

三个带有红系增强子的人 βE 基因转基因鼠中 (5' HS2 βE), 均有人 βE 基因表达, 表达水平分别为内源鼠 α -基因的 79.7%, 88.3% 和 107%, 而在另一组只整合有单纯人 βE 基因的转基因 (βE) 鼠中未检测到人 βE 基因的表达。

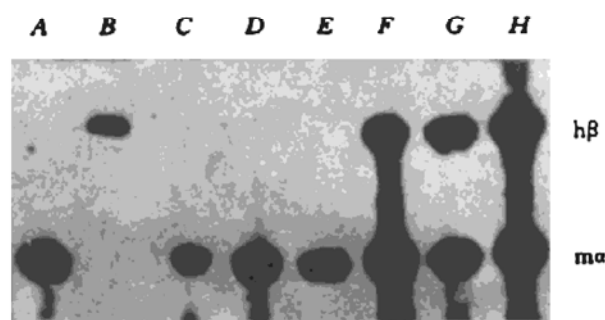


图4 RNase 保护试验

A: 鼠 α -珠蛋白 mRNA; B: 人 β -珠蛋白 mRNA;
C, D, E: βE 转基因小鼠; F, G, H: 5' HS2 βE
转基因小鼠。

2.4 讨论

2.4.1 核酸酶对 RNA 的降解作用是影响 RNA 质量从而影响 RNase 保护试验结果的重要因素, 因此需尽力排除核酸酶污染的可能性。

2.4.2 体外转录反应中, 各组分按表 1 所列逐次加入, 但反应管需在室温放置, 因冰上操作会导致反应物沉淀, 影响反应效率。

2.4.3 合成后的探针应分装后 -20°C 冻存, 并尽快用于杂交反应。

2.4.4 在 RNA:RNA 杂交反应中, 需设置针对所用各个探针的阳性及阴性对照, 排除交叉杂交的可能性。

2.4.5 ^{32}P -UTP 或 ^{32}P -GTP 的供应不便是 RNase 保护试验应用的主要限制, 如能及时解决这一问题, RNase 保护试验不失为一种有效的分析 RNA 的方法。

参 考 文 献

- 1 Lynn D A, Angerer L M, Bruskin A M *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1983; 80: 2656
- 2 Zinn K DaMaio D, Maniatis T *et al.* Cell, 1983; 34: 865
- 3 Melton D A, Krieg P A, Rebagliati M R *et al.* Nucl Acid Res, 1984; 12: 7034
- 4 Curtin P T, Liu D, Liu W *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1989; 86: 7082
- 5 Liu D P, Chang J C, Moi P L *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1992; 89: 3899

小鼠全血中谷胱甘肽过氧化物酶活力的微量测定法

荣征星 刘慧中* 鲍景奇 陈红专 孙玉燕 孙 琛

(上海第二医科大学药理学教研室, 上海 200025)

摘要 报道了用分光光度计法直接测定小鼠全血中谷胱甘肽过氧化物酶 GSH-PX 活力的方法。取血样 10 μl , 423nm 为测定波长, 三氯醋酸为蛋白沉淀剂, 在 pH6.5, 3min 的酶反应条件下, 反应剩余的谷胱甘肽和其与 DTNB 试剂反应生成的颜色产物成线性相关。该法灵敏度高, 重复性好, 所需仪器简单, 可成为科研及临床工作中分析全血中 GSH-PX 的重要方法之一。

关键词 谷胱甘肽过氧化物酶, 分光光度法, 分析

1957年 Mills 等首先发现谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-PX)^[1], 1973年 Rotruck 等证明 GSH-PX 为含硒酶^[2],

1978年 Frostrom 等证实 GSH-PX 的活性中心

* 上海市长宁区中心医院。

收稿日期: 1993-07-20, 修回日期: 1993-12-20

是硒代半胱氨酸^[3]。有证据充分说明 GSH-PX 是哺乳类体内广泛存在的一种重要的催化过氧化物分解的酶类, 该酶在清除细胞内有害的过氧化产物, 切断脂质过氧化链锁反应方面起着重要作用。而硒与肿瘤、衰老、克山病和糖尿病等密切相关, GSH-PX 又是高等生物中唯一已知的含硒酶类。因此, 选择 GSH-PX 作为研究对象, 建立和完善其测定方法具有重要意义。

