

中国科学院动物研究所编辑

动物学集刊

SINOZOOLOGIA

3

科学出版社

1985年3月

柞蚕蛹血高密度脂蛋白的超速离心分析及生化特性

冯 慧 陈娥英 关雪辰

(中国科学院动物研究所)

毕坎华 李小洁

(中国科学院生物物理所)

昆虫循环是开放系统,各类器官和组织浸润于血淋巴之中,因此血淋巴对于各类物质的运输、贮存及代谢等方面均发挥作用。血淋巴的重要组分脂蛋白由于它在脂类和激素运转及代谢中的功能,近年对于它的研究,日益受到重视(Wyatt等,1978)。根据对于多种昆虫血淋巴脂蛋白的研究,一般可以分为两大类:一类为高密度脂蛋白(HDL)或称脂蛋白 I,在昆虫体的脂类和激素的运转中起重要作用;另一类是极高密度脂蛋白(VHDL),或称脂蛋白 II,主要是卵黄原蛋白。

我国是重要的柞蚕丝生产国,柞蚕在黄河中下游及东北各省是一种重要的经济昆虫。我们利用柞蚕蛹作材料,分离了血淋巴脂蛋白。对于高密度脂蛋白进行纯化,并鉴定了它的一些特征(冯慧等,1982)。在此基础上本文对于已纯化的柞蚕蛹血淋巴 HDL,测定了漂浮系数、蛋白质含量、蛋白质的氨基酸组成、脂类的组成和含量。并对于不同性别、不同发育期的生化特征,进行比较和讨论。

材料与方 法

1. 材料

中国河南省一化柞蚕 (*Antheraea pernyi*) 蛹。秋季将收集的蚕蛹置于室外 2 个月,然后贮存于冰箱备用。

2. 方法

柞蚕蛹血淋巴的收集,血淋巴脂蛋白的分离以及高密度脂蛋白的纯化及鉴定等按照冯慧等(1982)方法进行。

3. 漂浮系数 (S_{f20})

纯化的 HDL 应用日立 UCA-1A 分析超速离心机测定了漂浮系数。此分析离心机

本文于 1983 年 6 月收到。

高速可达 60,000 转/分。具有通常的三种光学系统。并附有扩散测定设备。

4. 蛋白质的测定

HDL 的蛋白质含量按 Lowry 等 (1951) 的福林-酚方法测定。以牛血清白蛋白作标准。

5. HDL 蛋白质的氨基酸组成

已纯化的 HDL 样品,以有机溶剂除去脂类后,加入 6N HCl,装入玻管中密封,在 110℃ 消化 24 小时。所得氨基酸样品在日立 835-50 氨基酸自动分析仪中分析。

6. 脂类分析

取一定体积已纯化的 HDL 样品,加 10 倍体积的氯仿:甲醇 (1:1v/v) 液。匀浆 3 分钟。在 0℃, 5,000 转/分离心 30 分钟。将上清液取出,加二倍体积的水洗。将含脂类的上相小心吸出,在 70℃ 条件下蒸干。称得恒重,即为脂类样品。此方法系 Folch 等 (1957) 法加以修改。

脂类的薄层层析按下述方法进行。取制备好的硅胶 G 薄层板 (20×18 厘米)。置于 110℃ 活化一小时。然后在离边 1.5 厘米处点样。标准液可将各种脂类如油酸甘油酯、卵磷脂、胆固醇、胆固醇油酸酯及油酸各称取少量溶于氯仿。然后取出 10 微升点样。样品也溶于氯仿。点样 20—40 微升。然后展层。对于中性脂类展层的溶剂系统可用:

1) 双项系统: (a) 异丙醚:醋酸, 96:4 (v/v); (b) 石油醚:乙醚:醋酸, 90:10:1 (v/v/v), 同一方向用 (a) 展层一次,再用 (b) 展层一次。

2) 单项系统,展层剂与 (b) 同,一次展层。展层后以碘蒸气显色。

结果与讨论

(一) HDL 的漂浮系数

柞蚕蛹从 1 月底至 3 月底羽化前,分别雌雄制备了纯化的血淋巴 HDL。共五批样品。用日立 UCA-1A 分析超速离心机,测定了 S_{f20} 。所用条件如下: 介质密度 1.17 克/毫升, 转速 52,000 RPM, 相板角 65°, 温度 16—18℃, 换算到 20℃。时间 (分) 是达到最高速度后照象时间 (见表 1)。所有 S_{f20} 的照相图谱此处从简。

从表 1 可以见到 S_{f20} 的数值,雄性为 2.2—3.5; 雌性为 2.6—3.4。从每一对样品的数据中可以看到: 雌、雄数据或完全相同,或非常接近,表示柞蚕蛹 HDL 的漂浮系数没有雌雄差异。蛹不同时期的 S_{f20} 值也很近似。Thomas 等 (1968) 测定了惜古比天蚕蛹血淋巴 HDL, 密度为 1.17 毫克/毫升, S_{f20} 为 3.89, 数值和我们的比较接近。这两种蚕都是天蚕科。都以蛹滞育。他们的样品没有分雌雄,也没有说明在蛹的什么时期取样。

(二) 柞蛹血淋巴及 HDL 的蛋白质含量变化

用 Lowry 等 (1951) 福林-酚试剂的光电比色法,测定了柞蛹血淋巴以及相应的 HDL 的蛋白质含量。从表 2 可以看到柞蛹后期蛹血蛋白质逐渐增长,到羽化前增长约一倍。

表1 柞蚕蛹血淋巴 HDL 的超速离心分析及漂浮系数

样品	性 别	S _{f20}	浓 度 w/v (%)	达 速 后 照 相 时 间 (分)					
				1	2	3	4	5	6
1	♂	3.5	1.0	9	14	19	24	29	34
	♀	3.1	0.9	8	13	18	23	29	33
2	♂	2.6	0.9	10	15	20	25	30	35
	♀	2.6	0.8	9	14	19	24	29	34
3	♂	2.2	1.0	14	19	24	30	34	39
	♀	2.6	1.0	16	21	26	31	36	41
4	♂	3.4	0.5	10	15	20	25	30	35
	♀	3.4	0.5	15	20	25	30	35	40
5	♂	3.4	0.5	14	19	24	29	34	39
	♀	3.3	0.5	10	15	20	25	30	35

