

表2 滤速之比较

类别 顺序	滤 纸		295-8		8229		4221	
	滤清时间 (分)	平均滤速 (毫升/分)	滤清时间 (分)	平均滤速 (毫升/分)	滤清时间 (分)	平均滤速 (毫升/分)	滤清时间 (分)	平均滤速 (毫升/分)
1	27	13.0	15	26.8				
2	44	<5.0	43	23.0	3.6	15.1	3.4	15.0
3	12	<5.0	2	10.2	2	9.1	2	9.1
4	5	9.3	5	20.4	5	20.4	5	19.6
平均	22	8.0	16.3	20.1	3.5	14.9	3.5	14.8

[本文于 1983 年 1 月 28 日收到]

人胃液乳酸脱氢酶同工酶定量电泳测定方法

萧 惠 连

(衡阳医学院生化教研室)

本文介绍一个琼脂糖凝胶电泳定量测定胃液乳酸脱氢酶 (LDH) 同工酶的简易方法。包括一个灵敏的染色程序和光密度扫描, 或洗脱比色。并完全适用于血清和组织抽提液中 LDH 同工酶分析。

血清和组织提取液 LDH 同工酶的分离检测, 最初用淀粉凝胶和琼脂凝胶电泳, 四氮唑蓝 (NBT) 染色, 以后用醋酸纤维薄膜电泳 1961 年提出的琼脂糖凝胶电泳, 优于纸电泳和琼脂电泳的是: (1) 无吸附作用, (2) 含荷电基团少, 电渗小。适宜分离脂蛋白, 酶络合物, 核酸, 病毒和细胞颗粒等大分子物质。适用于临床分析。

琼脂糖是线形多糖, 由 1, 3-连结的 β -D-吡喃半乳糖和 1, 4-连结的 3, 6-脱水 α -L-吡喃半乳糖重复单位组成。沸水溶解, 室温凝胶, 多糖骨架无共价交联, 富氢键, 在 0° 到 40℃, pH4—9 时, 可以较长期贮放 (室温存放两月可用——作者)。国内上海东海制药厂产品 (791001) 质量优良。北京生物物理研究所生化试剂厂有相同产品。常用量 0.5—1.5%。如提高浓度至 7—8%, 与聚丙烯酰胺凝胶比较, 可以得到优异分辨率。

一、方法 改进 N. M. Papadqulos 改进 Wieme 的琼脂凝胶电泳法。用国产有机玻璃

电泳仪及其电源 (广州华南电子仪器厂), 电子交流稳压器 (614-A 型 1KVA, 上海仪表零件厂)。不需恒温 and 冷却装置。取载玻片 10 块, 洗净, 酒精浸泡、烘干, 每块覆盖 2.5 或 3.0ml 0.9% 琼脂糖巴比妥缓冲液 [巴比妥钠 (广州化学试剂厂 790101) 9.28 克/升, 重馏水溶解, 1NHCl 调 pH 至 8.4, $\mu = 0.045$] 成均匀透明薄层, 电极槽用相同缓冲液。

二、点样: 用微量注射器吸胃液 (空腹抽空胃液, 注入 5% NaHCO₃ 液 10 ml, 10 分钟后, 再抽出胃液, 要求 pH7.0 以上, 离心, 得上清液) 20 μ l, 点入宽 2mm 狭缝内, 1—2 分钟后, 再点样一次, 总量 40—60 μ l, 可重复点样两次, 溶血样液弃之。

三、电泳: 145—150 V; 18—22 mA (两片); 30—40 分钟, 室温, 用滤纸条 (宽度同载玻片) 四层作桥, 每次两个样品。

四、染色 用下列混合液检测 LDH 同工酶活性, 用前十分钟配制, 每片用量为:

磷酸缓冲液 pH7.5, 0.1M。 0.7—1ml
白明胶粉粒 ~0.5 mg 加热溶解
乳酸钠溶液 1M 0.14—0.2ml
氰化钠溶液 0.1M 0.035—0.05ml
吩嗪甲酯 (PMS) 液 1mg/ml

