

面提出了进一步疑问,并提出了以钡代替铅做为底物的改良方法;但采用这种方法在电镜下未能看到在分离的大鼠胰腺细胞中有足够电子密度的沉淀物。Peterson等^[7]使用钡离子(钡盐)做为沉淀剂,在精子中观察到类似于铅法所形成的酶反应。Slezak等^[8-11]在哺乳类一些组织细胞上仍采用铅盐法显示腺苷环化酶的定位。Kvinnsland^[12]基于对小鼠阴道上皮腺苷环化酶的研究结果,认为采用中等浓度(2mM)的硝酸铅、在30℃温育,以及孵育液pH为7.2可减少非特异性沉淀的形成。Cutler^[13]对一些组织的腺苷环化酶进行了生化和细胞化学分析,提出了毫克分子浓度的硝酸铅并不能完全抑制腺苷环化酶的活性;铅未引起AMP-PNP的非酶水解;并强调了商品购得的AMP-PNP需提纯使用。

此外,Rechardt和Hervenen^[14,15]曾提出了以ATP为底物、用钙—钴方法进行的几种组织中腺苷环化酶的电镜细胞化学研究。但这个方法也存在着缺乏特异性的问题,因而没有被更多的工作者所采用。

二、显示腺苷环化酶的细胞化学定位方法

1. 固 定

在固定剂的选择上,要求既能较好地保存细胞的形态结构,又要尽可能多地保存酶的活性。由于戊二醛(做最初固定剂)进入组织以及在组织内的穿透速度较慢,采用短时间血管灌注法(perfusion)来进行固定可获得较好的效果。浸渍法(immersion)仍被广泛地使用,但目前多结合使用灌注法与浸渍法。Slezak等^[8]提出以2%戊二醛和5%二甲亚砜(DMSO)的混合液进行组织固定,能更好地保存腺苷环化酶活性及细胞的超微结构。多数作者采用戊二醛的浓度为0.5~2%;固定时间为5分钟—2小时。一些作者采用短时间的固定(5~15分钟)或先将组织用孵育液温育、再经短时间固定的方法,以便尽可能多地保存酶活性。固定

一般在4℃或室温下进行。

不同组织细胞对固定液的敏感性不同。各种固定液的浓度、固定方式以及固定时的温度等,也都对酶活性的保存产生不同的影响。文献报道的各种组织细胞经戊二醛固定后,可保存相当于新鲜组织中腺苷环化酶活性的10—50%(个别报道,酶活性甚至完全被抑制)。Kempen等^[6]用0.5%甲醛(多聚甲醛制备的)固定组织,保留了大约70%的基础酶活性,而戊二醛固定剂仅保存了10%。因此,采用适宜的固定剂及固定条件,是应进一步探索的问题。

2. 孵 育 液

(一) 底 物

使用ATP做为显示腺苷环化酶的底物缺乏特异性,这是由于ATP可以被多种磷酸水解酶和焦磷酸水解酶(特别是ATP酶)所裂解,致使反应结果错综复杂。所以大多数作者使用ATP为底物时都配合使用氟化钠(NaF)。已知裂解ATP的酶中,只有腺苷环化酶能被NaF所激活;而NaF又是ATP酶及其他一些磷酸水解酶的抑制剂。Åbro^[16]强调在以ATP为底物时,要联合使用磷酸酶的抑制剂——NaF及乌本甙(Onabin);在钙—钴方法中也要使用碱性磷酸酶的抑制剂,并注意控制温育的时间与温度。这样做基本上可以排除有关酶的干扰。

由于ATP的缺乏特异性的缺点,自从提出AMP-PNP*为腺苷环化酶的特异性底物后,已有较多的工作者采用。然而除腺苷环化酶能裂解AMP-PNP外,尚有一种焦磷酸酶能水解AMP-PNP,但是Kvinnsland^[11]及Cutler^[12]认为,由于这种酶具有较高的最适pH值(8.5—10.0),与腺苷环化酶的最适pH值不同,再加上使用腺苷环化酶的激活剂等,因而水解AMP-PNP的主要应为腺苷酸环化酶,这样AMP-PNP就可认为是腺苷环化酶的特异性底物了。可是由于腺苷环化酶分解AMP-

