

技术与方法

大鼠脑组织中一氧化氮合酶测定

王成彬 田亚平 沈文梅 汪德清 蒋赐恩

(解放军总医院生化科, 北京 100853)

摘要 在含有一氧化氮合酶 (NOS) 底物左旋精氨酸 (L-Arg), 辅助因子还原性辅酶 II (NADPH)、四氢生物喋呤 (BH_4)、黄素单核苷酸 (FMN), 黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD) 以及 Ca^{2+} 、钙调蛋白等溶液中加入大鼠脑组织匀浆离心上清液, 组成酶反应体系. 37°C 温育 80 min, 应用 N-(1-萘基)-乙二胺、对氨基苯磺酸的重氮、偶氮反应测定酶反应体系中一定时间内 NO 代谢产物 NO_2^- 浓度变化, 建立一种简便的 NOS 活性测定方法. 反应体系最佳 pH 为 7.4, $K_m = 0.1 \text{ mmol/L}$, 体系内 NO_2^- 生成量与加入样品量之间有良好的线性关系 ($r = 0.998$). 此方法简单、方便、重复性好, 批内 CV 为 3.69%, 批间 CV 为 5.16%. 10 只健康大鼠脑组织中 NOS 活性为 $(39.61 \pm 7.64) \text{ nmol}/(\text{min} \cdot \text{g})$.

关键词 大鼠脑组织, 一氧化氮合酶, 一氧化氮, 亚硝酸盐

一氧化氮合酶 (NOS) 转移左旋精氨酸 (L-Arg) 胍基末端上的氮原子与氧结合产生一氧化氮 (NO)^[1]. NO 是一种反应极强的自由基, 它兼有第二信使和神经递质的作用, 介导和调节多种病理生理过程^[2]. NOS 主要分为两大类: 原生酶 (cNOS) 和诱生酶 (iNOS). iNOS 能够被细胞因子、细菌内毒素等诱导剂诱导激活, 但不依赖于 Ca^{2+} 和钙调蛋白的存在. cNOS 则相反, 其活性表达不受诱导剂影响, 需要 Ca^{2+} 和钙调蛋白. 脑组织中的 NOS 主要为 cNOS. 目前, NOS 测定大多采用放射强度测定法^[3], NOS 作用于 ^3H 标记底物 L-Arg 后, 用液体闪烁计数器测定产物 ^3H 左旋胍氨酸生成量, 以此计算 NOS 活性. 尽管此种测定方法灵敏度相对较高, 但测定过程复杂, 需要比较昂贵的仪器, 限制了方法的普及. 我们参考目前研究 NO 和 NOS 的有关文献^[4,5], 通过测定 NO 稳定代谢产物 NO_2^- 浓度变化, 建立了一种简单实用的 NOS 测定方法.

1 材料

1.1 试剂

L-Arg、NADPH (纯度 98% 的四钠盐)、FAD、FMN、二硫苏糖醇 (DTT)、钙调蛋白和 N-单甲基左旋精氨酸 (L-NMMA) 购自 Sigma 公司, BH_4 购自 ICN 公司, 三羟甲基胺基甲烷 (Tris, Serva 公司产品), D-Arg (中国科学院上海生物化学研究所产品), NaCl、 CaCl_2 、 MgCl_2 和 EDTA (均为北京化工厂生产的分析纯试剂).

1.2 动物

Wistar 大鼠, 体重 200~250g, 雌雄各半 (本院动物实验中心提供).

2 方法

2.1 大鼠脑组织一氧化氮合酶的制备

取健康 Wistar 大鼠, 断头后立即分离整个脑组织, 用事先准备好的冰浴 pH 7.4

50 mmol/L Tris 缓冲液 (TBS) 冲洗三次, 用剪刀剪碎后置入玻璃匀浆器中, 加入适量同上 Tris 缓冲液, 在冰浴中匀浆. 匀浆液 10 000 g 0~4℃ 高速离心 30 min, 收集离心上清液立即存放到 -40℃ 冰柜中备用.

2.2 酶反应体系的建立和 NO_2^- 测定

酶反应体系总体积 200 μl , 其中 NADPH 0.1 mmol/L、 BH_4 50 $\mu\text{mol/L}$ 、FAD 10 $\mu\text{mol/L}$ 、FMN 10 $\mu\text{mol/L}$ 、DTT 1 mmol/L、L-Arg 1 mmol/L、 CaCl_2 1 mmol/L、 MgCl_2 0.1 mmol/L、钙调蛋白 5 μg 和大鼠脑组织匀浆离心上清液 50 μl (0.1~0.2 mg 蛋白质). 反应体系 37℃ 避光温育 80 min, 加入含 5% 磷酸的 1% 对氨基苯磺酸 200 μl , 0.1% N-(1-萘基)-乙二胺 200 μl , 用 BT-224 半自动生化分析仪比色测定酶反应体系中的 NO_2^- 浓度^[6].

