

•文献综述•

[文章编号] 1007-3949(2000)-01-0082-02

钙调神经磷酸酶活性测定

符民桂, 唐朝枢

(北京医科大学第一医院心血管研究所, 北京 100034)

[主题词] 钙调神经磷酸酶; 活性; 钙离子; 钙调素

[摘要] 钙调神经磷酸酶是一种钙离子敏感的蛋白磷酸酶, 广泛分布于包括心脏在内的全身组织中, 参与多种生物功能的调节。本文对四种钙调神经磷酸酶活性测定法的原理、操作要点及其特点进行简要综述。

[中图分类号] Q55

[文献标识码] A

钙调神经磷酸酶(calcineurin, CaN)属丝/苏氨酸蛋白磷酸酶家族成员(又称蛋白磷酸酶 2B, PP2B), 是迄今发现的唯一受 Ca^{2+} / 钙调素(CaM)调节的丝/苏氨酸蛋白磷酸酶。1979 年最先从脑组织中发现, 目前认为 CaN 广泛分布于全身组织, 参与多种细胞功能的调节^[1]。CaN 在细胞因子介导的 T 细胞活化中起到调节枢纽的作用^[2], 在神经递质的释放、突触可塑性方面亦具有重要的调节作用^[3]。新近的研究表明, CaN 介导的信号通路在心肌肥大的发生发展中可能起到中心作用^[4,5], 因此 CaN 的研究受到基础及临床科学家的广泛关注。本文对 CaN 活性测定法进行简要综述。

1 发色底物法

根据 Pallen 等^[6]方法进行改良。该法的原理基于两点:

CaN 在体外能水解对硝基磷酸酚小分子底物, 水解下的对硝基酚可直接生色; ④CaN 是体内唯一受 Ca^{2+} / CaM 活化的磷酸酶, Ca^{2+} 和 CaM 存在时与不存在时的磷酸酶活力之差代表 CaN 活力。

测定方法: 总反应体积为 400 μL , 由 20 μL 待测提取液和 380 μL 底物 I 液或 II 液组成。底物 I 液含 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4)、0.5 mmol/L DDT、0.2 g/L BSA、10 mmol/L PNPP、2 mmol/L CaCl_2 及 0.3 $\mu\text{mol/L}$ CaM。底物 II 液含 3 mmol/L EGTA, 不含 CaCl_2 和 CaM 外, 其余成分同底物 I 液。测定时取待测提取液 20 μL 与底物液 380 μL , 30 $^{\circ}\text{C}$ 保温 30 min, 立即加入 13% K_2HPO_4 50 μL 终止反应, 在分光光度计上 410 nm 读取吸光度, 以空白底物液调零, 每样本的底物 I 液测出的为 CaN 和其它磷酸酶的总活力; 底物 II 液测出的仅是其它磷酸酶活力, 二者之差即 CaN 活力。应用标准 CaN (0.5~5 ku/L) 作标准曲线, 同时用考马斯亮兰法对样本进行蛋白定量, 结果以比活力(ku/g·protein)表示。

该法简便而且较稳定, 可重复性强。但实验测得的是 CaN 对磷酸酪氨酸小分子底物的水解活力, 只能间接反映其

在体内对丝/苏氨酸蛋白底物的活力。另外, 该法特异性较差。

2 放射性同位素法

参考文献[7]方法进行, 该法的原理基于两点: cAMP 依赖的蛋白激酶调节亚单位(RII)是 CaN 的一种较专一的底物, 且受其它蛋白磷酸酶(磷酸酶 1 和磷酸酶 2A)的影响较少。应用同位素 ^{32}P 标记 RII 亚单位, 根据释放的 ^{32}P 的多少测定样本中 CaN 活力; ④CaN 是目前已知的唯一对 Ca^{2+} 依赖、对 Okadaic acid(磷酸酶 1 和磷酸酶 2A 特异抑制剂)不敏感的磷酸酶, 加入 Ca^{2+} 和 Okadaic acid 后可进一步提高该法的特异性。

测定方法: 底物肽的序列是与 cAMP 依赖的蛋白激酶调节亚单位(RII)相应的一段序列, 由 Asp-Leu-Asp-Val-Pro-Ile-Pro-Gly-Arg-Phe-Asp-Arg-Arg-Val-Ser-Val-Ala-Ala-Glu 组成。可应用蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 和 [γ - ^{32}P]ATP 对底物肽进行标记, 制备成 ^{32}P 标记的底物肽。测定时取 20 μL 待测提取液与 40 μL 测定缓冲液[含 20 mmol/L Tris (pH 8.0)、100 mmol/L NaCl、6 mmol/L MgCl_2 、0.5 mmol/L DDT、0.1 g/L BSA、0.1 mmol/L CaCl_2 、5 $\mu\text{mol/L}$ ^{32}P 标记的底物肽和 500 mmol/L Okadaic acid]混合, 30 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min, 加入 100 mmol/L (pH 7.0) 磷酸钾缓冲液(含 5% 三氯乙酸)0.5 mL 终止反应。游离的无机磷经 Dowex 阳离子交换层析柱分离, 液闪计数。所测值减去不含酶的空白测定值为实测值。