* 目前用于细胞化学研究的AMP-PNP有钠盐和锂盐两种产品。

PNP所形成的cAMP,可以被cAMP磷酸二酯酶降解为5'-AMP,而5'-AMP又是5-核苷酸酶的底物,由此降解成腺苷和无机磷酸盐(Pi)。为了有效而又完全地抑制从cAMP转变到5'-AMP的过程,在孵育液中就必须有足够量的cAMP磷酸二酯酶的抑制剂(如茶碱、氨茶碱、甲基黄嘌呤、DDT及MIX)。一般常用的是茶碱。

值得注意的是,有些作者认为,商品出售的AMP-PNP常是不纯的,其所含的杂质(AMP、PNP等)可导致非特异的,或非酶性沉淀的产生。Clark^[16]分析过ICN及Boehringer Mannheim的产品,其杂质高于厂商标出的指标,而纯度又低于指标。因此,在使用前必需加以纯化。

(二) 孵育液配方

铅法 Reik等^[1]的基础液: Tris-Maleate缓冲液(pH7.4) 80mM, 葡萄糖8%, 茶碱2mM, 硫酸镁4mM, ATP 0.5mM, 硝酸铅4.8mM。

Howell和Whitfield^[2]的基础液: Tris-Maleate缓冲液(pH7.4) 80mM, 葡萄糖8%, 茶碱2mM, 硫酸镁2mM, ATP或AMP-PNP 0.5mM, 硝酸铅4mM。

钙-钴法^[13,14] Tricine缓冲液(pH8.2-8.3)50mM, 氯化镁3mM, 氯化钙18mM, 硝酸铅3mM, ATP(钠盐)3mM, 茶碱10mM, 乌本甙1mM, 四氧嘧啶5mM。

钡盐法^[9] Tris-HCl缓冲液80mM, 茶碱10mM, 氯化镁5mM, 蔗糖200mM, 氯化钡4mM, AMP-PNP 0.5mM, 最终pH8.9。

(三) 温育条件

温育液 pH 铅法多为7.2-7.5, 也有使用8.5-8.9; 钙-钴法为8.3; 钡盐法为8.9。

温育温度 多为30℃, 也有采用室温或37℃。

温育时间 5分钟到1小时。腺苷环化酶水解AMP-PNP的速率比ATP慢。因而在实际操作中要根据组织的特性来考虑孵育液适

宜的pH、温育温度及时间。

3. 激活剂及抑制剂

已知腺苷环化酶是唯一可被NaF激活的酶。NaF能刺激各种组织中的腺苷环化酶,但其作用程度则因组织细胞类型而异。Drummond和Duncan表明只有F⁻是激活作用的有效离子。细胞化学方法中使用的浓度多为10-20mM。Cheng^[17]认为高于20mM可增加酶的活性,而Slezak^[8]使用大于20mM浓度NaF,并未看到酶活性增加。目前已知特异性的激素能够激活各种动物组织中的腺苷环化酶的活性。但一般说来,NaF通常要比激素激活的酶活性更大些,而且腺苷环化酶对激素的反应应具有更不稳定的性质^[18]。

Cohn和Bitensky^[4]表明,Alloxan能选择性地抑制腺苷环化酶活性。其他一些作者也证明了Alloxan的抑制作用。因而可用Alloxan来检验反应产物特异性。但是Lemay及Jarett^[5]在生物化学研究方面的结果表明:Alloxan之所以减少了反应沉淀物,是由于它阻止了大部分的AMP-PNP被铅的非酶水解。

4. 对照实验

显示腺苷环化酶活性的研究中,除使用特异性激活剂或抑制剂以外,尚需进行以下对照实验:

① 在准确一致的实验条件下,进行孵育液内不加底物的对照实验。

② 在温育之前用高温(70-100℃)处理组织,使酶变性,再置于完全孵育液中温育。

三、关于铅盐法显示腺苷环化酶的有效性的争论

对显示腺苷环化酶的铅法有效性持有异议的意见中,主要集中在下列两个问题。

关于铅对底物的非酶水解问题:Reik^[1]承认在孵育液中存在从ATP→cAMP的非酶性的转变,但他认为这种转变可能是非专一地普遍产生的,因此反应产物不会在组织的任何位置上有意义的集中。Howell^[2]提出他没有