2.3 酶反应体系中的蛋白质定量

用紫外光吸收法^[7]测定大鼠脑组织匀浆离心上清液中的蛋白质浓度, 以此计算出酶反应体系中的蛋白质量.

2.4 酶活性表示方法

用 1 mg 蛋白质在酶反应体系中 1 min 产生的 NO_2^- 量, 表示大鼠脑组织中 NOS 的活性.

3 结果与讨论

3.1 底物 L-Arg 对 NOS 活性的影响

NOS 以 L-Arg 为底物, 反应体系中不加 L-Arg, 几乎没有 NO_2^- 产生, 0~100 $\mu\text{mol/L}$

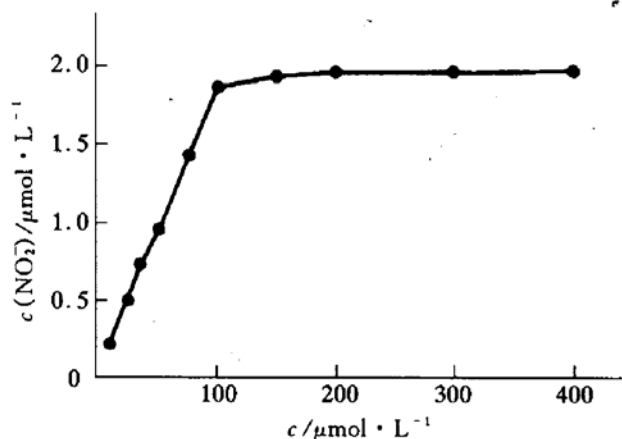


图1 L-Arg 浓度对 NO_2^- 生成量的影响

范围内, NO_2^- 的生成量依赖于 L-Arg 浓度 (图 1). 用等浓度 D-Arg 替代 L-Arg 作底物, 反应体系中 NO_2^- 生成量类似于不加 L-Arg. 在酶反应体系中加入 150 $\mu\text{mol/L}$ L-Arg 竞争性抑制剂——其类似物 L-NMMA, NO_2^- 生成量减少 90%. 说明本实验建立的 NOS 测定方法具有较高的特异性, NO_2^- 的生成速率反映着体系中 NO 的产生速度. 根据图 1, 按照 L-B 作图, 求得 K_m 为 0.1 mmol/L.

3.2 线性反应时间观察

在 NOS 测定体系中, 随着反应时间的延长 NO_2^- 浓度增加 (图 2). 由图 2 可见, 最初 20 min 为一延滞期, 20~80 min 为线性反应阶段, 80 min 以后随着时间的延长, NO_2^- 浓度不再成比例增加, 逐渐进入平台期. 因此我们在实验中选用 20~80 min 为酶反应时间.

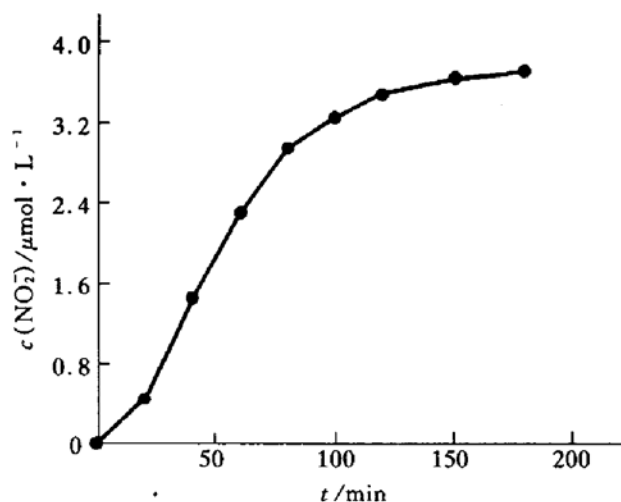


图2 酶反应时间观察

3.3 样品量与酶活性关系观察

同一样品, 随着样品量增加, NO_2^- 浓度上升, 二者有良好的线性关系 (图 3).

3.4 最适 pH 的选择

用 Tris 缓冲液配制 pH 6.0~9.0 系列酶反应体系溶液, 测定同一样品中的 NOS 活性, 结果显示 pH 在 7.4 时酶活性最大.

