

- 7 吴卫国, 王谷岩, 冯春华等. 昆虫学报, 1982; 25 (3): 260
8 吴梅英, 田丽娟, 彭连惠. 昆虫学报, 1993; 36 (2): 159
9 吴梅英, McIntyre P. 科学通报, 1994; 39 (18): 27
10 Nilsson D E. J Comp Physiol, 1988; A162: 341
11 Nilsson D E. TINS, 1990; 13: 55

- 12 Warrant E J, McIntyre P. J Comp Physiol, 1990; A167: 785
13 Warrant E J, McIntyre P. J Comp Physiol, 1990; A167: 805

关于吖啶橙测定溶酶体 H^+ -ATPase 转运 H^+ 的研究*

张过江 王 嘉 姚军兰 刘晓麒

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 揭示了吖啶橙的吸收光谱和荧光光谱对其浓度依赖性上的区域性特征, 分析了测定溶酶体 H^+ 转运时合理选用吖啶橙浓度及溶酶体用量的重要性、机理和原则, 探讨了其与溶酶体的温育时间和 K^+/H^+ 交换对测定 H^+ 转运的明显影响。

关键词 吖啶橙, 溶酶体, H^+ -ATPase, 质子

吖啶橙是阳离子型的碱性荧光染料, 非质子化的中性分子受跨膜 H^+ 梯度作用可通过生物膜进入酸性囊泡或细胞器内并质子化, 质子化分子难以通过膜而阻留其内使局部浓度增大。由于吖啶橙的吸收峰和荧光峰随其浓度增大而分别蓝移和红移。利用上述性质, 可监测 H^+ 跨膜转运的动态过程, 该方法已用于线粒体^[1]、膀胱内膜^[2]、燕麦根浆膜^[3]及溶酶体^[4-6]的 H^+ 转运测定。已往的国外文献虽论述了其光谱的浓度依赖性, 但从未揭示这种依赖的区域性, 即在不同范围内其浓度变化会引起程度不同的光谱变化, 而光谱变化的显著性决定着测定 H^+ 转运的灵敏度。因此合理选用吖啶橙浓度使其光谱在 H^+ 转运过程中发生显著变化, 是影响该方法灵敏度的关键。另外, 在合理的吖啶橙浓度下, 溶酶体的用量以及启动 H^+ -ATPase 前吖啶橙与溶酶体的共育时间, 溶酶体内的 H^+ 与悬液中的 K^+ 的 K^+/H^+ 交换等因素都明显影响测定效果。文中探讨了上述问题, 有利于对该测定方法的正确运用。

1 材料与方法

1.1 试剂

吖啶橙 (acridine orange, AO) 和 ATP 为进口分装试剂; N-ethylmaleimide (NEM) 和 carbonyl cyanide m-chlorophenyl-hydrazone (CCCP) 为 Sigma 试剂; 其他为国产分析纯试剂。

1.2 AO 吸收谱和荧光谱对 AO 浓度依赖性的测定

测定系列 AO 水溶液浓度的吸收谱和荧光谱, 将各吸收谱转换为摩尔消光系数谱; 把各 [AO] 的荧光 λ_{em}^{max} 对 [AO] 作图, 得到随 [AO] 加大其荧光 λ_{em}^{max} 红移的关系图; 将各 [AO] 的样品在 530nm 处单位浓度 AO 的荧光强度对 [AO] 作图, 得到 AO 在 530nm 的荧光强度随 [AO] 加大而衰减的关系图。

* 所长择优课题基金资助。

收稿日期: 1994-03-17, 修回日期: 1994-05-05

1.3 溶酶体制备

用 300g 左右的大白鼠, 禁食一 d 后处死取肝, 匀浆及离心的方法参照文献 [7]. 溶酶体蛋白含量用缩二脲方法测定.

1.4 H^+ -ATPase 转运 H^+ 的测定

定量地将溶酶体悬浮于 2ml 含 0.1mol/L KCl 和 0.01mol/L $MgCl_2$ 的 0.02mol/L Hepes (pH7.0) 溶液中, 20℃温育 2min 后, 加入 AO, 再用 1mmol/L 的 ATP 启动 H^+ -ATPase, 测定 AO 的差吸收值 $\Delta A_{492-540nm}$ 在 4min 内随 H^+ 转运的变化 (以 540nm 为参比测差吸收是为免除溶酶体的浊度效应).

