维普资讯 http://www.cqvip.com

三种GABA-T测定方法的比较

生化教研室：李 倩 王征泰 何通川 蒋晓秋

γ-氨基丁酸（GABA）是体内主要的抑制性神经递质。它在脑内的含量高，分布广。它还与一些疾病如Huntington's病，癫痫等发病有关。由于GABA转氨酶(GABA-T，EC2.6.1.19）是GABA分解代谢的限速酶，故在GABA代谢及与行为关系的研究中常常涉及GABA-T的活性测定。例如在肝性脑病发病机制研究中，为研究GABA-T抑制物的作用，GABA-T的测定是必需的手段。近年来报道的GABA-T测定方法有^{14}C-GABA法(^{14}C-标记法)、3.5-二氨基苯甲酸荧光分光光度法（DAB法)及GABA-T与琥珀酸半醛脱氢酶偶联法（偶联法）等。它们的实验原理和条件各不相同，各有其优缺点及实验条件要求。在我们的工作中，常受到试剂供应与仪器条件限制，需多种GABA-T测定法互相补充参比。另一方面，不同文献中所用方法不同，为比较各文献材料，也需要比较各GABA-T测定方法，而至今未见这方面的报导。为此，我们比较了^{14}C-标记法，DAB法及偶联法的灵敏度，重复性，可测范围等方法学评价指标，并用三种方法测定了小鼠脑GABA-T活性及加热肝匀浆上清液对脑GABA-T的抑制作用。用^{14}C-标记法及DAB法测定了小鼠肝及肾GABA-T的活性。为今后分离，纯化上述抑制物作好准备。

材料与方法

雄性小鼠，体重25—30g，断头处死，迅速取出脑、肝和肾，制备成1/10脑匀浆，1/5肝与肾匀浆，15,000×g，4℃离心30min，取上清液于−30℃贮存备用[2]，用时稀释。

取上述肝匀浆上清液（LHS）于55℃水浴中加热20min，冷却至室温后，4,500RPM室温离心20min，取上清液即加热的肝匀浆上清液(HLHS)。

GABA-T测定：(1) ^{14}C-标记法[1,2]，其反应液通过国产732阳离子交换树脂层析柱(3×0.5cm，树脂颗粒为100—200目)。(2)DAB法，采用WLöscher(1980年)的方法并加以改进[3]。其0.2mole/L 3,5-二氨基苯甲酸溶于3.7%K_2CO_3溶液中(pH 6，新鲜配制)，用岛津RF-510荧光分光光度计，以激发光405nm，发射光505nm测定荧光强度(F)，以F/h/mg组织匀浆上清液蛋白质表示酶的比活性。(3)偶联法，采用改良的Th. de. Boer等人的方法[4,5]。

用考马斯亮兰法[6]测定匀浆上清液的蛋白质浓度。

结果与讨论

1. 方法学比较：

按以上^{14}C-标记法、DAB法及偶联法所测脑组织匀浆上清液（BAS）量与酶活性关系如图1所示。

表1显示了三种方法的最小可检出量，可测范围及重复性。实验结果表明，三种GABA-T测定方法的最小可检测量均在微克BHS蛋白质水平，此灵敏度足以用于小动物组织GABA-T测定。同时，三种方法都有良好的酶量与反应速度的线性关系，但^{14}C标记法测定的线性范围较窄，这可能由于反