本法敏感性高, 特异性强, 是目前最常用的方法。但步骤较复杂, 底物肽需特约合成, 没有商品试剂供应。

3 高效液相色谱法

参考文献[8]方法进行, 该法的原理是: 磷酸化和去磷酸化的底物肽在高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)上的层析行为不同。因此可借助 HPLC 分别对磷酸化和去磷酸化的底物肽进行定量, 以测定 CaN 活力。

所用底物肽同前, 但直接用 ATP 和蛋白激酶使底物肽磷酸化, 反应在 150 μL 反应液[含 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.0)、0.1 mmol/L EGTA、0.5 mmol/L DDT、0.01% Brij、0.3 g/L

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(39730220)

[作者简介] 符民桂, 男, 35 岁, 博士研究生。主要研究方向为“心血管细胞增殖的信号传递机制”。

BSA、0.1 μmol/L CaM、1 mmol/L MnCl₂ 及 1 mmol/L CaCl₂] 中进行,反应混合物在 30℃预育 15 min,加入底物(5~ 200 μmol/L),在不同时间(2、4、6、10 min)取出 20 μL 反应液,并加 0.5% 高氯酸 70 μL(含 0.1% Triton X-100 和 10 mmol/L 羧苯磺胺),取上清 40 μL 上 HPLC 柱,酶活性可根据最初 6 min 的产物线性图求出。

该法具有与放射性同位素法同样的敏感性,非放射性标记的底物肽更稳定,更易于储存,适于大规模筛选性实验和酶促动力学的检测。

4 其它

Martin 等^[9]直接应用从 Promaga 公司获得的磷酸酶测定试剂盒,通过监测无机磷从磷酸化的底物肽中释放的量来测定 CaN 活性。无机磷应用一种 malachite green dye 方法来检测。所使用的底物肽为 Arg-Arg-Ala-Thr(P)-Val-Ala。反应在 Spectramax 250 微孔板中进行,总反应体积为 50 μL。反应液含 25 mmol/L MOPS(pH 7.0)、1.0 mmol/L MnCl₂、20 mg/L CaM、20 mg/L CaN 及 1.0 mmol/L 底物肽。30℃反应 15 min,加入 50 μL dye reagent,孵育 10 min,在 630 nm 测定吸光度。但此法只能在纯化体系中进行,不能检测样品粗提液中的酶活性。

参考文献

- [1] Cuerini D. Calcineurin: not just a simple protein phosphatase [J]. *Biochem Biophys Res Commun/Lett*, 1997, **235**: 271- 275

- [2] Klee CB, Ren H, Wang X. Regulation of the calmodulin- stimulated protein phosphatase, calcineurin [J]. *J Biol Chem*, 1998, **273**: 13 367- 370
- [3] Yakel JL. Calcineurin regulation of synaptic function: from ion channels to transmitter release and gene transcription [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 1997, **18**: 124- 133
- [4] Molken JD, Lu JR, Antos CL, et al. A calcineurin dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy [J]. *Cell*, 1998, **93**: 215- 228
- [5] Olson EN, Molken ID. Prevention of cardiac hypertrophy by calcineurin inhibition: hope or hype[J]? *Circ Res*, 1999, **84**: 623- 632
- [6] Pallen CJ, Wang JH. Calmodulin- stimulated dephosphorylation of p-Nitrophenyl phosphate and free phosphotyrosine by calcineurin [J]. *J Biol Chem*, 1983, **258**: 8 550- 553
- [7] Fruman DA, Klee CB, Bierer BE, et al. Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK506 and cyclosporin A [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1992, **89**: 3 686- 690
- [8] Enz A, Shapiro G, Chappuis A, et al. Nonradioactive assay for protein phosphatase 2B (calcineurin) activity using a partial sequence of the subunit of cAMP- dependent protein kinase as substrate [J]. *Anal Biochem*, 1994, **216**: 147- 153
- [9] Martin BL. Inhibition of calcineurin by the tyrphostin class of tyrosine kinase inhibitors [J]. *Biochem Pharmacol*, 1998, **56**: 483- 488

(此文 1999- 07- 23 收到, 2000- 02- 15 修回)

(此文编辑 文玉珊)