目前国内外测定 GSH-PX 活力的生化方法主要分成两类, 一类以 Hafeman 法为代表的直接法^[4-6], 直接测定单位时间内 GSH 减少的量来表示酶活力, 另一类测定与谷胱甘肽氧化还原偶联的还原型辅酶 II 减少的量来表示酶活力, 又称间接法或偶联法。两类方法各有优劣。我们在国内外有关 GSH-PX 测定方法学的基础上, 对直接法作了改进, 使其具有微量操作 (10 μ l 全血), 灵敏度高, 重复性好, 使用仪器简单等优点。现介绍如下。

1 材料和方法

1.1 试剂 (除注明外, 均采用分析纯试剂)

a. 叠氮化钠-磷酸盐缓冲液 (NaN₃-PBS, pH7.0) 磷酸氢二钠 7.16g, 磷酸二氢钠 3.12g, 乙二胺四乙酸二钠 0.01g, 1.54mol/L NaN₃ 溶液 0.65g, 以双蒸水溶解, 稀释至 100ml, 再以 NaOH 溶液校正 pH 至 7.0。

b. 1.0mol/L GSH 溶液 (临用前配制) GSH (Fluka chemie, Switzerland) 3.07mg 用 NaN₃-PBS 液溶解, 稀释至 100ml。

c. 12.5mmol/L H₂O₂ 贮备液 30% H₂O₂ (上海桃浦化工厂) 0.16ml 双蒸水稀释至 100ml。上述贮备液用棕色瓶 4℃ 冰箱内贮存。由于 H₂O₂ 易分解导致浓度改变, 故临用前最好用紫外分光光度计确定贮备液的确切浓度。方法如下: 取贮备液 3—4ml, 测其 240nm 处 1cm 光径的吸光度值 A。H₂O₂ 的摩尔吸光系数 $\epsilon_{240nm} = 36$, 故其摩尔浓度 = A/36。例如实测 A 值为 0.45, 则 H₂O₂ 浓度为 0.0125mol/L。然后据此实际浓度按比例用双蒸水稀释 10 倍,

即得 1.25mmol/L H₂O₂ 应用液。

d. 0.61mol/L 三氯醋酸溶液 (TCA) TCA (上海试剂三厂) 10g 双蒸水溶解并稀释至 100ml。

e. 0.32mol/L 磷酸氢二钠溶液 磷酸氢二钠 29.92g 双蒸水溶解并稀释至 200ml。

f. 1.0mmol/L DTNB 显色液 5, 5'-二硫代对二硝基苯甲酸 (DTNB) (Sigma, USA) 20mg, 枸橼酸三钠 500mg 双蒸水溶解并稀释至 50ml (棕色瓶避光保存于 4℃ 冰箱)。

1.2 仪器

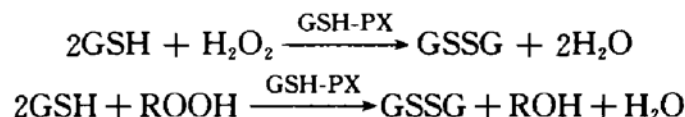
日本岛津 UV-2201 紫外分光光度计 (可用国产 72-1 型分光光度计代替), TA-1R 型台式冷冻离心机 (上海离心机械研究所)。

1.3 实验动物

昆明种小白鼠 20 $\pm$ 2g, 雌雄兼用, 本校动物房提供。

1.4 测定原理

GSH-PX 可特异性地催化 GSH 与过氧化物的氧化还原反应, 反应式如下:



故可利用这些反应中底物量的改变来测定 GSH-PX 的活力, 即以单位时间内 GSH 减少的量来表示 GSH-PX 的活力。在合适的 pH 条件下 DTNB 可与 GSH 反应生成浅黄色 5-硫代-2-硝基苯甲酸阴离子, 在 423nm 处有最大吸收。它的颜色深浅程度在一定的浓度范围、一定的时间内与剩余的 GSH 浓度成正比, 也就是与 GSH-PX 的活力成反比。

考虑到 GSH, H₂O₂ 在没有酶的条件下亦可进行上述反应, 故最后计算 GSH-PX 活力时, 必须扣除非酶反应所引起的 GSH 减少。

1.5 GSH 标准曲线的制作

用 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10, 0.12, 0.14, 0.16, 0.18, 0.20ml 1.0mol/L GSH 加 0.61mol/L TCA 1.60ml, 用双蒸水稀释配制成浓度为 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 μ mol/L 的 GSH 标准液各 2ml,

再在各管内依次加入 0.32mol/L Na_2HPO_4 2.5ml, 4mol/L NaOH 120 μl , 1.0mol/L DTNB 0.5ml. 以空白管校零点, 于423nm 波长处比色, 读取吸光度值 A . GSH 标准曲线见图1. 图1表明 A 值与 GSH 浓度有十分良好的线性关系, 相关系数 $r=0.9973$.