注: 转速: 52,000RPM; 相板角: 65°; 介质密度: 1.17 克/毫升。

其中雌蛹比雄蛹高约一倍。雌性为 80—154 微克/微升; 雄性 56—84 微克/微升。相应血淋巴 HDL 的蛋白质含量, 雌性为 19.8—50 微克/微升; 雄性为 21.4—64.0 微克/微升。

昆虫蛹如蓖麻蚕的血淋巴蛋白质在羽化前逐渐上升。滞育昆虫在成虫发育开始后至羽化前也逐渐上升。雌性含量高于雄性。相应的 HDL 的蛋白质含量也是随着蛹的发育逐渐升高, 和原有血淋巴蛋白质含量不同的是雄性比雌性略高。在蛹的晚期, 可能雌蛹中 HDL 的蛋白质部分转移到卵巢, 作为胚胎发育之需。Chino 等 (1981) 证明在柞蚕 (*Philosamia cynthia*) 100 毫克卵蛋白质内有 7.7 毫克来自 HDL。

蝗虫 (Peled 等, 1975) HDL 的蛋白质为 18.4 微克/微升或 21.8 微克/微升。与我们早期蛹的蛋白质含量相当。

表2 柞蚕蛹血淋巴及相应 HDL 的蛋白质含量

样 品	原血淋巴(微克/微升)		HDL (微克/微升)	
	♀	♂	♀	♂
1	80.0	56.0	19.8	21.4
2	116.0	63.0	17.8	25.6
3	110.0	66.0	23.2	23.2
4	110.0	64.0	30.8	34.0
5	121.0	76.0	25.2	30.0
6	126.0	76.0	16.8	25.6
7	119.0	76.0	25.6	25.6
8	112.0	72.0	47.0	34.0
9	154.0	84.0	50.0	64.0

注: 自春季 1—3 月份样品 1—6 每周取样一次, 7—9 每二周取样一次。每次为二个样品的平均数。

(三) HDL 蛋白质的氨基酸种类和含量

纯化的 HDL 除去脂类后,以 6N HCl 在 110℃ 将蛋白质消化 24 小时,水解所得氨基酸以氨基酸自动分析仪(日立 835-50)测定了 17 种氨基酸的种类及其含量。本实验的样品除去表 2 中 1 和 7 两批样品外的 7 批样品,从表 3 中所得结果如下: 酸性氨基酸含量最高,如谷氨酸 11.2—14.2%, 门冬氨酸 10.0—12.8%, 它们是组成丝的主要氨基酸。蛹期苯丙氨酸的含量逐渐下降,从 5.9% 降到 2.9%。而酪氨酸的含量逐渐上升,从 0.4% 升到 3.9%。苏氨酸的含量增长约 3 倍,从 4.2% 增至 12.9%。碱性氨基酸中以赖氨酸的含量最高,7.4 至 8.6%。精氨酸次之,3.8—4.7%, 组氨酸的含量最低,0.2—2.4%。缬氨酸为 7.4—8.6%, 亮氨酸为 7.5—9.6%, 异亮氨酸为 5.1—5.5%。含硫氨基酸含量很低或者不存在。如胱氨酸为 0—0.7%, 甲硫氨酸为 0—1.4%。脯氨酸的含量较低,变化不大,为 2.5—3.5%。

将柞蚕和其他昆虫如柞蚕 (Chino 等, 1969)、蝗虫 (Gellissen 等, 1980)、蜚蠊 (Chino 等, 1981) 的血淋巴 HDL 蛋白质的氨基酸组成进行比较,从表 4 可以看出,它们之间有很大的相似性。如酸性氨基酸、谷氨酸和门冬氨酸含量都比较高。含硫氨基酸如甲硫氨酸和胱氨酸不存在或含量很低。其它氨基酸的含量也比较类似,如甘氨酸、丝氨酸、丙氨酸含量介于 5.6—7.6% 之间。碱性氨基酸中赖氨酸含量最高,7.6—10.7%, 精氨酸次之,2.7—3.9%, 组氨酸最低,1.9—3.9%。

从表 4 还可以看出,昆虫 HDL 蛋白质的氨基酸种类比较一致。氨基酸含量变化幅度也不大。

由于 7 批样品都是按雌、雄分别取样的。文献上很少见到这样的例子。雌、雄的氨基

表 3 柞蚕血淋巴 HDL 的氨基酸百分组成

样品 性别 氨基酸	1		2		3		4		5		6		7	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
门冬氨酸	12.0	12.8	11.8	12.4	10.0	10.6	10.4	10.5	11.6	11.9	12.1	12.9	11.7	11.5
苏氨酸	4.4	4.2	4.5	4.7	4.5	4.6	4.5	4.5	4.5	4.4	4.6	5.0	4.6	4.5
丝氨酸	7.0	7.1	6.1	6.3	6.1	6.4	6.3	6.4	6.0	6.0	6.2	6.8	6.1	6.0
谷氨酸	13.1	11.8	13.3	14.0	11.7	12.1	12.0	12.0	12.0	13.3	13.7	12.2	12.8	12.9
脯氨酸	2.5	2.6	2.6	2.7	2.5	2.6	2.5	2.8	2.9	2.9	2.6	2.8	3.5	3.5
甘氨酸	6.3	6.6	6.1	6.4	6.2	6.2	6.3	6.4	6.0	6.1	6.3	6.4	6.5	6.2
丙氨酸	7.3	7.6	5.6	5.7	5.5	5.8	5.8	5.8	5.6	5.6	5.6	5.6	6.0	5.8
胱氨酸	—	—	0.6	0.6	0.7	0.2	0.6	0.2	0.7	0.7	0.6	0.7	0.1	0.5
缬氨酸	7.3	7.7	6.7	6.6	6.8	6.6	6.5	6.7	6.9	6.8	6.7	6.3	7.0	6.8
甲硫氨酸	0.3	—	0.4	1.3	0.6	0.3	0.4	0.4	1.3	1.4	0.9	1.3	0.5	1.4
异亮氨酸	5.2	5.5	5.4	5.4	5.5	5.3	5.3	5.5	5.4	5.4	5.4	5.1	5.5	5.2
亮氨酸	9.2	9.6	8.1	8.1	8.2	8.5	8.1	8.4	8.0	8.2	8.2	7.6	8.7	8.3
酪氨酸	2.1	0.4	2.9	3.2	3.0	1.6	3.3	2.1	2.7	2.9	3.1	3.2	3.4	3.9
苯丙氨酸	5.2	5.3	4.5	4.2	4.0	4.1	4.2	4.2	4.3	3.3	3.9	4.2	2.9	3.2
赖氨酸	7.9	8.0	7.8	8.1	7.7	7.6	7.6	7.8	7.7	7.6	7.8	8.6	7.6	7.4
组氨酸	1.9	1.9	2.0	2.1	2.0	1.9	0.2	1.9	1.9	2.0	2.2	1.7	2.4	2.2
精氨酸	4.5	4.7	3.5	3.8	3.8	3.9	3.8	3.8	3.8	3.8	3.7	4.1	3.8	3.8

