DOI:10.16016/j.1000-5404.1987.03.017

组织ATP、ADP、AMP水平的荧光素酶系测定

严 涛 张 平 段恒春 孟宪钧（第一附属医院 肝胆外科实验室）

组织ATP、ADP、AMP水平是反映组织的细胞功能状态及生活力的参数之一，其测定对于逐渐进入细胞水平和分子水平的外科临床实验研究是一个有用的手段。使用虫荧光素酶发光系统测定ATP、ADP、AMP水平的方法在国外研究已有多年[1][2][3][4][5][6][7]，近几年国内也有有关报道[8]，但将本法用于外科临床实验研究在国外文献中尚不多见，国内亦未见将本法用于动物组织内ATP、ADP、AMP水平测定的报道。我们实验室根据自己的条件，建立了用虫荧光素酶系统测定动物组织ATP、ADP、AMP水平并进而计算总腺苷酸及能荷的方法。

材料与方法

1. 试剂

虫荧光素、虫荧光素酶和肌激酶（MK，1950 u/mg蛋白）（Sigma公司产品），丙酮酸激酶（PK）、磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)、ATP、ADP、AMP（均为Boehringer公司产品），余试剂均为国产分析纯。所有试剂用重蒸蒸馏水配制。

2. 仪器

FG-200型发光光度计，上海植物生理研究所生产。

3. 腺苷酸提取液的制备

用液氮预冷之金属钳快速夹取所需动物组织若干（0.2～0.4g），加入20倍体积的0.4N $HClO_4$离心（4000rpm，15分钟）。取上清液2～4ml于试管内，在不断摇动下加入5M K_2CO_3调pH至7.75。离心后取上清，用0.02M Tris-醋酸缓冲液(含10mM $MgSO_4$、5mM KCl、1mM EDTA）行三倍稀释后待测定或转化。上述操作均在冰浴下进行。

4. ADP和AMP转化液的制备

上述腺苷酸提取液或标准液20μl，加入等体积PEP-PK混合液，总转化体积40μl，内含10mM $MgSO_4$、5mM KCl、4mM PEP、4μl PK，37℃保温60分钟后立即加入0.36ml的冷缓冲液以终止反应，得ADP测定体系。腺苷酸提取液或标准液20μl，加入等体积PEP-PK-MK混合液，总转化体积40μl，内含10mM $MgSO_4$、5mM KCl、4mM PEP、4μl PK、10μlMK，保温及终止反应同上，得AMP测定体系。

5. 测定

在0.5cm光径比色杯中注入0.1ml样品液或标准液，放入发光光度计的暗室里，然后从暗室盖的小孔用注射器快速注入0.9ml荧光素酶系混合液（每ml含荧光素酶粉10μg、荧光素40μg、牛血清白蛋白1mg），所记录之发光曲线的初始峰值即为样品光强。测定温度25℃。

6. 计算

（1）腺苷酸水平：如前所述，对每一样品分三管进行不同转化和测定，则管1为不经转化的腺苷酸提取液，获得ATP的光强，由标准曲线上查得ATP的测定浓度。管2为ADP转化液，获得ATP+ADP的光强，以管2减去管1所得光强查得ADP测定浓度。管3为AMP转化液，获得ATP+ADP+AMP的光强，以管3减去管2所得光强查得AMP测定浓度。乘以稀释倍数后再分别用回收率和转化率进行校正。

（2）能荷 $= (ATP + \frac{1}{2}ADP) / (ATP + ADP + AMP)$ [9]

（3）转化率 $=$

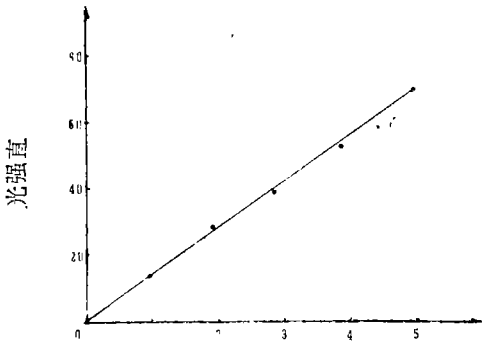
$$\frac{\text{标准ADP(或AMP)转化为ATP后测得光强}}{\text{等克分子ATP测得光强}} \times 100\%$$

结果

1. 有关方法学的几项指标

（1）ATP的标准曲线：将标准ATP配成 1×10^{-9}～5×10^{-9} moles/ml的5管应用液进行测定，以光强值对ATP浓度绘制标准曲线，见图1。由于每批测定条件有差异，酶活也不尽相同，故对每批测定均应作标准曲线。

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



ATP浓度(10^{-9}moles/ml)

图1 标准曲线

（2）重复试验：取两份肝组织，同时各做提取液8管进行测定，批内变异系数平均为ATP 3.27%，ADP 6.40%，AMP 6.45%。另取两份肝组织，于不同时间分别抽提并测定各5次，批间变异系数平均为ATP14.82%，ADP15.48%，AMP16.40%。