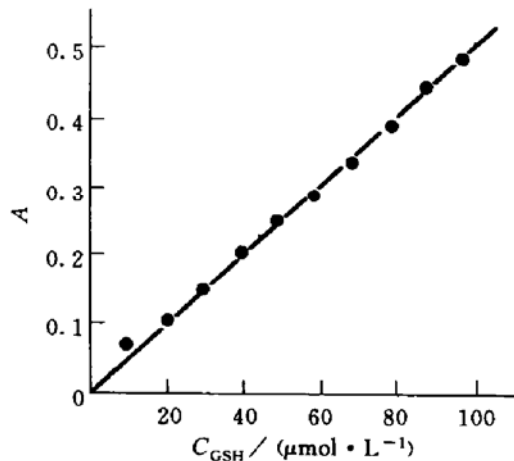


图1 GSH 标准曲线

1.6 样本制备

小鼠断头取血, 肝素抗凝后取10 μl 全血加入到1ml 双蒸水中, 充分振摇, 使之全部溶血成为1:100溶血液即为待测样品. 若当天无法全部测定, 则将肝素抗凝全血-20℃速冻后3d内测完. 测定前取出样品室温自然解冻后, 同样按1:100制备溶血液样品.

1.7 样品测定

1.7.1 测定步骤 (见表1) 上述溶液混匀后立即计时, 静置11—15min 后以样品空白管调零点, 于423nm 波长处测定各管吸光度值.

1.7.2 酶活力单位定义 1 μl 小鼠全血, 37℃, pH6.5条件下反应1min, 扣除非酶反应后, 使 GSH 浓度下降1 μmol 为1个酶活力单位.

1.7.3 计算 鼠全血 GSH-PX 活力单位数

$$= \frac{[\text{GSH}]_{\text{非酶管}} - [\text{GSH}]_{\text{样品管}} - [\text{GSH}]_{\text{试剂空白管}}}{3 \times 4}$$

式中 $[\text{GSH}]_{\text{非酶管}}$, $[\text{GSH}]_{\text{样品管}}$ 和 $[\text{GSH}]_{\text{空白管}}$ 均为酶反应结束后剩余的 GSH 浓度. 可根据测得的吸光度值从 GSH 标准曲线上查到相应的 GSH 浓度. 实际工作中为简便起见, 可通过上

述公式将 GSH 标准曲线中的横坐标折算成酶活力单位数, 这样可以根据样品管和试剂空白管的吸光度差值直接查出相应的酶活力. 酶反应时间为3min. 每份标本全血为4 μl .

表1 GSH-PX 样品测定加样表

试剂/ml	样品空白管	非酶反应管	样品测定管	试剂空白管
GSH	—	0.4	0.4	0.4
样品溶血液	—	—	0.4	0.4
双蒸水	0.8	0.4	—	—
混匀后37℃水浴保温5min				
H_2O_2 应用液 (已预温)	0.2	0.2	0.2	0.2
混匀后立即计时, 37℃水浴保温3min				
TCA 沉淀剂	4.0	4.0	4.0	4.0
混匀, 冰浴, 离心3000r/min, 10min				
取上清液	2.0	2.0	2.0	2.0
0.32mol/L Na_2HPO_4	2.5	2.5	2.5	2.5
4mol/L NaOH	0.12	0.12	0.12	0.12
DTNB 显色剂	0.5	0.5	0.5	—
双蒸水	—	—	—	0.5

2 结果和讨论

2.1 波长选择

本方法在 Hafeman, 张嘉麟和夏奕明等方法基础上作了改进. 他们所选择的波长各不相同. 我们对由测定样品和不同比例的 DTNB 组成的混合样品进行光谱扫描, 结果表明游离的5-硫代-2-硝基苯甲酸阴离子在423nm 有吸收峰, 其吸光度值与游离阴离子浓度成正比, 而且不被 DTNB 的吸收峰所干扰, 故确定423nm 为测定波长.