表 4 数种昆虫血淋巴 HDL 的氨基酸百分组成的比较

氨基酸 \ 昆 虫	柞 蚕	柽 蚕	蝗 虫	蜚 蠊
门冬氨酸	11.8	12.6	11.9	11.0
苏 氨 酸	4.5	4.9	5.5	6.6
丝 氨 酸	6.1	6.9	7.6	6.9
谷 氨 酸	13.3	10.4	12.0	10.8
脯 氨 酸	2.6	4.7	5.1	3.8
甘 氨 酸	6.1	6.7	6.2	6.4
丙 氨 酸	5.6	6.3	7.0	6.8
胱 氨 酸	0.6	—	—	0.6
缬 氨 酸	6.7	7.4	7.0	8.4
甲硫氨酸	0.4	0.5	—	0.3
异亮氨酸	5.4	5.8	5.1	4.1
亮 氨 酸	8.1	9.0	9.6	10.7
酪 氨 酸	2.9	2.8	3.9	3.0
苯丙氨酸	4.5	4.8	4.7	4.7
赖 氨 酸	7.8	10.7	7.6	9.3
组 氨 酸	2.0	2.8	1.9	3.9
精 氨 酸	3.5	3.7	3.9	2.7

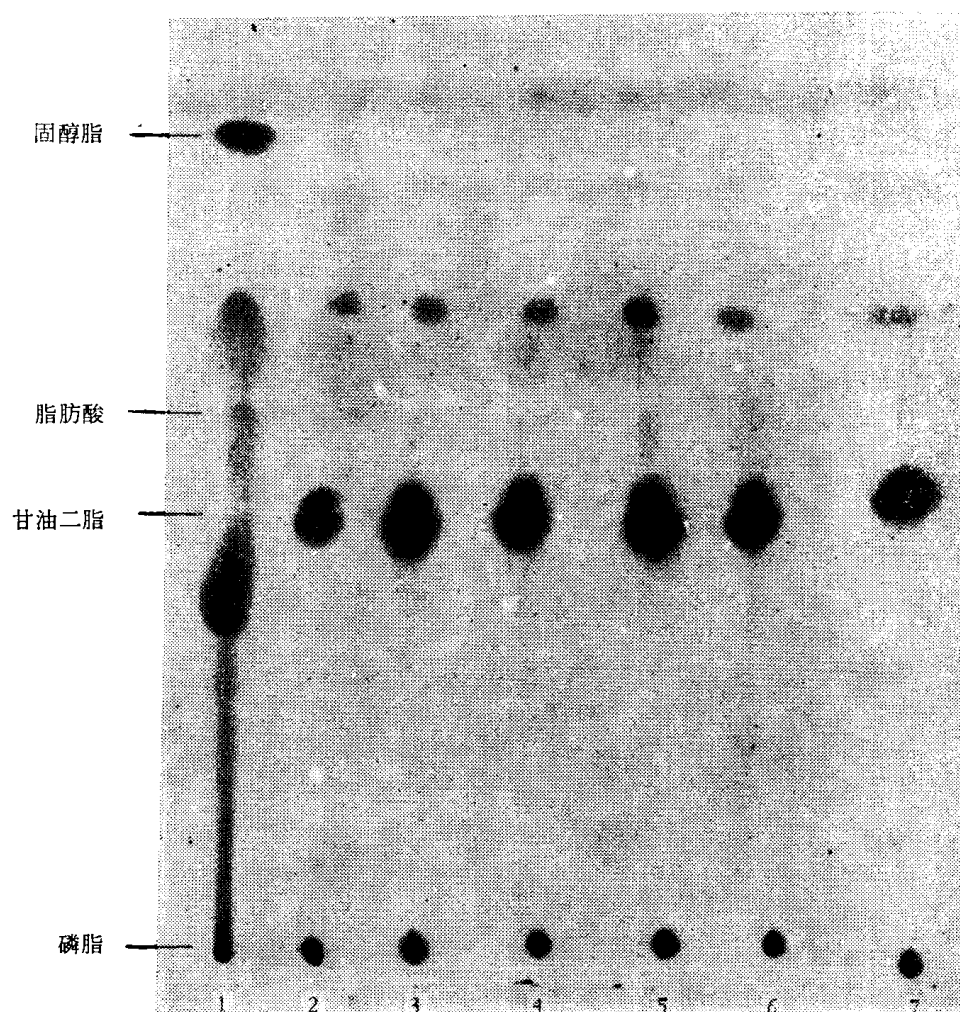


图 1 HDL 脂类的薄层层析 (早、中期蛹)

1. 标准; 2、4、6. ♀; 3、5、7. ♂; 2—5. 早期蛹; 6—7. 中期蛹。

酸种类,除个别含量缺少的以外是一致的。氨基酸组成的差异也不显著。

(四) HDL 的脂类含量

纯化的 HDL 以有机溶剂抽提后经处理,在 70℃ 蒸干,称得恒重。此为 HDL 脂类的重量。与 HDL 蛋白质重量之和,求得 HDL 之总量。由此可算得 HDL 脂类的百分

表 5 HDL 的脂类含量和百分比

样 品	HDL 脂类 毫克/毫升		HDL 蛋白质 毫克/毫升		HDL 脂类 (%)	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂
1	7.0	7.6	23.2	23.2	23.18	24.68
2	7.9	7.8	25.6	25.6	23.58	23.34
3	25.4	19.2	47.0	34.0	35.08	36.09
4	18.2	25.0	50.0	64.0	26.83	28.08