1.5 仪器

吸收和荧光测定分别用日立 U-3200 光谱仪和日立 850 荧光光谱仪, 差吸收测定用岛津 UV-3000 光谱仪. 各测定均重复 3 次, 以保证结果的可靠性.

2 结果与讨论

2.1 AO 吸收谱的浓度依赖性及 AO 使用浓度的选定

由图 1a 可见, 随 $[AO]$ 从 $2.5\mu mol/L$ 逐渐加大, 其 492nm 的摩尔消光系数逐渐减小, 而 470nm/492nm 的相对比值却在增加, 这是由于 $[AO]$ 较低时以单体为主, 其光吸收在 492nm 左右, $[AO]$ 加大, 聚合体不断形成, 其吸收在 470nm 左右, 故其吸收峰随浓度增大而蓝移. AO 的弱碱性使其易进入酸性的囊泡内, H^+ 跨膜转运加大 H^+ 跨膜梯度而增强 AO 的进入, 使进入囊泡的 AO 局部浓度增大, 单体随聚合态形成而减少, 因此 492nm 光吸收下降, 这种变化随 H^+ 向内转运而加强, 因此可动态监测 H^+ -ATPase 的 H^+ 转运. 上述机理已由很多国外文献阐明, 但从未论及其吸收谱浓度依赖性的“区域”特征, 而这对于选定 AO 使用浓度至关重要.

图 1a 和 b 显示出 $[AO]$ 在小于 $10\mu mol/L$ 的范围内变化时, 492nm 的摩尔消光系数变化很小, 说明此时的 AO 以单体为主; 当 $[AO]$ 大于 $10\mu mol/L$ 并成倍增加时, 该消光系数减

小的幅度明显加大, 表明此时 AO 聚合加剧而单体迅速减少; 而 $[AO]$ 大于 $160\mu mol/L$ 后, 浓度再增大, 该消光系数的减小却趋于缓和, 说明此时 AO 已大量聚合, 单体较少, 继续加大 $[AO]$ 已不能促使进一步的大量聚合及单体明显减少. 以上说明反映 AO 单体减少的 492nm 摩尔消光系数的变化与 $[AO]$ 的增加不成线性关系, 而呈现出图 1b 所示的关系, 有明显的区域性. AO 以其 492nm 吸收值变化来指示 H^+ 跨膜转运, 该吸收值变化越大则该指示越灵敏, 显然 AO 使用浓度如小于 $2.5\mu mol/L$ 或大于 $1mmol/L$, 其随 H^+ 转运进入酸性环

