 15  |

n = 6.

Table 2 The change of GAD activity in rat brain tissue and cultured neuron treated with CL and MK-801

|                          | Control       | CL                          | CL+ MK-801    |
|--------------------------|---------------|-----------------------------|---------------|
| Brain tissue (n = 7)     | 53.47 ± 9.86  | 60.02 ± 10.87               | 56.27 ± 8.77  |
| Cultured neurons (n = 5) | 61.26 ± 11.42 | 79.88 ± 11.31 <sup>1)</sup> | 65.33 ± 12.15 |

<sup>1)</sup> P < 0.05 compared with control group.  $\bar{x} \pm s$ .

## 3 讨论

随着基因工程的广泛应用, 众多对 GAD 的基

础研究注重于 GAD mRNA 水平及蛋白质表达水平的研究, 但不论是 GAD 本身的含量多少还是其 mRNA 水平都不能完全说明 GAD 的活性高低. 研

究人员仍然需要一种高效、灵敏、稳定的方法来直接测定 GAD 的酶活性, 用<sup>14</sup>C 标记的同位素底物在反应中释放出的<sup>14</sup>CO<sub>2</sub> 量来直接反映酶活性是脱羧酶类活性测定中常用的高特异性和高灵敏度的方法<sup>[2,3]</sup>. 但由于反应中释放的<sup>14</sup>CO<sub>2</sub> 为气体, 会对操作人员的健康产生危害, 故反应体系必须严格密封, 反应生成的<sup>14</sup>CO<sub>2</sub> 必须能完全被吸附剂稳定捕获而不能有逸出现象. 文献中一般介绍用有机强碱苯乙胺 (phenylethylamine) 作为 CO<sub>2</sub> 的捕获剂, 苯乙胺与 CO<sub>2</sub> 生成的胺盐易溶于闪烁液中成为均相, 不产生非均相淬灭, 给实验带来很大的方便, 是脱羧酶测定的经典方法<sup>[4]</sup>. 但我们在实验中发现苯乙胺与 CO<sub>2</sub> 生成的胺盐在闪烁液中极不稳定, 容易分解挥发, 反应完成后立即测定结果组间误差大, 不能满足实验需要; 静置 6 h 后其放射性活度即降低至本底水平, 说明此时苯乙胺与<sup>14</sup>CO<sub>2</sub> 所生成的胺盐已近乎完全分解, 我们的重吸附实验亦证明被苯乙胺初次吸附的<sup>14</sup>CO<sub>2</sub> 很快被重新游离出来, 这种重新释放出的<sup>14</sup>CO<sub>2</sub> 很容易对工作人员的健康和环境均造成极大的危害. 而 NaOH 为无机强碱, 与 CO<sub>2</sub> 生成稳定的无机盐, 我们在实验中改用 NaOH 作为 CO<sub>2</sub> 的捕获剂, 结果表明组间变异系数小, 反应后放置 72 h 其结合的放射性活度仍稳定不变, 没有被捕获的放射性气体又重新释放出来的现象发生, 说明 NaOH 作为捕获剂安全高效, 明显优于以苯乙胺作捕获剂. 不过 NaOH 为

水溶液, 不能与闪烁液形成均相, 故加入闪烁液以前必须烘干滤膜, 以免产生淬灭效应.

本实验将反应时间延长一倍, 灵敏度提高 93.38%. 同时将未标记谷氨酸底物用量减少一半, 提高同位素标记的谷氨酸相对含量, 灵敏度又可提高 37.34%. 因此此实验方法经改良后不但安全性、稳定性有较大的改善, 且灵敏度提高 1.66 倍. 采用本改良法测定了大鼠脑组织及海马培养神经元内 GAD 活性<sup>[5]</sup>, 结果稳定且与文献报道一致, 说明此方法不仅可以测定组织的 GAD 酶活性而且可以测定细胞内的酶活性. 基于脱羧酶放射测定法的共同原理, 本改良法实用于所有脱羧酶的活性测定, 具有推广应用价值.

### 参 考 文 献

- 1 Meldrum B S. Excitatory amino acid transmitters in epilepsy. *Epilepsia*, 1996, **36** (suppl 11): s30
- 2 Choi D W. Bench to bedside: the glutamate connection. *Science*, 1992, **258** (5023): 241~ 243
- 3 Meldrum B S. The role of glutamate in epilepsy and other CNS disorders. *Neurology*, 1994, **44** (suppl 8): S14-23
- 4 Porter T G, Martin D L. Rapid inactivation of brain glutamate decarboxylase by aspartate. *J Neurochemistry*, 1987, **48** (1): 67~ 72
- 5 王 玮, 胡元元, 何善述, 等. 马桑内酯致痫大鼠皮质 GAD、GABA-T 活性及神经递质含量的研究. *同济医科大学学报*, 1998, **27** (4): 262~ 264  
Wang W, Hu Y Y, Zhu J X, *et al.* *Acta Univ Med Tongji*, 1998, **27** (4): 262~ 264

## Improvement of Glutamic Decarboxylase Radioassay and Its Apply<sup>\*</sup>

HU Yuan-Yuan<sup>\*\*</sup>, HE Shan-Shu

(Department of biochemistry, Basic Medical Institute, Tongji Medical University, Wuhan 430030, China)

**Abstract** The radioassay of glutamic decarboxylase (GAD) was modified by taking NaOH as trapped agent instead of phenylethylamine. The results showed that the coefficient of variation (*CV*) within same sample was 9.6% and the radioactivity remains stable after 72 hours if use NaOH as trap agent. It is significantly stable than use phenylethylamine as trap agent, which the *CV* was 31.9% and the radioactivity decreased 47% within the first hour and decreased to background after 6 hours. The reabsorption experiment shows over 80% of <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> can be reabsorption by NaOH within 6 hours. It is suggested that NaOH is a much better trap agent than phenylethylamine and the sensitivity can increase 1.66 folds. Using this method the GAD activity in 0.39~17.8 mg of brain tissue can be measured and it is success in determine the GAD activity both in rat brain tissue and cultured neurons.

**Key words** glutamic decarboxylase, radioassay, phenylethylamine, NaOH

<sup>\*</sup> This work is supported by a grant from National Natural Sciences Foundation of China (39330210).

<sup>\*\*</sup> Corresponding author. Tel: 86-27-83691347, E-mail: hyyy@public.wh.hb.cn

Received: January 24, 2000 Accepted: February 29, 2000