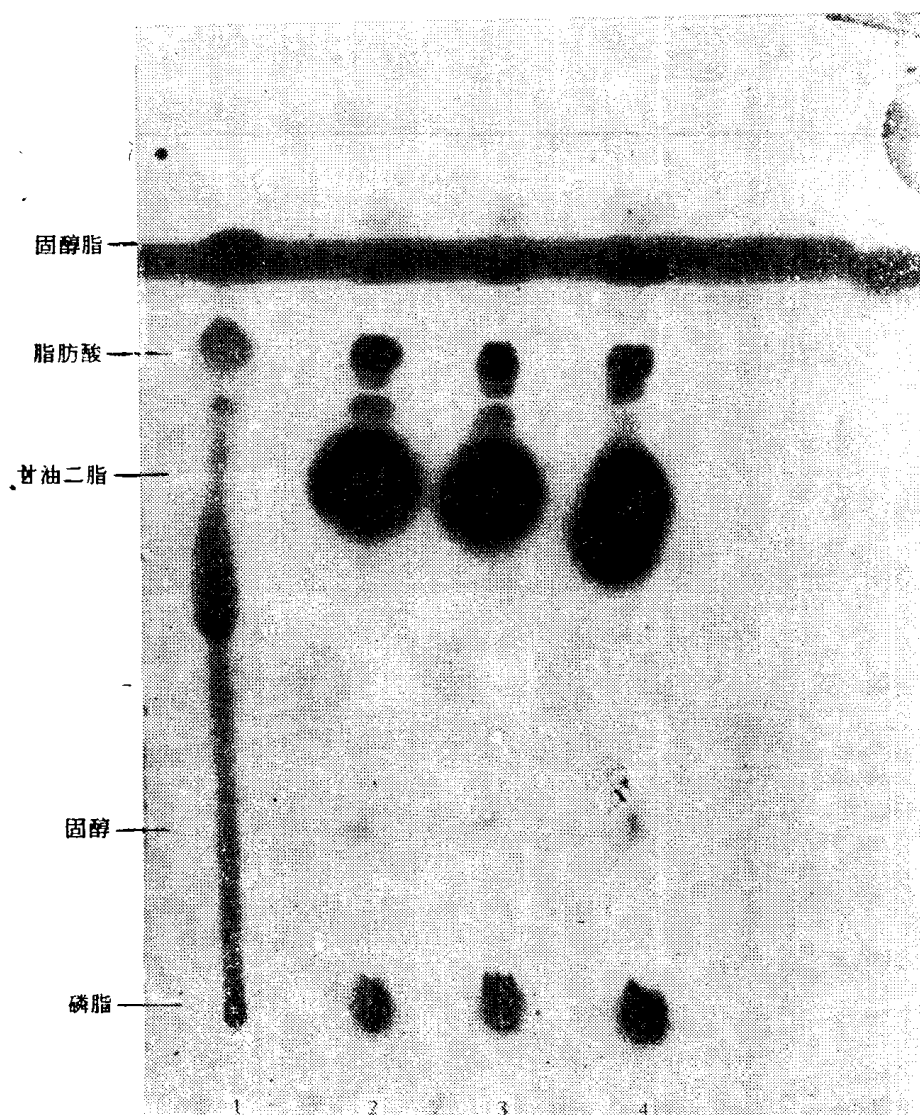


图 2 HDL 脂类的薄层层析(晚期蛹)

1. 标准; 2、3. ♀; 4. ♂。

比含量,将上述纯化的 HDL,从前期、中期及后期共取样 4 批,每批测定两次。测得 HDL 脂类的百分比含量(见表 5)。雌性为 23.18—35.08%,雄性为 23.34—36.09%。蛹的发育后期, HDL 的脂类含量有些上升。但比蛋白质的增长幅度要小些。雌雄差异不显著。有时雄性还高些。和其他昆虫相比较,血淋巴 HDL 的脂类含量因昆虫品种不同也有差异,蝗虫为 26% 或 36% (Peled 等, 1975)。柞蚕 *P. cynthia* (Chino, 1969) 是 44%。

(五) HDL 脂类的薄层层析

将脂类的标准及 HDL 脂类样品在硅胶 G 薄层板上点样。然后以异丙醚:醋酸 (96:4v/v) 和石油醚:乙醚:醋酸 (90:10:1, v/v/v) 双项系统进行展层。以碘蒸气显色。可以得到很清晰的 HDL 脂类的薄层层析图谱。

从图 1, 2 可以看到由下而上的斑点。位于点样原点的是磷脂。上面有一微弱的斑点是固醇类化合物,再往上是斑点大而色深的是甘油二酯。甘油二酯有二种: 1, 3 甘油二酯及 1, 2 甘油二酯。它们是 HDL 脂类中的主要组分。在甘油二酯上面有几个微弱的斑点。其中有游离脂肪酸、甘油三酯等。在顶端的是少量的固醇酯类,还可能有少量长链烃等。如在柞蚕 (*P. cynthia*) 的 HDL 中,含脂类 44%。其中约有一半是甘油二酯,磷脂约占四分之一。其次是胆固醇。甘油三酯只占少量。而在蜚蠊的 HDL 中含脂类约 50%。甘油二酯只占 15%、磷脂占 40% 以上。胆固醇少量,而烃类却占 28%。所以不同昆虫的血淋巴 HDL 中脂类的组分有很大差别。

参 考 文 献

- 冯慧等 1982 柞蚕 (*Antheraea pernyi*) 蛹血淋巴脂蛋白的分离和鉴定。生物化学与生物物理进展 (4): 57—59。
- Chino, H. et al., 1969 Diglyceride-carrying-lipoproteins in the insect hemolymph: Isolation purification and properties. *Biochem. Biophys. Acta* 176: 1—96.
- Chino, H. et al. 1981 Diglyceride-carrying lipoprotein of hemolymph of American cockroach: Purification, characterization and function. *J. Lipid Res.* 22: 7—15.
- Lowry, O. H. et al. 1951 Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265—275.
- Folch, I. et al. 1957 A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 497—509.
- Gellissen, G. et al. 1980 Purification and properties of a diglyceride-binding lipoprotein (LPI) of the hemolymph of adult male *Locusta migratoria*. *J. Comp. Physiol.* 136: 1—9.
- Peled, Y., A. Tietz 1975 Isolation and properties of lipoprotein from the hemolymph of the locust, *Locusta migratoria*. *Insect Biochem.* 5: 61—72.
- Thomas, K. K., L. I. Gilbert 1968 Isolation and characterization of the hemolymph lipoproteins of the American silkworm *Hyalophora cecropia*. *Arch. Biochem. Biophys.* 127: 512—521.
- Wyatt, G. R., M. L. Pan 1978 Insect plasma proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 47: 779—817.

