

Na⁺/K⁺ ATPáz aktivitás meghatározása

Az eukarióta sejtek plazmamembránja elválasztja egymástól a citoszolt és az extracelluláris környezetet, permeabilitási barrierként funkcionál. A plazmamembránon keresztüli molekula- és ionáramot specifikus transzportrendszerek szabályozzák. A legtöbb emlős sejtben a citoszol K⁺ koncentrációja 120 mM, a Na⁺ koncentrációja 10 mM. Az extracelluláris kompartment Na⁺ koncentrációja 140 mM, míg a K⁺ koncentrációja 4.5 mM. Ezen iongradienseket a Na⁺/K⁺ ATPáz (Na⁺/K⁺ pumpa) hozza létre és tartja fenn. A pumpa működéséhez szükséges energiát az intracelluláris ATP hidrolízise szolgáltatja.

A pumpa gátlószere az ouabain (az elnevezés a szomáli *waabaayo*-ból származik, mely afrikai növényekből kivont „nyílméreg”, ott elefántvadászatra használják). Az ouabain (más néven strophantin) egy szívglükozid, mely a plazmamembrán külső felszínéhez kötődik és a Na⁺/K⁺ ATPáz defoszforilációját gátolja. Bár az ouabain növényi termék és mérgező hatású, friss kutatások szerint az ouabain vagy egy ouabain-szerű faktor a humán mellékvesében, hypothalamusban és szívben is szintetizálódik. Ennek a szerepe jelenleg nem ismert, de az endogén ouabain emelkedett szintjét leírták pangásos szívelégtelenségben, esszenciális hipertóniában, veseelégtelenségben és bizonyos daganatoktól szenvedő betegekben is. Ezeknek a patológiás állapotoknak a közös jellemzője a szöveti hipoxia.

Az ATP-áz aktivitás meghatározható a felszabaduló inorganikus foszfát mennyiségének mérésével, mely a Fiske-Subbarow színreakcióval detektálható.

The Colorimetric Determination of Phosphorus (Fiske, C. H., and Subbarow, Y. (1925) J. Biol. Chem. 66, 375–400

Szükséges oldatok:

- 1.) 0.5 M TRIS HCl puffer pH=7.4
- 2.) 5 mM MgCl₂
- 3.) 1 M NaCl és 0.2 M KCl oldata (keverék)
- 4.) 1 M NaCl
- 5.) 0.2 M KCl
- 6.) 10 mM Ouabain (Strophantin)
- 7.) 25 mM ATP
- 8.) 20 % TCA (triklórecetsav)
- 9.) 2.5 % ammónium-molibdát
- 10.) 1 % aszkorbinsav
- 11.) sertés agy szürkeállomány Na⁺/K⁺ ATP-ázokat tartalmazó mikroszóma frakciója

A Na⁺/K⁺ ATPáz-t tartalmazó mikroszóma frakció izolálása

(technikusok által elvégezve)

Izoláláshoz használt oldat:

- 30 mM TRIS-HCl
- 250 mM szukróz
- pH=7.4

A sertés agy szürkeállományát a fent leírt oldatban homogenizálták. A homogenizátumot 6000 rpm-en 30 percig centrifugálták 4 °C-on. A felülúszót újracentrifugálták 40000 rpm-en 60 percig 4 °C-on. A mikroszóma frakciót tartalmazó pelletet (üledéket) az izoláló oldatban reszuszpendálták és a fehérje tartalmat Biuret reakcióval mérték. A mikroszóma frakciót az izoláló oldattal 2 mg/ml-es koncentrációra hígították.

Kísérlet leírása

1. Pipettázza az alább felsoroltakat a kémcsövekbe (fentről lefelé haladva):

	1	2	3	4	5	6	7
TRIS-HCl (ml)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
MgCl ₂ (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
NaCl-KCl (ml)	-	-	0,1	-	0,1	-	-
NaCl (ml)	-	-	-	-	-	0,1	-
KCl (ml)	-	-	-	-	-	-	0,1
Strophantin (ml)	-	-	-	0,2	0,2	-	-
H ₂ O (ml)	0,3	0,3	0,2	0,1	-	0,2	0,2
ATP (ml)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Mikroszóma frakció (ml)	-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

2. Inkubálja a kémcsöveket 20 percig 37 °C-on.

3. Adja az alábbiakat a kémcsövekhez:

TCA (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Mikroszóma frakció (ml)	0,1	-	-	-	-	-	-

Ebben a lépésben minden fehérje kicsapódik, így a Na⁺/K⁺ ATPáz aktivitás megszűnik. A kicsapódott fehérjéket (akárcsak a DNS-t és RNS-t) centrifugálással el kell távolítani az oldatból.