维普资讯 http://www.cqvip.com

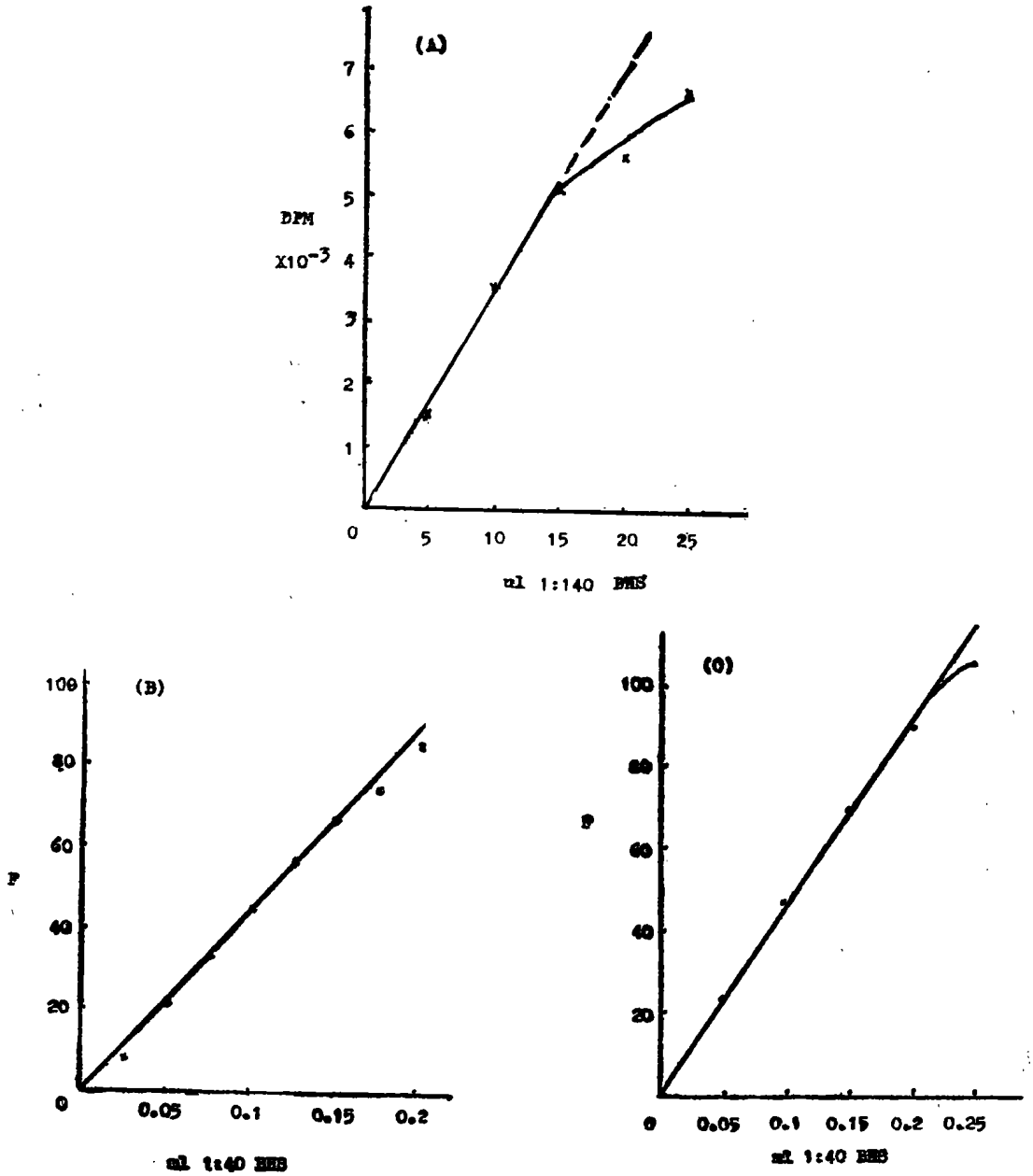


图1　三种方法所测BHS量与酶活性关系

A：^{14}C-标记法　　B：DAB法　　C：偶联法

表1　　三种GABA-T测定方法的方法学数据

	^{14}C标记法	DAB法	偶联法
最小可检测量 (μgBHS蛋白质/管，S/N≥2)	2	5	10
可测范围（μgBHS蛋白质/管）	0—10	50—400	0—400
$\bar{X}$±S．D	4,403±224	68.3±1.04	64.4±2.4
(n)	(10)	(10)	(8)
C．V%	5.1	1.5	3.7

维普资讯 http://www.cqvip.com

应体系中底物浓度较低（低于Km值）所致。我们增加体系中α-酮戊二酸浓度至2mmole/L，线性范围增加至0—20μg BHS蛋白质。另外，DAB法在酶活性较低（<50μg BHS蛋白质/管）时测得的F值偏低。其原因可能是琥珀酸半醛在pH8.4溶液中不太稳定。DAB法和偶联法需要琥珀酸半醛作为标准，但后者极不稳定，不符合作为标准物的要求，故酶活性不能以活性单位表示。

三种方法批内重复性的变异系数均在允许范围内。实验中发现，在DAB法中，pH值对3.5-二氨基苯甲酸与半醛缩合所产生的荧光强度有很大影响。DAB溶液偏酸荧光较强，反之，荧光减弱。当DAB溶液pH大于7时，几乎无荧光产生；溶液pH为4时，荧光强度约为pH 6时的10倍。因此，维持DAB试剂pH恒定是十分重要的，而按照原方法用K_2CO_3调节pH很难避免这一干扰因素。为此，我们改用3.7% K_2CO_3溶液配制DAB溶液，使每次配制溶液pH较相近。

2. 酶活性测定：

以三种方法测定了小鼠脑、肝、肾匀浆上清液（BHS、LHS及KHS）的GABA-T活性。结果如表2。

两两比较三种方法所得结果，三种方法对BHS的GABA-T活性测定相互之间的相关系数均大于0.9；^{14}C标记法与DAB法对LHS GABA-T活性测定的相关系数为0.855；对KHS GABA-T的相关系数为0.773。经两因数线性回归系数方差检验P均小于0.05。

可见三种方法对酶活性的测定有较好的一致性。^{14}C标记法和DAB法不仅能测定脑匀浆上清液中GABA-T活性，也能较一致地表示肝和肾匀浆上清液中GABA-T活性。偶联法能较满意地用于脑GABA-T测定，由于肝、肾中琥珀酸半醛脱氢酶活性较低，如不外加此酶，则偶联法不能测定肝、肾GABA-T活性。