ULTRACENTRIFUGAL ANALYSIS AND BIOCHEMICAL PROPERTIES OF PUPAL HEMOLYMPH HIGH DENSITY LIPOPROTEIN OF OAK SILKWORM

FENG HUI CHEN E-YING QUEN XUE-CHEN

(*Institute of Zoology, Academia Sinica*)

BI KAN-HUA LI XIAO-JIE

(*Institute of Biophysics, Academia Sinica*)

Insect hemolymph lipoprotein plays an important role in lipid and hormone metabolism. The purified hemolymph high density lipoprotein (HDL) of the oak silkworm *Antheraea pernyi* at pupal stage, the flotation coefficient (S_{f20}), protein content and its amino acid composition, lipid content and constituents have been investigated and discussed.

S_{f20} : Five pairs (female and male) of samples were analyzed by analytical ultracentrifugation. For female: 2.6—3.4 and for male 2.2—3.5.

Protein content: During the pupal stage of adult development the hemolymph protein content for female is 80—154 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ and for male it is about its half value i.e. 56—84 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

HDL protein content for female is 17.8—50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ and for male it is 21.4—64.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Amino acids composition of HDL protein: Samples of amino acids of hydrolyzed protein of HDL during pupal stage as mentioned above were analyzed by amino acid analyzer. The amino acid percentage composition was also compared with other insects.

Lipid content and constituents: The percentage of lipid in HDL was 23.18% to 36%. The glyceride esters are predominant, mostly diglyceride. The others are phospholipids. Sterols and sterol esters are present in trace amounts.

激素敏感的腺苷酸环化酶的测定*

刘展环 商秀清 刘兰英

(中国科学院动物研究所内分泌室)

腺苷酸环化酶在多肽激素、生物胺、前列腺素以及许多药物对靶细胞的作用中具有关键性的地位。动物细胞的腺苷酸环化酶大部分定位于细胞膜上,它与膜受体偶联构成细胞接受外部信息的一种复杂系统。激素与受体结合经过偶联与传递过程调节着腺苷酸环化酶的活性。所以测定激素受体结合反应中的腺苷酸活化酶的活性变化,对了解激素的作用原理是极其重要的。

腺苷酸环化酶催化腺三磷(简称 ATP)转变为 3',5'-环腺-磷(简称 cAMP)。测定酶活性的方法通常采用放射性标记(^{32}P , ^{14}C 及 ^3H)的 ATP 为底物(P. Hamet, 1978)。在测定样品中(组织匀浆或分离的粗膜)含大量的 ATP 酶、磷酸二酯酶、核苷酸酶等,而腺苷酸环化酶的含量又很低,所以测定腺苷酸环化酶活性时,必须采用非常有效的手段将产物 cAMP 和其他核苷酸及其代谢物进行分离。本实验采用离子交换树脂及中性氧化铝两次层析法(Soloman, Y., 1974)测定大白鼠五种组织腺苷酸环化酶的活性。

材料与 方法

(一) 试剂

^3H -ATP 放射强度 27 居里/毫克分子(上海原子核研究所产品)。 ^3H -cAMP 放射比强度 27.5 居里/毫克分子(Radiochemical centre 产品)。cAMP (Fluka, A. G. 产品)。中性氧化铝(Merk 产品)。Dowex-50w $\times 8\text{H}^+$ 型 200—400 目(Fluka, A. G. 产品)。闪烁剂为甲苯; Tritonx 100 (55:25), 含 0.4% ppo 和 0.03% popop。

(二) 粗膜的制备

体重 150—200 克 Wistar 种大白鼠断头处死后,用肝脏和心脏用生理盐水灌流,脑、卵巢、睾丸组织立即取出,用含 0.25M 蔗糖的 10mM Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5) 1:10 (w/v) 进行匀浆。匀浆液用四层纱布过滤后 160xg 离心 10 分钟,上清液再经 10,000xg 离心 10 分钟,所得沉淀为粗膜。膜蛋白量用 Lowry 法测定。

(三) 腺苷酸环化酶活性的测定

腺苷酸环化酶活性测定的总体积为 200 微升,反应液含 50mM Tris-HCl, pH 7.5;

本文于 1983 年 8 月收到。

* 本工作承张致一教授指导,特此致谢。

0.5mM $MgCl_2$, 1mM DDT (二硫苏糖醇); 0.2% BSA (牛血清清蛋白); 0.1mM ATP (含约 1 微居里的 3H -ATP, $1 - 2 \times 10^5$ cpm); 膜蛋白 100 微克左右。在 30°C 的水浴中温育 10 分钟, 再在沸水中煮沸 2 分钟, 迅速冷却后加 1 毫升 4 mM cAMP, 4000 转离心 10 分钟。取 1 毫升上清液上 Dowex-50w $\times$ 8 柱 (0.5 $\times$ 2 厘米), 流干后用 4 毫升重蒸水 (用 0.1N NaOH 调 pH 为 7.5) 直接洗脱入中性氧化铝柱 (0.5 $\times$ 3 厘米), 流出液弃去。用 0.5 毫升 50mM Tris-HCl (pH 7.5) 缓冲液洗脱氧化铝柱, 流干后再用 50mM Tris-HCl 液 2 毫升洗脱并收集, 取其中 1 毫升于闪烁杯中, 加入 4 毫升闪烁液测定放射活性。

结果和讨论

(一) cAMP 与其他核苷酸的分离

为了检查 Dowex-50 w $\times$ 8 及中性氧化铝柱分离 cAMP 的效果, 利用非标记的 cAMP 和其他核苷酸在紫外监测下分别测定它们的层析行为, 结果如图 1(a) (b) 所示。Dowex-50 w $\times$ 8 柱吸附腺嘌呤, 对 ATP, ADP 和 AMP 均不吸附。中性氧化铝柱除不吸附腺嘌呤外, 对其他核苷酸均有吸附。cAMP 在以上两种层析柱中均不被吸附。腺苷酸环化酶的活性是以 3H -ATP 转化为 3H cAMP 的放射活性来表示。在酶活性测定时, 反应液经过两次层析后空白管的放射活性仅为 0.02—0.07%, 3H -cAMP 的回收率为 60—80%。本实验采用的两次层析法与离子交换层析-BaSO₄ 沉淀法 (M. Rodbell, 1972) 及中性氧化铝一次层析法 (A. A. White, & T. A. Zenser, 1971) 相比较, 后两种方法 3H -cAMP 的回收率虽可达 90% 以上, 但空白管的放射活性高达 5%, 这些方法比较适用于 α - ^{32}P -ATP 为底物的腺苷酸环化酶活性的测定, 而以 3H -ATP 为底物时则不够理想。两次层析法尽管回收率偏低, 但空白管的放射活性很低, 说明由于 3H -ATP 各