3.5 辅助因子对 NOS 活性的影响

NADPH、 BH_4 、FAD 和 FMN 是 NOS 的必需辅助因子^[8], NOS 转移 L-Arg 到左旋瓜氨酸释放 NO, 这些辅助因子在羟化、氢和电

子转移方面有非常重要的作用。

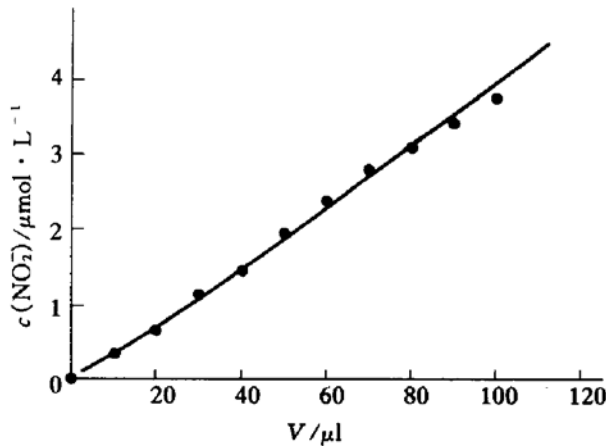


图3 样品量对 NO₂⁻ 产生的影响

表1 四种辅助因子对 NOS 活性的影响

反应体系 编号	NADPH	BH ₄	FAD	FMN	c(NO ₂ ⁻) / μmol·L ⁻¹
1	+	+	+	+	2.15
2	-	+	+	+	0.27
3	+	-	+	+	1.44
4	+	+	-	+	1.74
5	+	+	+	-	1.59

注: + 为酶反应体系中加入该成分; - 为酶反应体系中不加该成分。

从表1中可以看出, NADPH 是 NOS 最重要的辅助因子, 反应体系中缺少 NADPH, NO₂⁻ 生成减少近 90%, 在 0~100 μmol/L 范围内 NOS 活性依赖于 NADPH 浓度 (图4)。

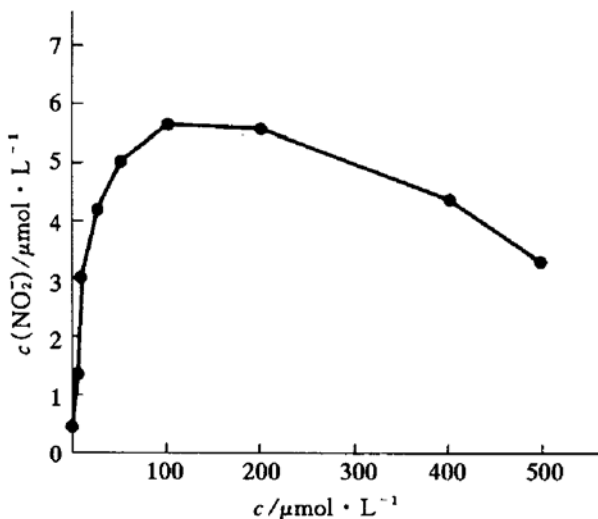


图4 NADPH 浓度对 NOS 影响

3.6 精密度试验

同一样品, 重复测定 20 次, 批内 CV = 3.69%。标本 - 40℃ 冰冻保存, 每日测定 4 次, 连续测定 5 d, 批间 CV = 5.16%。由此看出本方法重复性良好。

3.7 试剂稳定性观察

新配试剂分别进行 4℃ 冷藏和 -25℃ 冷冻保存, 每日用两种试剂测定同一份混合样品。结果: 4℃ 保存, 3 d 后测定结果逐渐下降。而用 -25℃ 保存试剂连续测定 10 d, 结果稳定。故配制好的试剂宜冷冻保存。

3.8 健康大鼠脑组织 NOS 活性观察

用本方法测定 10 只健康 Wistar 大鼠脑组织中 NOS 活性, 其结果为 (39.61 ± 7.64) nmol/(min·g) ($\bar{x} \pm s$)。

参 考 文 献

- 1 Palmer R M J, Ashton D S, Moncada S. *Nature*, 1988; 333: 664
- 2 Kiechle F L, Malinski T. *Am J Clin Pathol*, 1993; 100: 567
- 3 Bredt D S, Snyder S H. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990; 87: 682
- 4 Mittal C K, Jadhav A L. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994; 203: 8
- 5 White K A, Marletta M A. *Biochemistry*, 1992; 31: 6627
- 6 Ignarro L J, Buga G M, Wood K S *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987; 84: 9265
- 7 李成文. 现代免疫化学技术. 上海: 上海科学技术出版社, 1992: 8~10
- 8 Marletta M A. *J Biol Chem*, 1993; 268: 12231

The Measurement of Nitric Oxide Synthase in Rats' Brain. Wang Chengbin, Tian Yaping, Shen Wenmei, Wang Deqing, Jiang Cien (Department of Biochemistry, PLA General Hospital, Beijing 100853, China).