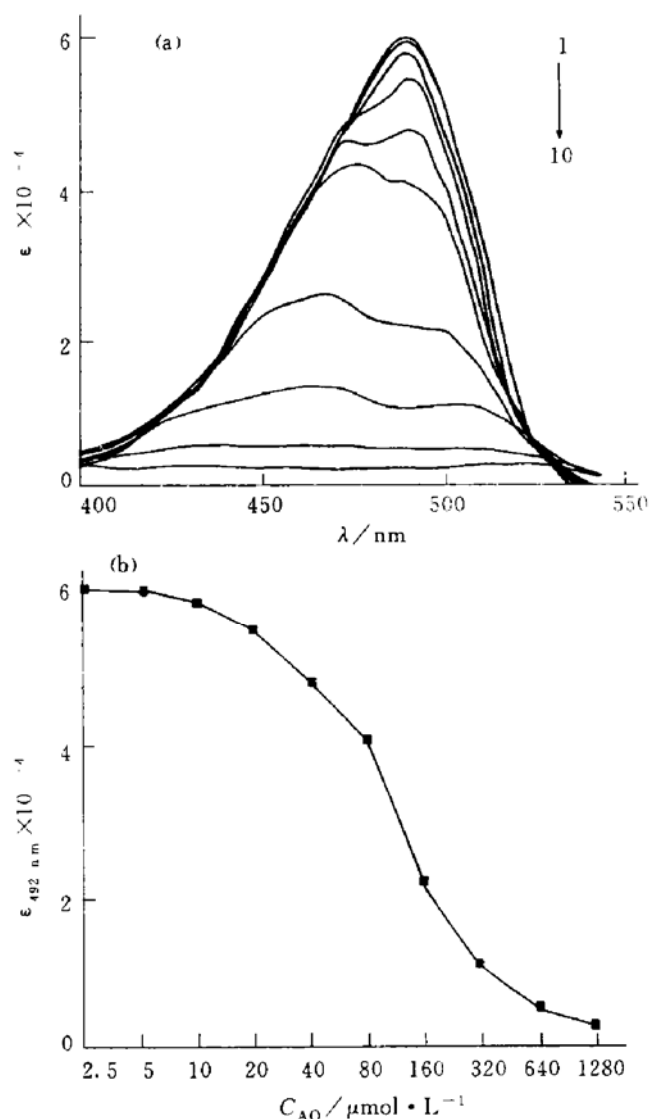


图 1 吡啶橙克分子消光系数与其浓度的关系
AO 为水溶液. 曲线 1 至 10 的 AO 浓度依次为
2.5, 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 和
1280 $\mu mol/L$.

境,在492nm的吸收变化将位于曲线两端的区域(图1b),[AO]增大不能引起该吸收明显减小,因而不能灵敏地指示 H^+ 转运.合理的AO使用浓度应能使该光吸收在 H^+ 转运过程中明显减小,从理论上(图1b),从实验上(图4)都证实AO选用浓度在 $2.5-10\mu\text{mol/L}$ 范围内的效果较好,这正是图1b中显示的引起吸收明显下降的“临界浓度”.

2.2 AO的荧光光谱对浓度的依赖性及使用浓度的选定

AO单体的荧光峰(λ_{em}^{max})在530nm,随着[AO]增加,聚合态分子增多,其荧光峰红

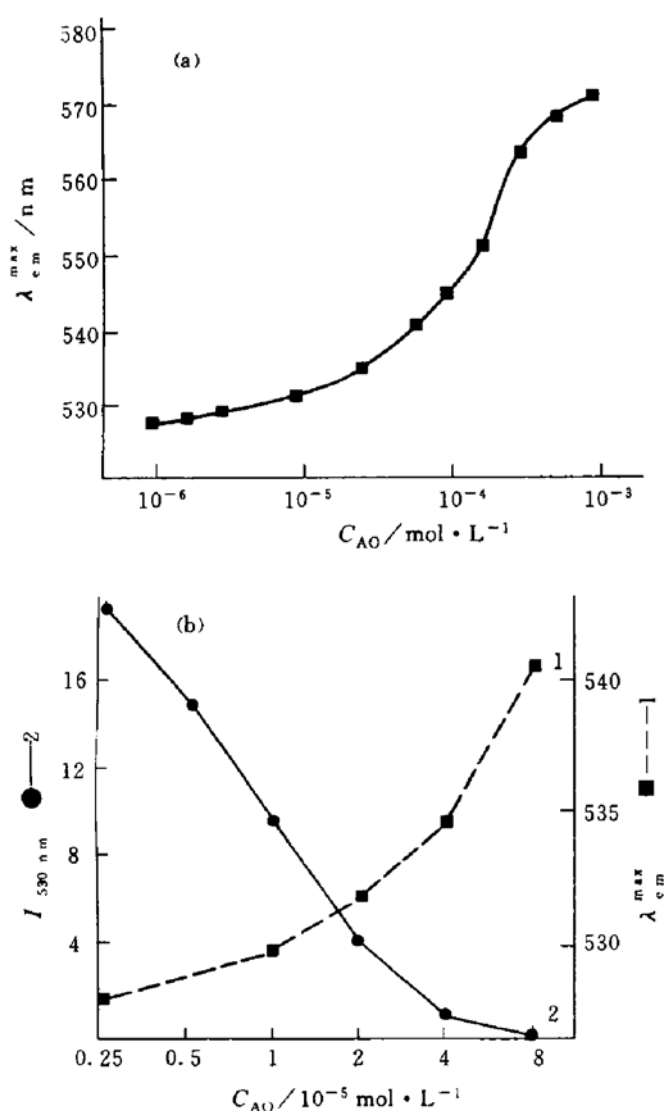


图2 吖啶橙荧光光谱对其浓度的依赖性

AO为水溶液, λ_{ex} 均为492nm. λ_{em}^{max} 为荧光峰波长.图(b)左侧纵坐标为AO单位浓度的荧光强度.