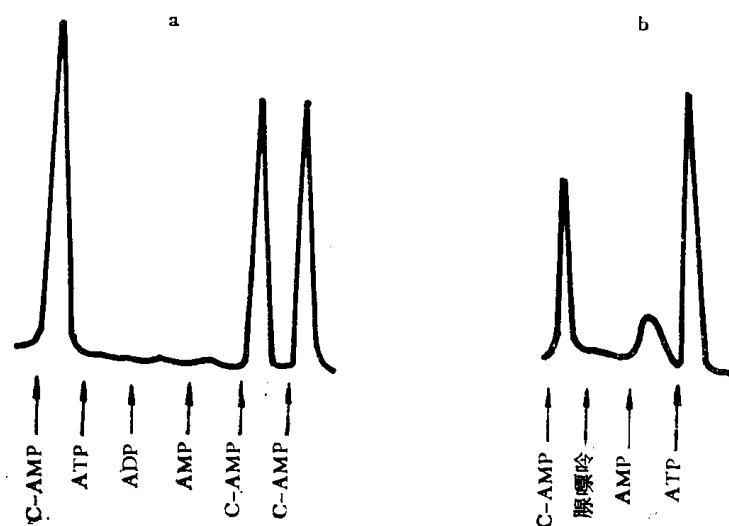


图 1 (a) cAMP 和腺核苷酸在中性氧化铝柱的层析行为
50 mM Tris-HCl pH7.5 缓冲液洗脱, 260m μ 波长测定吸收峰。
(b) cAMP 和腺核苷酸在 Dowex-50w $\times$ 8 柱的层析行为
重蒸水 (调 pH 7.6) 洗脱, 260m μ 波长测定吸收峰。

种降解产物的放射性污染极小,测定值可以代表 ^3H -cAMP 的放射活性,因此得到较满意的结果。

(二) 大鼠肝粗膜腺苷酸环化酶活性的测定

1. 膜蛋白量与酶活性的关系。不同膜蛋白量的基础酶活性及用 NaF 和肾上腺素激活的腺苷酸环化酶的活性如图 2 所示。开始基础酶活性随膜蛋白量的增加而增加,当膜蛋白量增加到100微克时,腺苷酸环化酶的基础活性几乎达到最高值。以后再增加膜蛋白量,基础酶活性无明显增加。用 NaF 和肾上腺素激活的酶活性,与基础酶活性相似,在膜蛋白增加到 100 微克时亦达到最大值,分别为基础酶活性的 3 倍及 2 倍以上。所以在常规测定腺苷酸环化酶活性时,最适的膜蛋白量为 100 微克左右。