三、HLHS对三种方法所测BHS GABA-T活性的抑制作用

已有实验证明，肝匀浆中有抑制脑GABA-T的物质[5]。该物质在55℃加热20min仍能保持抑制活性。在分离、提纯这种抑制剂的研究中，GABA-T测定是必需的检测手段。用三种方法观察HLHS对BHS中GABA-T的抑制作用（图2）。可见三种方法都可观察到这种抑制剂的作用，但其灵敏度

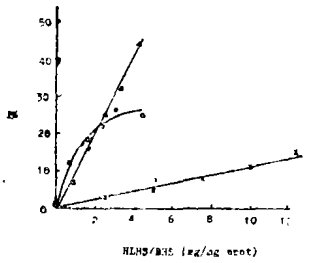


图2 三种方法测定中HLHS对BHS GABA-T的抑制作用

注：1.在一定量*BHS中加入不同量HLHS，按上述方法测定GABA-T，并计算抑制百分率(I%)

2.*：^{14}C标记法(—o—)，DABA法(—×—)和偶联法(—▲—)中BHS蛋白质浓度各为5.7μg，0.1mg和0.2mg/管

不同，其中以偶联法最高，^{14}C标记法次之，而DAB法灵敏度最低。其原因可能是抑制剂除抑制GABA-T外对琥珀酸半醛脱氢酶

表2 三种方法测定脑、肝、肾匀浆上清液GABA-T的活性(n=8)

	^{14}C标记法 (nmole/h/mg Prot)	DAB法 (F/h/mg Prot)	偶联法 (F/h/mg Prot)
BHS	306.2±33.8	204.7±24.9	181.4±32.9
LHS	27.1±3.6	14.4±2.2	—
KHS	32.5±5.7	14.3±3.08	—

维普资讯 http://www.cqvip.com

也有抑制作用，因此，用偶联法测定时1%最大。另一方面，抑制物的抑制活性可能受pH或一些离子的影响。而三种方法酶促反应条件不同，如DAB法反应在pH8.4硼酸缓冲液中进行，而^{14}C标记法反应在pH8.0磷酸盐缓冲液中进行。这可能是DAB法测定中抑制剂活性大大小于其他两法的原因。由此可见，GABA-T抑制物分离纯化过程中，以^{14}C标记法进行测定最为恰当，它最能表示出抑制物对GABA-T的抑制作用。此结果可解释文献中不同的数据材料[2,5]。

总结三种方法可见：(1)，^{14}C标记法是最直接、最简便，干扰因素最少的方法，但由于^{14}C-GABA国内尚无生产，加之测定需要液体闪烁技术，故往往受到条件限制；(2)，DAB法较可靠，受生物样品中其他因素影响较小，主要问题是琥珀酸半醛不太稳定。另外，3.5-二氨基苯甲酸需要国外进口，也给实验造成不便；(3)，偶联法是一间接测定GABA-T活性的方法，必需满足的前提是琥珀酸半醛脱氢酶活性大大高于GABA-T。因此，它仅适于脑GABA-T测定，对于琥珀酸半醛脱氢酶含量低的周围组织，此法不适用。此法受生物样品中其他因素影响较大，测定空白较高。但此方法所需试剂及实验条件简单，较易开展。另外，DAB法和偶联法均需琥珀酸半醛作标准，而后者极不稳定，故只能用F值进行酶活性的相对比较。

尽管以上三种方法原理、实验条件不同，各有其优缺点，但从我们的实验可见，三种方法能较一致地反映GABA-T的活性。因此，我们可以根据条件选择适当方法用于GABA-T测定及其抑制物的研究。

参考文献

[1] White HL, et al. J Neurochem 1978; 31:41

[2] 蒋晓秋，等. 重庆医科大学学报 1989; 14:275

[3] Löscher W. J Neurochem 1980; 34:1603

[4] Boer Th De, et al. J Neurochem 1977; 28:471

[5] 何通川，等. 重庆医科大学学报 1989; 14:176

[6] Bradford MM. Anal Biochem 1076; 72:248

简讯

第六届全国高等医学检验专业校际会议在大连医学院举行

全国第六届医学院检验专业校际会议于1989年10月25日至28日在大连医学院学术馆举行，大连医学院赵宝昌副院长主持了10月25日的开幕式，康格非理事长作了会议议题的报告，大会收到了教委王镭司长、卫生部周动海司长的来电来信祝贺。大连医学院吴功侃院长对来自全国31所院校的60位代表表示热烈的欢迎。

这次校际会议的主要议题是：

一、关于医学检验专业本科生的培养目标——检验医师的岗位职责及其知识结构的基本要求，检验专业教育三个层次（本科、大专、中专）的合理结构。

二、大学本科及专科检验专业教材的编写出版情况。

三、各专业组的教学研讨、教学计划、教学大纲、教学方法及师资培训。

四、实习、毕业论文、研究生培养、专业评估、函授教育等方面的经验交流。大会收到经验交流文章66篇（其中校际会议专集——大医教研89年第3期及重医大医学检验系建系五周年专集共2本专集）收到展览教材及本专业多选题集等8种，还有教材征订及编书信息8项。

（下转79页）