0.035—0.05ml
辅酶 I(NAD⁺) 粉粒 ~2mg 搅动溶解
四氮唑紫 (INT) 液 1mg/ml

0.35—0.5ml,

混匀,用滴管加至染色皿内载玻片凝胶上,(慎勿溢出!)加盖。45℃ 恒温水浴暗处保温,15分钟开始呈色,30分钟显色完全。(注意:温度超过45℃,或保温时间较长,背景呈红色!)蒸馏水洗去剩余液,避光保存,不需固定。

五、定量 1、扫描 用国产光密度扫描仪(北京生化仪器厂),将载玻片放平台上,光波长10mm 狭缝处扫描、同工酶分配%,由纪录器积分曲线计算。2、洗脱比色 将同工酶五条区纸用刀片切下,另取同样大小凝胶片作对照,切成小块,分放试管内。各加 0.4N NaOH 5ml、沸

水浴溶解,冷至 37°—45℃。721 型分光光度计 580nm 读数。计算同工酶分配%。

六、结果

(1) 正常胃液 LDH 同工酶谱分配%明显不同于血清: LDH4,5 高, LDH3,2,1 依次减少。(2) 胃炎,胃萎缩病人胃液 LDH 同工酶 LDH 4,5 有程度不同增加, LDH1,2, 减少。一例胃癌病人胃液 LDH 同工酶谱有明显改变:

LDH-1 (17.3); LDH-2 (19.4); LDH-3 (23.8)均增加。LDH-4(16.1); LDH-5 (23.4)减少,而以 LDH-4 下降最明显。

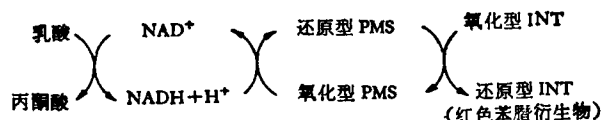
(3) 用本法作正常血清 LDH 同工酶分析,结果与文献报道值一致(表1),证明方法可靠。

表1 正常血清 LDH 同工酶分配%

同工酶分配% 作者	LDH-1	LDH-2	LDH-3	LDH-4	LDH-5
N. M. Papadaulos	30 (28—31)	40 (38—43)	20 (17—22)	60 (5—8)	4.0 (3—6)
本文	30.5	32.3	22.6	7.9*	6.7*

* 取分析样品的最大值

七、讨论 同工酶广泛分布于哺乳类、两栖、鸟类、昆虫、植物和单细胞生物内。LDH 同工酶 1957 年从人血清中发现以来,是研究最多的典型同工酶,临床已用作多种疾病诊断的重要生化指标之一。测定其活性,包括上列偶联反应。



我们在凝胶浓度,电泳条件,染料选择和用量、温度和保温时间,点样量等方面作了一些改进,以求得到一个比较标准的定量方法。如 0.9% 凝胶分离效率优于 0.5%; 电流强度小和电泳时间短时,区带间距小; INT 染色,有

NaCN 存在时,比 NBT 灵敏; 45℃ 保温比 37℃ 显色快而完全,这与文献报道该酶具较高热稳定性相符合。洗脱比色时,温度冷却过低,放置时间较长,凝胶成小凝块下沉管底,溶液无色清朗; NaCN 过多,保温时间过长,凝胶背景呈色,由于 INT 非特异性还原。此时对照管光密度增加。胃液点样量如仅稍高于血清点量 (5μl), 最为理想,点样狭缝位于 LDH-5 带前缘,在扫描图谱上出现一个上升或下降至基线的倒置波峰,但对结果无明显影响。

吴仕艳、李春芳二同志参加技术工作,陈嘉勤同志参加正常胃液取样,临床样品由我院内科胃镜室供应。

参 考 文 献

[1] Wieme R. J. et al., *Clin. Chim. Acta*, 7, 750,

(下转第 8 页)

要是静电力使那些调节蛋白二聚体与长长的 DNA 分子上任意部位发生非特异性结合,以其偶极向量的正极指向带负电位场的浅沟(图 6),然后蛋白质沿 DNA 分子滑动或作链间转移,一直到发现它的专一性结合位(比如操纵基因,它只占 DNA 分子的几百至几十万分之一)。这时蛋白质(也许也有 DNA)发生一定的构象变化,以便使特异性氢键体系得以形成。这种机制保证了细胞内含量极少的调节蛋白得以很快找到它的很短的一段专一性结合位点^[18,8]。最大限度的氢键配对使特异性结合显