4. Öntse át a kémcsövek tartalmát Eppendorf csövekbe és centrifugálja **10000 rpm-en 2 percig**. Ügyeljen rá, hogy a centrifuga ki legyen egyensúlyozva!

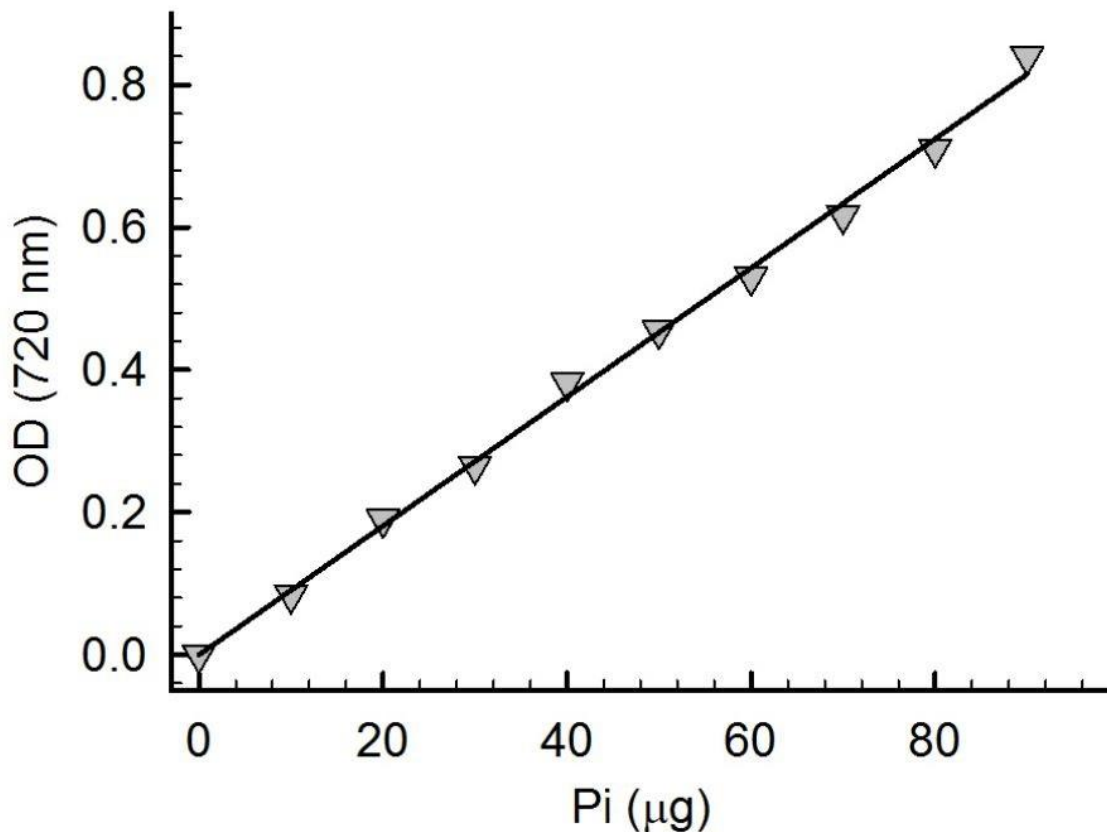
Centrifugálás után óvatosan kezelje a centrifuga csöveket. A következő lépésben csak a felülúszóra lesz szükség.

Felszabadult foszfát mennyiségének meghatározása:

- Pipettázza tiszta számozott kémcsövekbe az alábbiakat:

Felülúszó a megfelelő számú Eppendorf csőből (ml)	0,3
H ₂ O (ml)	3,2
Ammónium-molibdát (ml)	1,0
Aszkorbinsav (ml)	0,5

- Inkubálja a kémcsöveket **5 percig 37 °C-on**, majd hűtse le szobahőmérsékletűre.
- Mérje meg a minták abszorbanációját **720 nm**-en a vak oldattal szemben (1-es minta)
- Az alábbi kalibrációs görbét használva, számítsa ki a felszabadult foszfát mennyiségét az egyes minták esetében.



A mikroszóma frakció sokféle ATP-át tartalmaz. A fent leírt módszer az összes ATP-át általi ATP hidrolízisből származó foszfát mennyiségét méri, ezért nem alkalmas a különböző típusú ATP-ák megkülönböztetésére.

Az ouabain a Na⁺/K⁺ ATP-ázra specifikus, ezért kiszámítható a százalékban kifejezett Na⁺/K⁺ ATP-áz aktivitás a teljes ATP-áz aktivitáshoz képest.