Abstract An enzyme reaction system which contains L-Arg, NADPH, FAD, FMN, BH₄, Ca²⁺ etc, has been studied to determine the activity of nitric oxide synthase (NOS) in rats' brain. After being incubated at 37℃ for

80 min in dark with samples, the sulfanilic acid and N- (1-naphthyl) -ethylenediammonium was added to the reaction system to measure the concentration of produced nitrite in system. It was found that the optimum pH for the enzyme reaction was 7.4, K_m was 0.1 mmol/L. There was a relationship between the amounts of sample and nitrite concentration in the system. This

method is simple and convenient. Intra-assay CV value is 3.69% and inter-assay CV value is 5.16%. The specific activity of nitric oxide synthase in ten rats' brains is (39.61 ± 7.64) nmol/ (min·g).

Key words rats' brain, nitric oxide synthase, nitric oxide, nitrite

胰蛋白酶活性的定量测定方法

张东裔 唐建国¹⁾ 张龙翔

(北京大学生命科学学院, 北京 100871)

摘要 对甲苯磺酰基精氨酸甲酯 (TAME) 是胰蛋白酶的专一性底物. TAME 经胰蛋白酶水解释放出的对甲苯磺酰基精氨酸与活性测定混合物中的 NaOH 反应, 导致溶液 pH 值的下降. 以酚红为指示剂, 通过测定 555 nm 处光吸收值的降低可以监测 pH 的变化. 在 0.001~0.3 μ g 的范围内, 胰蛋白酶含量与 555 nm 处光吸收值的降低呈线性关系.

关键词 胰蛋白酶, 活性测定, 对甲苯磺酰基精氨酸甲酯, 酚红

基因工程表达产生的胰蛋白酶及其突变体的活性, 常用对甲苯磺酰基精氨酸甲酯 (N α -p-tosyl-L-arginine methyl ester, TAME) 活性胶法定性监测^[1]. 在活性胶方法的基础上, 发展了一个胰蛋白酶活性的定量测定方法. 利用 TAME 作为胰蛋白酶的专一性底物, 在一定条件下被胰蛋白酶水解后释放出的游离羧基与反应体系中的氢氧化钠发生中和反应, 导致溶液 pH 值降低, 以苯酚红 (phenol red) 为指示剂, 测定溶液在 555 nm 处光吸收值的变化, 可以快速测得胰蛋白酶活性数据. 胰蛋白酶在一定的浓度范围内与 555 nm 处光吸收值的降低呈良好的线性关系, 因此可以作为定量测定胰蛋白酶的方法.

1 材料和方法

1.1 材料

TAME、胰蛋白酶、嗜热菌蛋白酶为 Sigma 公司产品, 其中胰蛋白酶的活力为

10 700 U/mg, 嗜热菌蛋白酶活力为 54 U/mg. 胰凝乳蛋白酶和枯草杆菌蛋白酶由上海丽珠生化技术公司提供, 活力分别为 4000 U/mg 和 2000 U/mg. 分析纯苯酚红 (pH 变色范围: 6.8 黄~8.4 红) 为北京化学试剂公司产品. 其他试剂均为国产分析纯.

1.2 方法

苯酚红溶液的配制: 40 mg 苯酚红用蒸馏水溶解, 加入 240 μ l 1.0 mol/L 的 NaOH 溶液, 用蒸馏水定容至 200 ml.

在 1.5 ml 苯酚红溶液中加入 0.2 ml 2 mmol/L TAME 溶液、20 μ l 1 mol/L CaCl₂ 溶液, 适量的酶用水溶解至 0.28 ml, 反应总体积为 2 ml, 此时溶液的 pH 值为 6.90. 室温下 10 min 内在紫外可见分光光度计 (UV-120-02, 岛津) 上测定 555 nm 的光吸收值变化. 以不加酶液的同样反应为对照, 以蒸馏水溶液

¹⁾ 通讯联系人.

收稿日期: 1996-01-31, 修回日期: 1996-03-25