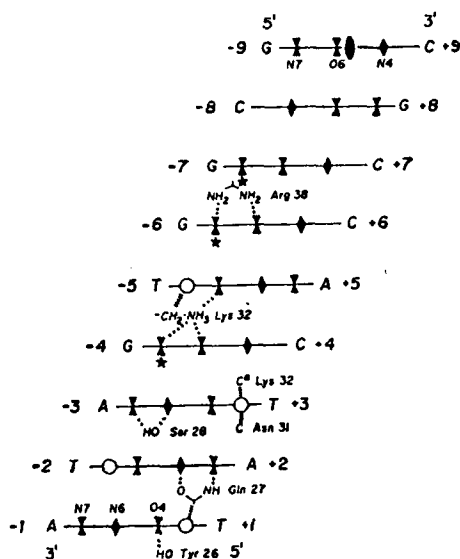


图 10 Cro 蛋白与 DNA 深沟专一性作用示意图^[14]

此处只给出操纵基因的一半,●代表二重轴;◆代表氢键供体;×代表氢键受体;○代表胸腺嘧啶的甲基;★代表已知与 Cro 作用的鸟嘌呤的 N7 氮原;(···)代表氢键;(||||)代表范氏作用。

著优于非特异性结合,一对氢键就可提高结合常数达七倍。这时,识别过程终于完成。至于λ-噬菌体一对阻遏蛋白与三个操纵基因之间的竞争性结合,也必定是这种特异性契合在程度上的差别所致。要彻底弄清这一点,最好的途径就是研究阻遏蛋白与操纵基因共生晶体的结

构,直接观察其间的立体化学关系。现在, Cro 和 cI 与有特定碱基序列的 DNA 片段的共晶已经获得^[15,9]。cI 与操纵基因片段共晶的晶体学研究初步证实了,已经提出的复合物模型是正确的^[20]。DNA 与蛋白质相互作用的直观图景将很快展示在分子生物学家的前面。

参 考 文 献

- [1] (A) Sanger, F., et al.: *J. Mol. Biol.*, **162**, 729, 1982.
(B) Ptashne, M. et al.: *Cell*, **19**, 1, 1980.
- [2] Johnson, A. D., et al.: *Nature*, **294**, 217, 1981.
- [3] Zubay, G. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **66** 104, 1970.
- [4] Anderson, W. F. et al: *Nature*, **290**, 654, 1981.
- [5] Pabo, C. O. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 1608, 1979.
- [6] Pabo, C. O. et al.: *Nature* **298**, 443, 1982.
- [7] Mekey, D. B. et al.: *Nature*, **290**, 744, 1981.
- [8] 王家槐, Lewis, M., «中国科学»待发表(1984)。
- [9] Simpson, R. B., *Nucleic Acids Res.*, **8** 759, 1980.
- [10] Anderson, W. F., et al., *J. Mol. Biol.*, (1983) 在印刷中。
- [11] Steitz, T. A. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 3097, 1982.
- [12] Ohlendorf, D. H. et al.: *J. Mol. Evol.*, **19**, 109, 1983.
- [13] Pabo, C. O. et al.: *Nature*, **298**, 441, 1982.
- [14] Sceman, N. C. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 804, 1979.
- [15] Lewis, M., et al.: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **43**, 435, 1983.
- [16] Ohlendorf, D. H., et al. *Nature*, **298**, 718, 1982.
- [17] Huber, R. *Protein-Protein Interaction* Edited by Jaenicke d Helmreich, 111, 1972.
- [18] Berg, O. G. et al.: *Trends in Biochem. Scien.* **7**, 52, 1982.
- [19] Matthews, B. W., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1983, 在印刷中。
- [20] Wang J-H. et al.: "The Crystallographic Studies on the Co-crystal Containing the N-terminal Domain of λ-Repressor and the 11 Base-pair Synthetic DNA Fragment", The Report in the Eighth Course of International School of Crystallography June 1982, in Erice, Italy.

[本文于 1983 年 4 月 12 日收到]

(上接第 79 页)

- 1962.
- [2] Cohn L., et al: *J. Lab. & Clin. Med.*, **64**, 355, 1964.

- [3] Papadoulou N. M., et al: *Amer. J. Clin. Path.*, **47** 96, 1967.

[本文于 1983 年 1 月 18 日收到]