（3）回收率：分别向8份组织中加入已知量ATP或ADP、AMP进行回收试验，回收结果平均为ATP80.6%，ADP111.6%，AMP108.5%。

（4）转化率：分别向8份提取液中加入已知量ADP、AMP，进行转化试验，转化率平均为ADP97.8%，AMP99.7%。

2. 健康大鼠肝脏的正常值，见表1。

表1 正常大鼠肝组织ATP、ADP、AMP、总腺苷酸含量及能荷值

实验动物数	ATP	ADP	AMP	总腺苷酸	能荷
	μmoles/g肝（湿重）				
8	2.939±0.315	0.974±0.229	0.211±0.065	4.124±0.415	0.831±0.019

表中各值为平均值±标准误

讨论

1. 本实验结果与文献值的比较，见表2。

表2 大鼠肝脏腺苷酸文献正常值参考

		ATP	ADP	AMP	总腺苷酸	能荷
		μmoles/g肝				
Mavubayashi S	1980[10]	3.14	1.21	0.21	4.51	0.83
Ukikusa M	1981[11]	2.48	0.81	0.18	3.48	0.83
Kono Y	1982[12]	2.08	0.63	0.10	2.80	0.85
Ohkawa M	1983[13]	2.41	0.73	0.14	—	0.85
Fornander J	1984[14]	2.98	1.23	0.16	—	0.82
本实验室	1984	2.939	0.974	0.211	4.124	0.831

由表2可见，各文献正常值略有不同，这是因为所使用的测定方法及实验条件各不相同，我们的结果与Mavubayashi（1980）、Fornander（1984）非常接近。

2. 本法ATP的回收率较低，这是因为在ATP的回收率中包括两个因素，第一，在抽提过程中ATP的吸附丢失与降解；第二，在测定过程中样品内诸干扰因子所造成的光衰减，这个光衰减是导致ATP回收率较低的主要原因。具有光衰减是发光光度计与吸光光度计的一个不同之处。

3. 据文献报道[6]荧光素酶法可检出的ATP水平为10^{-17}mole，我们实验室因发光仪本身的性能限制，测定水平在10^{-9}mole。由于动物的大部分组织内ATP含量较高，而

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

ADP、AMP的测定又基于ATP基础之上，故此灵敏度可以满足临床实验研究的要求。另外我们的样品稀释倍数在2000左右，因此对ATP含量少的组织可采用比较小的稀释倍数。我们已用本法测定了正常和缺血大鼠肝、肾、肺、心的ATP水平，结果较好。

4．目前国内外的外科临床实验室在腺苷酸测定中较常使用的是“己糖激酶-葡萄糖-6-磷酸脱氢酶”体系，表2中Okikusa、Kono、Ohkawa等均使用此法。我们实验室亦曾使用过此法，所得结果与荧光素酶法的结果非常接近。但己糖激酶法的测定步骤繁琐，费时较长，而虫荧光素酶法简便快速，故值得推广。

参考文献

1. McElroy WD, et at. The mechanism of inhibition of bioluminesence by naphthoquinons. J Cellular Comp Physiol 1947; 30:359
2. Strehler BL, et al. Firefly luminescence in the study of energy transfer mechanism. I. Substrate and enzyme determination. Acta Biochem Biophys 1952; 40: 28
3. Deluca M, et al. Kinetics of the firefly luciferase catalyzed reactions. Biochemistry 1974; 13:921
4. Kimmich GA, et al. Assay of picomole of amounts of ATP, ADP, AMP using the luciferase enzyme system. Anal Biochem 1975; 69:187
5. Lundin A, et al. Continous monitoring of ATP-converting reaction by purified firefly luciferase. Anal Biochem 1976; 75:611
6. Thore A. Technical aspects of the bioluminescent firefly luciferase assay of ATP. Science Tools 1979; 26:30
7. Deluca M, et al. Factors affecting the kinetics of light emission from crude and purified firefly luciferase. Anal Biochem 1979; 95:194
8. 李立人，等。微量ATP的荧光素酶分析方法的研究。生物化学与生物物理学进展 1980; 6:60
9. Atkinson DE, et al. Adenosine triphosphate conservation in metabolic regulation. J Biol Chem 1967; 242:3239
10. Marubayashi S, et al. Adenine nucleotide metabolism during hepatic ischemia and subsequent blood reflow periods and its relation to organ viability. Transplantation 1980; 30:294
11. Okikusa M, et al. Pathophysiology of hemorrhagic shock. Circ Shock 1981; 8: 483
12. Kono Y, et al. Significance of mitochondrial enhancement in restoring hepatic energy charge after revascularization of isolated ischemic liver. Transplantation 1982; 33:150
13. Ohkawa M, et al. Studies on the mechanism of beneficial affects of ATP-$MgCl_2$ following hepatic ischemia. Am J Physiol 1983; 244:R695
14. Fornander J, et al. Effects of methylprednisolone on protein synthesis and blood flow in the positischemic liver. Circ Shock 1984; 12:287

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net