移^[8].图2a不但表现出这种特点,还显示了以往文献未予揭示的这种浓度依赖的“区域性”,即在小于 $1 \times 10^{-5} \text{mol/L}$ 和大于 $5 \times 10^{-4} \text{mol/L}$ 的范围增加[AO]时, λ_{em}^{max} 红移较小,而在其间增加[AO],该红移明显,这与图1所示浓度依赖性的“区域”特征很相似.图2b曲线2表明单位浓度的AO在530nm的荧光强度随[AO]增加而衰减,由曲线1可见, λ_{em}^{max} 随[AO]增大而红移,其位于530nm的单体荧光势必减弱.该性质也曾被用于 H^+ 转运的测定^[9],AO使用浓度的选定原则如前所述,应选使 λ_{em}^{max} 能发生明显红移的“临界浓度”,图2a表明应略小于 $1 \times 10^{-5} \text{mol/L}$,用溶酶体所做的实验表明用 2.5 或 $5\mu\text{mol/L}$ 较好(图略).

2.3 AO对溶酶体 H^+ -ATPase转运 H^+ 的测定

溶酶体是个重要的细胞器,其膜上 H^+ -ATPase向内转运 H^+ 维持着比胞浆低2—3个pH单位的内部弱酸性.如前所述,用AO可监测其 H^+ 转运,为克服溶酶体的浊度效应,以540nm为参比波长,测定AO在 H^+ 转运中 $\Delta A_{492-540\text{nm}}$ 的变化.图3是用ATP启动 H^+ -ATPase开始转运 H^+ 过程中AO差吸收

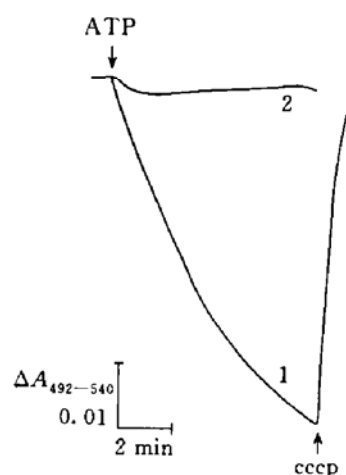


图3 吖啶橙的差吸收 $\Delta A_{492-540}$ 在溶酶体 H^+ -ATPase转运 H^+ 中的变化

AO均为 $2.5\mu\text{mol/L}$.溶酶体蛋白含量均为 0.44mg/ml .

1: CCCP $10\mu\text{mol/L}$ 在标示时刻加入,2: NEM 2mmol/L 在加ATP之前加入测定体系.

谱的变化. 为证实是 H^+ 转运引起了这种变化, 加入 H^+ 载体 CCCP (这里使 H^+ 外移), 消除跨膜 H^+ 梯度, 使进入的 AO 部分外移而解聚, 故该差吸收又回升. 溶酶体 H^+ -ATPase 的抑制剂 NEM 使该差吸收不下降, 说明抑制了酶的水解活性, 不再出现 H 转运.

2.4 AO 浓度对测定溶酶体 H^+ 转运的影响

AO 的 $\Delta A_{492-540}$ 在 H^+ 转运中下降 (或减小) 越大, 表明 H^+ 转运越强, 如对同等水平的 H^+ 转运, 该差吸收减小越多, 则表明该测定条件越佳或者越灵敏. 图 4 是在同等实验条件下改变 [AO], 用加 ATP 前的 $\Delta A_{492-540}$ 值减去加 ATP 后经 4min H^+ 转运时的 $\Delta A_{492-540}$ 值, 这二值之差随 AO 使用浓度的变化, 反映了不同 [AO] 对测定灵敏度的影响, 二值之差越大, 则测定越灵敏. 由图 4 可见, AO 为 2.5, 5 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 时, 测定灵敏, 20 $\mu\text{mol/L}$ 的效果已很差, 40 $\mu\text{mol/L}$ 的 AO 已不能指示任何 H^+ 转运. 这与图 1b 的结论相吻合, 即 AO 的使用浓度应选于 2.5—10 $\mu\text{mol/L}$ 之间.