观察到铅离子与底物 AMP-PNP 相互作用的证据。Revis^[10]指出,短时间(5分钟)的温育可以阻止孵育液内 AMP-PNP 的非酶水解。Å bro^[15]认为采用低浓度的底物和硝酸铅以及低的温育温度,可以避免底物的非酶性水解。Cheng^[17]的实验表明,在 1 及 2mM 的铅浓度条件下,没有观察到由铅所引起的 AMP-PNP 非酶水解现象;对不含有组织的孵育液做生化测定,其结果仅检查出孵育液中有少量 cAMP 或没检出 cAMP。而 Lemay^[5]认为 2mM 的铅浓度引起了 AMP-PNP 的非酶水解,产生了少量 cAMP 及相当量的 AMP;他还认为铅引起的非酶水解作用不受 NaF 影响,但是能被 Alloxan 所抑制。Kempen^[6]的实验证明,孵育液中所产生的 cAMP 是由于非酶机制所致,极少是由酶性形成的。最近 Cutler^[12]明确提出,铅并不会引起底物的非酶水解;他认为,未提纯底物中的杂质,能和铅起作用,从而导致了一些作者的错误判断。

关于铅对酶活性的抑制问题:铅能抑制酶活性的事实已被肯定。Lemay^[5]的实验表明,铅是腺苷环化酶的强抑制剂;在 1mM 浓度下,完全抑制了脂肪细胞膜上酶的活性;当降低到 0.2mM 时,能抑制酶活性的 50%;再低的铅浓度则不能产生可看到的沉淀物。Kempen^[6]指出硝酸铅可完全抑制腺苷环化酶对 AMP-PNP 的分解作用。Cheng^[17]表明:铅在 1mM 的情况下能保存着 80% 的酶活性,而在 2mM 时仅保留 25% 的酶活性。Cutler^[12]认为毫克分子浓度的铅并不能完全抑制腺苷环化酶的活性。上述实验结果的差异,究竟是由于组织类别的不同,还是由于铅对不同组织中的已固定和未固定细胞的腺苷环化酶的作用有所不同,或是由于底物的不同纯度及不同保存方法等因素所致,还需要进一步研究来加以解决。

除了上述争论问题之外,大多数作者在不加底物的实验中,均未见到反应产物,但 Kempen^[6]在缺少底物的实验中观察到了非特异性染色,而在加入底物之后也未见到沉淀物增多

现象。我们在大鼠颌下腺、肾及肝的腺苷环化酶的细胞化学实验中发现,不论在含有和不含底物的孵育液内温育过的组织,均显示出反应产物沉淀^[18]。

综上所述,通过多数作者的不断地实验和讨论,目前对显示腺苷环化酶的方法(铅法)所存在的缺点,已有相当的改进,例如,为了减少对酶活性的抑制,采用很低浓度的铅(0.75 mM)也看到了酶活性的反应产物^[9]。但还需进行更多方面的实验加以证实。同时 Kempen 等^[6,18]在不加底物 AMP-PNP 的实验中观察到组织内有反应物的沉淀,这是一个很值得注意的问题。按理说,在不加 AMP-PNP 底物情况下,组织内不应出现反应沉淀,如果有沉淀颗粒的话,应与腺苷环化酶无关,但由于组织内或组织周围所存在的内源性底物或其他原因,也有可能引起铅沉淀物的出现。在大鼠胰脏^[6]以及颌下腺、肾、肝组织中^[18]所观察到的现象,是否也存在于其他组织中,也需要进行工作。此外,排除由于底物(商品出售)不纯所产生的干扰,也是腺苷环化酶的细胞化学技术中值得注意的问题。

参 考 文 献

- [1] Reik L. 1970. *Science*, 168: 382.
- [2] Howell S. L. and Whitfield M. 1972. *J. Histochem. Cytochem*, 20: 873.
- [3] Wagner R. C. et al. 1972. *Proc. Nat. Acad. Sci, USA*, 69: 3175.
- [4] Cohen K. L. and Bitensky M. W. 1969. *J. Pharmacol. Exp. Ther*, 169: 80.
- [5] Lemay A. and Jarett L. 1975. *J. cell Biol*, 65: 39.
- [6] Kempen H. J. M. et al. 1978. *J. Histochem. Cytochem*, 26: 298.
- [7] Peterson R. N. et al. 1980. *J. cell Sci*, 43: 93.
- [8] Slezak J. and Geller S. A., 1979. *J. Histochem. Cytochem*, 27: 774.
- [9] Greene R. M. and Pratt R. M., 1979. *J. Histochem. Cytochem*, 27: 924.
- [10] Revis N. W., 1979. *J. Histochem. Cytochem*, 27: 1322.

(下转第 32 页)