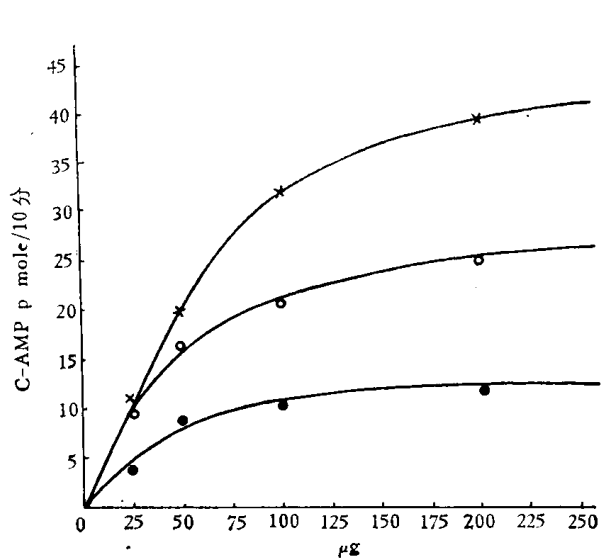


图 2 大鼠肝粗膜腺苷酸环化酶的基础活性 (C); 25 微克肾上腺素 (A) 和 12mM NaF (F) 激活的酶活性

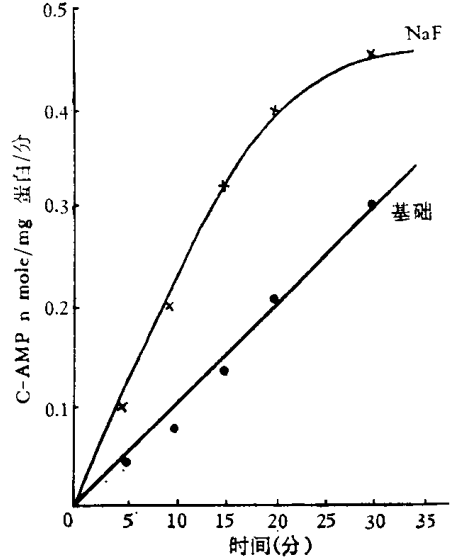


图 3 大鼠肝粗膜腺苷酸环化酶活性的时间曲线。12mM NaF 30°C 温育

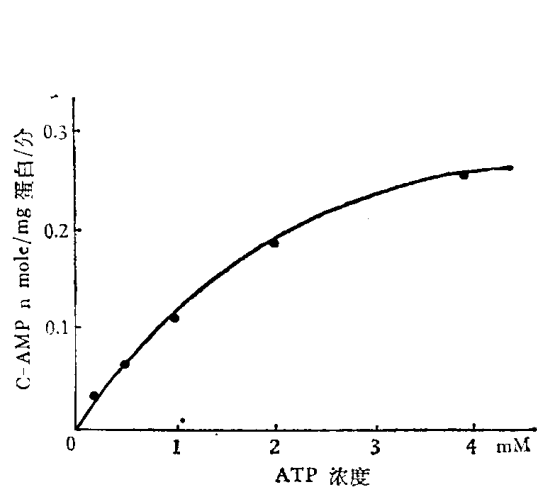


图 4 底物浓度对腺苷酸环化酶活性的关系

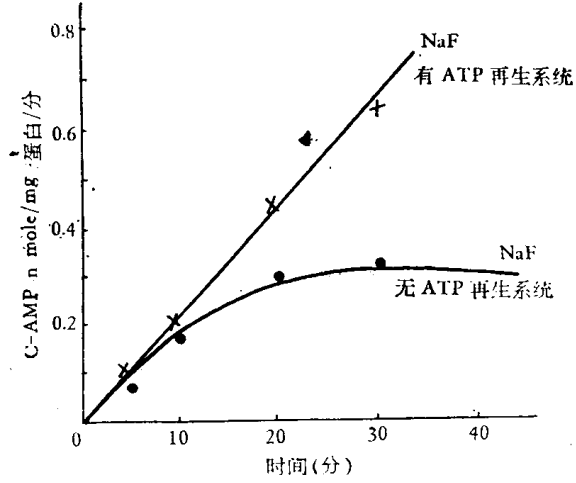


图 5 ATP 再生系统对 NaF 激活的腺苷酸环化酶活性的影响
ATP 再生系统含 3mM 磷酸肌酸, 0.4mg/ml 磷酸肌酸激酶, 12mM NaF。

2. 酶反应的时间曲线见图 3。基础酶活性在 30 分钟内成直线关系, 而 NaF 激活的酶活性在 15 分钟内成直线关系。因此, 常规测定腺苷酸环化酶活性时, 温育时间选择 10 分钟为宜。

3. 底物浓度对酶活性的影响。反应介质中存在过量 Mg^{++} 时, 酶活性与底物浓度的关系见图 4。底物浓度在 1 毫克分子 ATP 以内, 酶反应速度与底物浓度成正比关系。当底物浓度增加至 4 毫克分子 ATP 时, 酶反应速度达到饱和的最大值。

4. ATP 再生系统对酶活性的影响。在测定腺苷酸环化酶的样品中均含有大量的 ATP 降解酶, ATP 降解速度远远大于腺苷酸环化酶催化 ATP 转变为 cAMP 的速度, 为了保持 ATP 底物浓度的恒定, 在酶活性测定系统中需加入 ATP 再生系统。

比较有或无 ATP 再生系统存在时对 NaF 激活腺苷酸环化酶活性的影响, 如图 5 所示, 在有 ATP 再生系统中, NaF 对腺苷酸环化酶的激活在 30 分钟内仍为直线关系, 而在无 ATP 再生系统时, 20 分钟内为直线关系。因此反应时间较短时 (5—10 分钟), 反应速度不以底物 ATP 浓度变化而变化 (G. Schulty, 1974)。在常规测定时温育时间 10 分钟可不必加入 ATP 再生系统。

(三) 大鼠其他组织腺苷酸环化酶活性的测定

大鼠脑、心脏、卵巢及睾丸的腺苷酸环化酶活性测定结果见表 1。激素对各种组织的酶活性均有明显的激活作用。卵巢粗膜取自用 PMS 和 HCG 处理诱发排卵后第 5 天的黄体化卵巢, 这种卵巢粗膜的腺苷酸环化酶对 HCG 的刺激非常敏感。10 毫微克的 HCG 增加酶活性约 10 倍。睾丸粗膜取自未成年大鼠的睾丸, 它对 HCG 的刺激不十分敏感。

上述结果可以看出, 以 3H -ATP 为底物, 经离子交换树脂-中性氧化铝两步层析进行腺苷酸环化酶活性的测定可以获得较满意的结果。但由于 3H -ATP 的各种降解产物都带放射活性, 因此必须严格控制层析条件, 空白管的放射活性不能超过 0.1%, 否则影响测定结果。腺苷酸环化酶本身很不稳定, 粗膜制备以后应立即进行酶活性测定, 低温保存亦会影响重复性。

表 1 大鼠组织腺苷酸环化酶的测定

组 织	测定条件	cAMP p mole/mg 蛋白/10 分钟
肝 脏	基础酶活性	111.2
	肾上腺素 25 μ g	333.5
	NaF 12mM	352.6
心 脏	基础酶活性	378.2
	肾上腺素 25 μ g	527.5
	NaF 12mM	607.2
脑	基础酶活性	80.5
	肾上腺素 25 μ g	410.5
	NaF 12mM	540.0
卵 巢	基础酶活性	263.7
	HCG 10ng	2692.3
辜 丸	基础酶活性	280.8
	HCG 1ng	323.6

参 考 文 献

- Hamet, P. 1978 Characteristics of adenylate cyclase activity in pig coronary arteries. *J. Cyclic. Nucleo. Res.* **4** (2): 183—200.
- Soloman, Y. 1974 A highly sensitive adenylate cyclase assay. *Anal. Biochem.* **58** (2): 541—548.
- Rodbell, M. 1972 Determination of adenylate cyclase. In: *Methods in cyclic nucleotide research*, by Mark. Chasin, Marcel Dekker, INC, New York, pp. 101—111.
- White, A. A. and Zenser T. A. 1971 Separation of cyclic 3' 5'-nucleotide monophosphates from other nucleotide on aluminum oxide columns. *Anal. Biochem.* **41** (2): 372—396.
- Schulz, G., 1974 Adenylate cyclase. In: *Methods in Enzymology*, Vol. 38: Hormone action part C, Cyclic nucleotides, by Hardman, J. G., and B. W. O'malley, Academic Press, New York, pp. 115—125.

AN ASSAY OF HORMONAL SENSITIVE ADENYLATE CYCLASE

LIU ZHAN-HUAN SHANG XIN-QING LIU LAN-YING

(Department of Endocrinology, Institute of Zoology, Academia Sinica)

A two-step assay for adenylate cyclase is described utilizing ^3H -ATP as substrate and involving purification of the resulting ^3H -cAMP by sequential chromatography on Dowex 50 $\times$ 8 and neutral alumina. The ^3H -cAMP achieves complete separation from the radiochemical impurities which are responsible for the radioactivity in the blank. The method gives a low blank counts about 0.02% to 0.07% of substrate radioactivity, higher recoveries, and excellent reproducibility. Using the method we determined the adenylate cyclase activity of some tissues in the rat.