2.2 蛋白沉淀剂的选择

以往直接法测定均采用偏磷酸及其盐类作为蛋白沉淀剂. 其组成为: 1.67%偏磷酸(钠), 0.05%EDTA 和28%NaCl, 配制相当麻烦, 同时沉淀蛋白效果并不理想. 我们改用

0.61mol/L 的 TCA 作蛋白沉淀剂, 该试剂配制方便, 且沉淀蛋白效果极好, 加入该试剂后离心, 即可获得清亮的无蛋白滤液。

2.3 最佳 pH 的选择

由本方法基本反应原理可知, 5-硫代-2-硝基苯甲酸阴离子的显色与整个反应体系中 $[H^+]$ 密切相关。由于 TCA 蛋白沉淀剂为强酸, 它的加入使反应体系中 $[H^+]$ 大量增加, 致使反应平衡左移, 阴离子显色不佳。为了找到最适 pH, 我们按照表1的测定管操作, 只是改变 4mol/L NaOH 的加入量, 由图2可知, 随着 pH 不断提高, 423nm 处吸光度值也不断上升, 并在 pH6.4—6.6 间出现一个高台, 然后再下降。据此, 我们选择 pH6.5 为反应体系的最佳 pH 值。

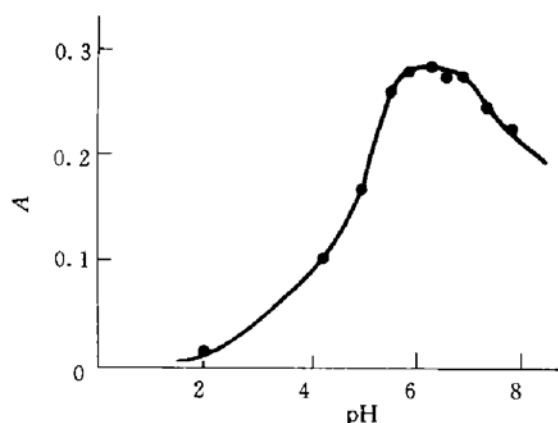


图2 pH 值和吸光度关系曲线

2.4 样本保存时间

同一小鼠血标本分成6份, 每份100 μ l, 一份当天测定, 其余-20 $^{\circ}$ C速冻保存, 并分别于速冻后1, 2, 3, 4, 5d 测定。测定时将速冻样品自然解冻后制备成1:100溶血液, 分8管重复测定。结果见表2。表2显示酶活力随冻存时间延长而下降。统计结果表明第1, 2, 3, 4天间的酶活力均值均无显著差异 ($P>0.05$), 其余各值间均存在显著或极显著差异 ($P<0.05$, $P<0.01$)。所以 GSH-PX 活力测定最好当天完成, 若不能及时测定, 可置冰箱-20 $^{\circ}$ C 保存, 并于3d 内测定完毕。

表2 不同保存时间样品酶活力比较

($\bar{x} \pm s$)

时间	n	酶活力单位数
第1天	8	2.0047 $\pm$ 0.0648
第2天	8	1.9959 $\pm$ 0.0635
第3天	8	2.0393 $\pm$ 0.0578
第4天	8	2.0960 $\pm$ 0.0929
第5天	8	1.7396 $\pm$ 0.0789
第6天	8	1.4961 $\pm$ 0.0592

2.5 比色时间的选择

5-硫代-2-硝基苯甲酸阴离子的显色不仅与反应体系中的氢离子浓度有关, 还受反应时间的限制。按表1样品空白管和样品测定管操作, 自加入 DTNB 显色液混匀后1min 起, 每隔1min 于423nm 处测一次 A 值, 结果见图3。11min 前, 反应液由无色逐渐转为浅黄色, A 值上升, 15min 后 A 值下降, 在11—15min 之间 A 值稳定不变。因此, 我们选择比色时间为加入显色剂后11min。