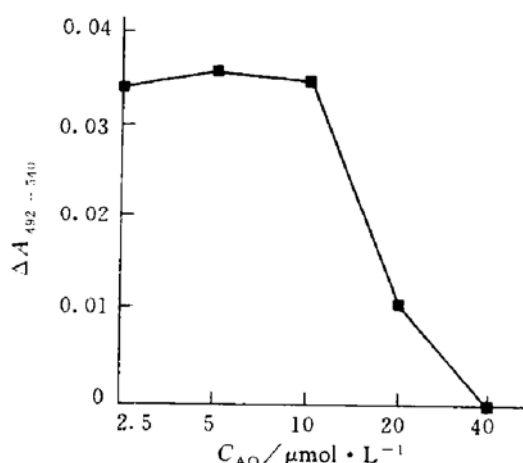


图 4 吡啶橙的浓度对测定溶酶体 H^+ 转运中 $\Delta A_{492-540}$ 的影响

溶酶体蛋白含量均为 0.20 mg/ml $n=3$.

2.5 溶酶体的用量对 AO 测定 H^+ 转运的影响

图 5 仍以加 ATP 前与加后 4min 的 $\Delta A_{492-540}$ 二值之差来分析溶酶体不同用量对测定 H^+ 转运的影响. 由图 5 可见, 尽管 AO 选用了合理浓度, 但曲线 1 至 3 随溶酶体用量的变化, 都存在测定灵敏度的最高点, 说明溶酶

体用量也需合理选择; 另外, 图中 [AO] 较大者对溶酶体用量 (蛋白量) 的可选范围较宽且测定灵敏度较高. 需说明, 由于溶酶体制备方法不同, 纯度不同, 图 5 所示 [AO] 与溶酶体蛋白量对测定的影响只能作参考.

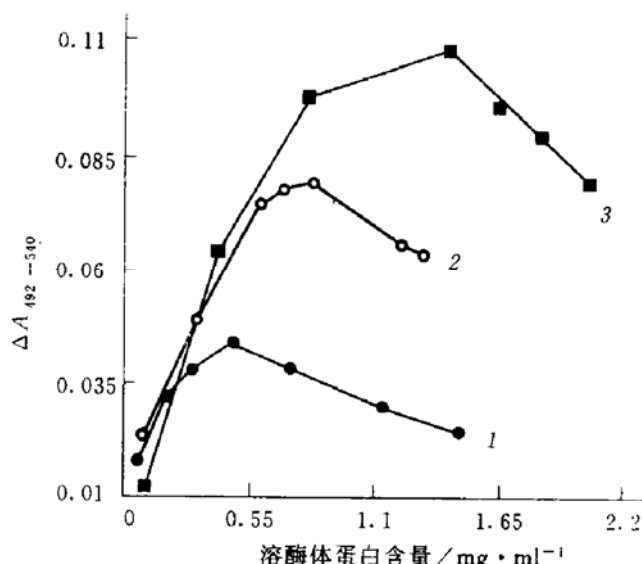


图 5 溶酶体的用量对 AO 测定 H^+ 转运中 $\Delta A_{492-540}$ 的影响

1: 各测样中 AO 均为 2.5 $\mu\text{mol/L}$, 2: 各测样中 AO 均为 5 $\mu\text{mol/L}$, 3: 各测样中 AO 均为 10 $\mu\text{mol/L}$ $n=3$.

2.6 K^+/H^+ 交换对 AO 测定溶酶体 H^+ 转运的影响

在不启动 H^+ 泵的情况下, 测定体系中的 K^+ 与溶酶体内的 H^+ 可进行交换而使其内部 pH 升高 0.2 个单位左右, 这种碱化作用能促进启动 H^+ 泵后的 H^+ 转运^[7,10]. 图 6 表明, 在相同条件下, 加 ATP 前溶酶体在测试体系中的温育时间不同 (K^+/H^+ 交换程度不同), 所测 H^+ 转运的水平也不同, 当温育时间从 0min 延长至 2min, 由 ATP 启动 H^+ 泵后 4min 内的 H^+ 转运水平逐渐增加; 但当温育超过 2min 之后, 该促转运作用不再随延长温育时间而明显增强, 说明该条件下进行 2min 的 K^+/H^+ 交换足矣. K^+/H^+ 作为启动 H^+ 泵前的反应, 可促进 H^+ 的转运, 而 Cl^- 等阴离子与 H^+ 的同向转运, 经部分平衡 H^+ 正电荷的跨膜移动, 也可促进 H^+ 转运^[7].