不同类型化合物对酯酶的抑制

周厚安* 郭尧君** 王思义*

酯酶在杀虫剂毒理方面的作用,许多农药毒理研究者都十分重视,因为在生物体内某些酯酶能催化有机磷、氨基甲酸酯化合物,使这些化合物被解毒。昆虫对杀虫剂的抗药性也与酯酶的活性有关。Aldridge 等(1972),江藤(1981),费施特和施密特(1977)等对这些问题都有过论述。研究酯酶与其对杀虫剂作用的关系,对探索化学结构与生物活性的规律,筛选新的药剂,阐明昆虫产生抗药性的原因都具有一定的意义。

本文是应用聚丙烯酰胺圆盘电泳和近几年发展的分辨率高的超薄层等电聚焦电泳的方法,研究不同类型化合物对酯酶的抑制作用。因为任何一种酶被抑制,都会导致代谢失常,严重的则引起死亡,这可为进一步了解不同类型杀虫剂的毒理机制和化学结构与生物活性的关系提供依据。

材料与方 法

(一) 试验材料

取本所饲养的小白鼠,体重 20 ± 1 克,断头放血,于冰浴剖腹,称 0.5 克肝,加入 5 毫升无离子水,用玻璃匀浆器研磨 1—2 分钟,4000 转/分离心 30 分钟,取上清液 1 毫升,再以 4 毫升无离子冰水稀释,作为两种电泳分析的酶源。

(二) 电泳

1. 聚丙烯酰胺圆盘电泳 分离胶聚丙烯酰胺浓度 7%, pH 8.9, 间隔胶浓度 2.5%, pH 6.7, 电解缓冲液: Tris-甘氨酸, pH 8.3, 每管加酶源样品量 50 微升,电泳电压为 220 伏,电流为 20 毫安,电泳时间为 2 小时。

2. 超薄层等电聚焦电泳 0.5 毫米的聚丙烯酰胺凝胶板是用 LKB 公司 2117-701 毛细管凝胶模具制作,凝胶浓度 $T = 5\%$, 交联度 $C = 3\%$, 载体两性电解质 (LKB-Ampholine 1809-126, pH 5—8) 在胶中浓度为 3%, 等电聚焦是用 LKB-2117 型多用电泳仪, 2209 恒温水浴, 2197 恒功率电源进行的。样品处理同 1 法, 加样品量 30 微升, 电泳参数为: pH 5—8, 冷却水温 10°C , 阳极电极液 0.5M 醋酸, 阴极是 0.5M 氢氧化钠, 上限功率电源、电压分别为 25 瓦, 50 毫安, 2,000 伏, 电泳 2 小时, 聚焦后立即用 Orion-201 型酸度计与 LKB-2117-111 表面电极测定胶面 pH 值, 绘成 pH 梯度线, 确定各酶

本文于 1983 年 8 月收到。

* 作者单位为中国科学院动物研究所; ** 作者单位为中国科学院生物物理研究所。

带等电点 PI 值。

3. 酯酶与底物反应和染色 电泳后, 取出胶柱(片)。根据酯酶可分解底物 α -醋酸萘酯形成萘酚与醋酸, 在萘酚结构中羟基邻近碳原子, 与偶氮染料结合形成有色的反应物, 沉积在非特异性酯酶的原理, 将胶柱(片)放入配有底物加染色剂的溶液内, 在 37℃ 恒温水浴中培养 10—30 分钟, 便显示出棕色酯酶带。另一部分放入含有 0.0001M 的各种化合物溶液内作用 30 分钟后, 其中三氯杀虫酯的浓度是 0.001M, 以蒸馏水漂洗数次, 再放入配有底物加染色剂的缓冲液内, 染色后的胶柱(片)用甲醇:醋酸:水 = 1:1:10 固定保存。

底物 α -醋酸萘酯与 β -醋酸萘酯各 50 毫克溶于 2 毫升丙酮内。

染色剂 Fast Blue RR 100 毫克溶于 0.1M, pH 6.7 的 100 毫升磷酸缓冲液内。

抑制剂(不同类型化合物)见表 1。

表 1 不同类型化合物

化合物名称	化 学 结 构 名 称	性 状	提供单位
敌敌畏	0,0-二甲基-O-(2, 2-二氯乙烯基)磷酸酯	无色液体	北京农药二厂
敌百虫	0,0-二甲基-(2, 2, 2-三氯-1-羟基-乙基)磷酸酯	白色结晶	市购(上海农药厂)
对硫磷	0,0-二乙基-O-(对-硝基苯基)-硫代磷酸酯	淡黄色液体	西德拜耳公司
西维因	N-甲基-1-萘基氨基甲酸酯	白色粉状	本所药剂毒理室合成
毒扁豆碱	毒扁豆素	白色粉状	进口分装
辛硫磷	0,0-二苯基氧基甲酯肟-二乙基硫代磷酸酯	浅黄色液体	本所药剂毒理室合成
马拉硫磷	0,0-二甲基-S-(1, 2-二乙氧基乙基)二硫代磷酸酯	无色液体	宁波农药厂
残杀威	2-异丙氧苯基-N-甲基氨基甲酸酯	白色结晶	日本住友公司
三氯杀虫酯	2, 2, 2-三氯-1-(3, 4-二氯苯基)乙醇乙酸酯	白色粉状	本所药剂毒理室合成

结 果 与 讨 论

以不同类型化合物作抑制剂, 它们对酯酶同功酶的抑制, 或酯酶对其反应, 有明显差异。根据这几种化合物对酯酶的抑制程度拟分五个等级:

- 1) + + + + 正常对照, 酶带清晰
- 2) + + + 轻微被抑制, 少数酶带消失
- 3) + + 显著被抑制, 一半酶带消失
- 4) + 严重被抑制, 酶带模糊, 大部消失
- 5) - 全部被抑制, 酶带消失

(一) 聚丙烯酰胺圆盘电泳

从图 1 所示, 用聚丙烯酰胺圆盘电泳分析鼠肝的酯酶共有 11 条区带, 经 0.001—0.0001M 的不同类型化合物作用后结果见表 2。其中以敌敌畏对所有的酯酶带有强烈的抑制作用, 属第 5 级。其次是辛硫磷, 除 Esterases 2, 5, 7, 稍有模糊痕迹外, 大部分酯酶皆被抑制, 敌百虫的抑制作用也仅次于敌敌畏, 对硫磷的抑制比较显著, 而西维因、毒扁豆碱则处于轻度的抑制水平。马拉硫磷、残杀威、三氯杀虫酯对酯酶无任何抑制作用, 所显