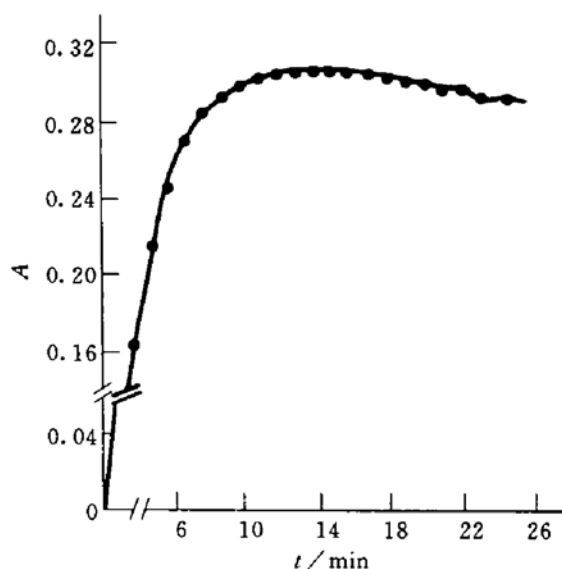


图3 反应时间与吸光度关系曲线

2.6 方法学的精密度

同一血样分成3份, 每份分8管, 分别按表1测定管加样操作后测定, 分3d 测完。由表3可知, 无论是批内还是批间, 测定的重复性均较好。

表3 方法学精密度实验

	<i>n</i>	$\bar{x}/U$	<i>s</i>	<i>CV</i> /%
批内变异	8	1.9958	0.0452	2.26
批间变异	3	2.0133	0.0624	3.10

2.7 两种测定方法的比较

目前国内用 DTNB 直接法测定全血中 GSH-PX 活力的方法有夏奕明, 张嘉麟等提出

表4 同一样品两种测定方法吸光度值比较

($\bar{x} \pm s$)

反应管	夏氏法 (<i>A</i>)	本法 (<i>A</i>)
离心上清液 (280nm)	0.161 ± 0.003	0.008 ± 0.0002
非酶反应管 (423nm)	0.371 ± 0.02	0.366 ± 0.01
样品测定管 (423nm)	0.424 ± 0.02	0.314 ± 0.007
试剂空白管 (423nm)	0.230 ± 0.01	0.039 ± 0.004

的改良法. 我们采用夏氏法作对照对同一血样进行测定, 操作按表1进行. 分别于280nm,

423nm 处比较各反应管的 *A* 值, 两种方法均重复测定5次. 由表4可知, 用本法离心后上清液280nm 处 *A* 值远低于夏氏法, 显然用 TCA 作沉淀剂作用比较完全. 本法样品测定管423nm 处 *A* 值略低于夏氏法, 但计算时需将样品测定管 *A* 值减去试剂空白管 *A* 值. 其差值以本法为高. 很明显, 本法的灵敏度优于夏氏法.

参 考 文 献

- 1 Mills G C. J Biol Chem, 1959; **234**: 502
- 2 Rotruck J T. Science, 1973; **179**: 588
- 3 Lawrence R A. Biochem Biophys Res Commun, 1976; **71**: 952
- 4 Hafeman D G, Sunde R A, Horfadyts W G. J Nutr, 1974; **104**: 580
- 5 夏奕明, 郭莲珍. 卫生研究, 1987; **16** (4): 29
- 6 张嘉麟, 方允中. 中华医学检验杂志, 1985; **8**: 199
- 7 Paglia D E, Valentine W N. J Lab Clin Med, 1967; **70**: 158

促甲状腺激素抗血清的研制

周 棱

(中国原子能科学研究院, 北京 102413)

摘要 用较少的抗原量免疫绵羊, 采用活体采血法, 定期加强免疫, 定期补铁, 定期采血, 获得抗人促甲状腺激素 (TSH) 抗血清. 采用放免分析方法鉴定抗血清, 结果为: 抗血清滴度为28—205万, 与促卵泡激素、促绒毛膜生长激素、促黄体生成素交叉都小于0.02%, 亲和常数 *K* 大于 10^{10} L/mol.

关键词 促甲状腺激素 (TSH), 抗血清, 放射免疫分析

1 实验方法

TSH (促甲状腺激素) 澳大利亚进口. 福氏佐剂 (中国原子能科学研究院), 右旋糖苷铁注射液 (上海第一制药厂).

1.1 免疫原的制备

取200μl TSH (1μg/μl) 加入去活卡介苗200μl (75mg/ml) 及适量生理盐水, 与等量福

氏佐剂混合乳化, 制成免疫原.

1.2 免疫过程

选年轻健壮绵羊两只, 背部皮内多点注射免疫原2ml, 同时注射双百疫苗0.5ml. 半月后加强, 剂量减半. 以后每月加强一次, 加强后10d颈动脉采血测滴度. 3个半月后滴度达

It has been reported that angiotensin I (A I) has antioioid effect. However, the mechanism of this action is still not understood. To evaluate a possible interaction on c-fos protooncogene expression between A I and DPDPE (δ receptor agonist) or NDAP (κ receptor agonist), the changing patterns of Fos protein in rat brain (less cortex and cerebellum) tissue induced by them were determined by immunoprecipitation. The results indicated that A I at $0.1 \mu\text{mol/L}$ markedly evoked the Fos protein expression in brain tissue. Meanwhile, both DPDPE ($0.1 \mu\text{mol/L}$) and NDAP ($0.1 \mu\text{mol/L}$) could induce Fos protein increase in brain although their effects were less than that induced by A I. The levels of Fos protein expression by A I plus DPDPE or NDAP are lower than that induced by A I individually. It is suggested that the action on c-fos expression between A I and opioids is antagonistic. And opioids may weaken the evoked action of A I on c-fos expression in the brain.