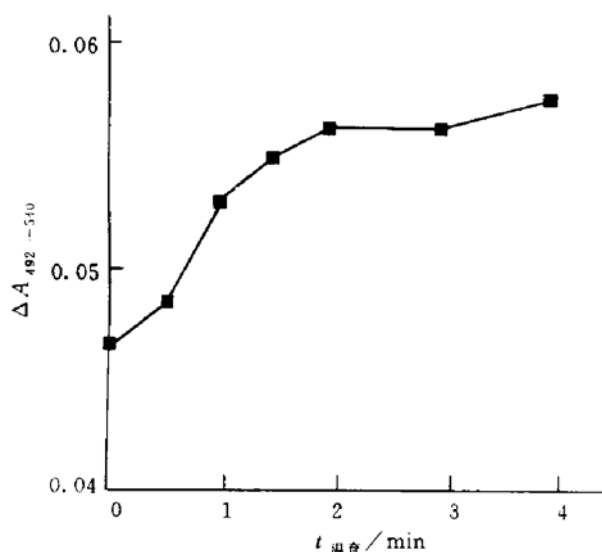


图6 溶酶体在含 100mmol/L KCl 的测试体系中的温育时间对 AO 测定 H^+ 转运中 $\Delta A_{492-540}$ 的影响

各测样中 AO 均为 $5\mu\text{mol/L}$, 溶酶体蛋白含量均为 0.33mg/ml $n=3$.

2.7 AO 与溶酶体共育时间对测定 H^+ 转运的影响

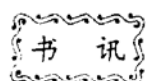
在启动 H^+ 泵前, AO 与溶酶体的共育时间对测定 H^+ 转运的效果有明显影响, 当分别共育 0, 1 和 2min 时, 加 ATP 前与加 ATP 4min 后的 $\Delta A_{492-540}$ 之差分别为 0.056, 0.035 和 0.027, 说明加 ATP 前即刻加入 AO 的测定灵

敏, 实质上这是减少了启动 H^+ 泵前 AO 的进入, 从而加剧了加 ATP 后 AO 的进入, 故有较大的 $\Delta A_{492-540}$ 下降。

最后要说明, 在用 AO 测 H^+ 转运的国外文献中, 几乎全用差吸收法, 而极少见用荧光法, 我们经大量实验认为荧光法不灵敏, 这可能与 AO 聚合时在 530nm 的荧光自猝灭效率低有关, 相比之下, 对同等水平的 H^+ 转运, 差吸收测定却很灵敏, 但如忽略本文所提问题, 灵敏度会大大下降。

参 考 文 献

- 1 Dell'Antone P, Colonna R, Azzone G F. *Biochim Biophys Acta*, 1971; **234**: 541
- 2 Gluck S, Kelly S, Al-Awqati Q. *J Biol Chem*, 1982; **257** (16): 9230
- 3 Palmgren M G. *Plant Physiol*, 1990; **94**: 882
- 4 Dell'Antone P. *Biochem Biophys Res Commun*, 1979; **86** (1): 180
- 5 Cuppoletti J, Aures-Fischer D, Sachs G. *Biochim Biophys Acta*, 1987; **899**: 276
- 6 Dell'Antone P. *FEBS Lett*, 1984; **168** (1): 15
- 7 Ohkuma S, Moriyama Y, Takano T. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982; **79**: 2758
- 8 Adelsberg J V, Barasch J, Al-Awqati Q. *Meth Enzymol*, 1989; **172**: 85
- 9 Moriyama Y, Takano T, Ohkuma S. *J Biochem*, 1982; **92**: 1333
- 10 Smith M L, Greene A A, Potashnik R *et al.* *J Biol Chem*, 1987; **262** (3): 1244



欢迎订阅《蛋白质与核酸序列分析基础》

核酸和蛋白质序列的计算机分析是分子生物学研究的一项新技术, 并逐渐形成一门由分子生物学和计算机信息处理技术相结合的交叉学科——生物信息学 (Bioinformatics). 它的基本出发点是利用数据库和软件技术对大量积累的生物大分子序列数据和实验新测定的序列进行结构比较和统计学分析, 推导出序列同源性, 揭示出分子的结构、功能和进化关系。

军事医学科学院医学情报研究所王槐春编写的《蛋白质与核酸序列分析基础》一书已由人民军医出版社出版。该书是我国第一部关于生

物信息学的专著, 它介绍了核酸和蛋白质数据库, 各种基本的序列分析方法和应用程序, 并用大量的图表和实例加以说明, 力图使不熟悉计算机的分子生物学家容易接受。全书共分 7 章 250 余页。该书可供生物化学和分子生物学科研究人员及生物技术软件设计人员参考, 也可作为大学生物物理、生物化学专业的研究生和高年级本科生的参考用书。该书定价每册 10 元, 欢迎订阅, 欲订购者请与北京市太平路 27 号军事医学科学院医学情报研究所王槐春联系, 邮政编码: 100850, 电话: (01) 6887429 转 4643。

Hongyu, Liu Qingliang. (*The National Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, Beijing Medical University Beijing 100083*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*. 1994; **21** (6): 532—535

Tb (III) as a fluorescent probe was used to study the surroundings of metal ions in FP (fibrinolytic principle). There is a high affinity site of Ca^{2+} in every FP molecule and Ca^{2+} ions are located near the Trp. When Tb (III)-FP was excited by 222nm and 233nm, it is possible that energy transfer occurs as follows: $\text{Trp} \rightarrow \text{Tb}^{3+}$, $\text{Trp} \rightarrow \text{Tb}^{3+} \rightarrow \text{Phe}$, $\text{Tb}^{3+} \rightarrow \text{Phe}$, $\text{Tb}^{3+} \rightarrow \text{Trp}$. These results indicate that Phe may combine with Tb (III). The results of calculations indicate that the distance between Trp and Tb (III) is about 5.66 Å.

Key words agistrodon acutus, venoms, fibrinolytic principle (FP), fluorescent probe

A Study and Simulation on the Superposition Imaging in the Optical Modeling Compound Eye of Beijing Firefly. Wu Meiyang, McIntyre D. (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*. 1994; **21** (6): 535—539

The dioptic system of compound eye of Beijing firefly was simulated on the basis of the real parameters measured from its structure physiology and its known GRIN lens properties. The size of the model and values of refractive index were based upon the measured values of actual compound eye. It was proved that the compound eye of Beijing firefly was a refracting superposition eye by the computer ray tracing model of the compound eye. Parallel light rays incident through the superposition aperture were focussed across the clear zone onto the retina and formed a blur-circle with a certain half-width value. The number of signal

light rays and the ratio of signal and noise were increased as the distance to the image plane from exocone proximal tip were increased. The maximum was at the retina level.

Key words compound eye of Beijing firefly, optical model, superposition image

Study of the Measurements with Acridine Orange in Protons Transportation of Lysosome H^+ -ATPase. Zhang Guojiang, Wang Jia, Yao Junlan, Liu Xiaoqi. (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*. 1994; **21** (6): 539—543

The different range characteristics of acridine orange in absorption and fluorescence is dependent on its concentrations. The importance and mechanism as well as principles of choosing correct acridine orange concentration and rational amounts of lysosome in the assay of protons pumping are discussed. The obvious influences of the incubation time of acridine orange with lysosome and the K^+/H^+ exchange upon the measurements of proton transport are studied.

Key words acridine orange, lysosome, H^+ -ATPase, proton

Stains-all staining Assay for Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Activity. Zhang Jun, Lin Zhoukun. (*Department of Biology, Nankai University, Tianjin 300071*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*. 1994; **21** (6): 544—546

A polyacrylamide gel electrophoresis-stains-all staining assay for terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) activity in purified TdT and leucocytic homogenate of normal and leukemic patients has been developed. The results show that stains-all [(1-ethyl-2-[(3-(1-ethyl-naphtho