Key words Fos protein, brain, angiotensin I, opioids

Determination and Analysis of Pig Brain Gangliosides. Pan Ying, Huang Rubin, Wang Zesheng, Tong Dashan, Shi Xiaoling. (Department of Biochemistry, Capital Institute of Medicine, Beijing 100054). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; 21 (4): 353—355
Gangliosides are one of the glycosylceramides, which are particularly abundant in the central nervous system of vertebrates. The content and components of pig brain Gls were detected. There were 0.0894% (W/W) Gls presented in the pig brain. It was about 0.39% (W/W) of total lipid. The main components were GM1, GD3, GD1a, GD1b and

GT1b. GM1 and GD1a of the pig brain were higher than that of human brain.

Key words gangliosides (Gls), pig brain, determination of content

Subtyping of the Gc System by Immobilized pH Gradients Isoelectrofocusing. Guo Yaojun, Guo Qiang, Huang Lili, Yu Zhongyi. (Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; 21 (4): 356—359

The distribution of Gc subtypes of 201 unrelated, healthy donors in the Han population in Beijing were investigated. Gc^{1F} is 0.3698, Gc^{1S} , 0.2812, Gc^2 , 0.3490. There was good agreement between the observed and the expected value. ($\Sigma x^2 = 1.057$, $P > 0.70$).

Key words immobilized pH gradients, isoelectrofocusing, Gc subtypes of human serum, immunofixation

Determination of Globin Gene Expression by RNase Protection Assay. Liu Qinghui, Liu Depei, Liang Zhiquan. (Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; 21 (4): 359—362

Quantitative analysis of mRNA is an important technique in the study of gene expression regulation. RNase protection assay shows higher sensitivity and easier operation than Dot blot and Northern blot. The expressions of human β E-globin gene and mouse α -globin gene in transgenic mice were successfully analyzed by RNase protection assay.

Key words RNase protection, globin gene, transgenic mice

Direct Micro Determination of Glutathione Peroxidase Activity in Mice Blood. Rong

Zhengxing, Liu Huizhong, Bao Jingqi, Chen Hongzhan, Sun Yuyan, Sun Chen. (*Department of Pharmacology, Shanghai 2nd Medical University, Shanghai 200025*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; 21 (4): 362—366

A direct micro determination of glutathione peroxidase (GSH-PX) activity with spectrophotometry was developed. Conditions of the assay were studied in detail. 10 μ l blood sample was diluted with distilled water and treated with 10% TCA to remove protein. There was a good linearity between DTNB product and concentration of GSH after 3 minutes enzymatic reaction at the temperature of 37°C in pH 6.5 solution. The method had higher sensitivity, better reproducibility. It may become useful tool for analyzing GSH-PX in scientific research and clinical work.

Key words glutathione peroxidase (GSH-PX), spectrophotometry, assay

Production of Specific Antisera to Thyroid-stimulating Hormone (TSH). Zhou Ling. (*Department of Isotope, China Institute of Atomic Energy, Beijing 102413*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; 21 (4): 366—368

Specific high titre antisera to TSH were raised in two sheeps injected with 100 μ g (booster injection, 50 μ g) highly purified TSH preparation by the multi-site intradermal immunization technique. Blood were bled at two week intervals by cardiac puncture without killing the animals and solution of anti-anemia drug was given to sheeps after each letting blood. The antisera were monitored by TSH RIA Kit. Titres were range from 28×10^4 to 205×10^4 and no cross-reaction occurred between TSH antisera and human LH, FSH, HCG and all antisera have the avidity more than 10^{10} L/mol.

Key words TSH, antiserum, RIA

Experimental Research on Naked DNA Gene Therapy of Parkinson's Disease. Cao Lei, Zheng Zhongcheng, Liu Xinyuan, Liu Zhen-guo, Zhao Yingchun, Chen Shengdi, Jiang Zhihua, Zhou Changfu. (*Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; 21 (4): 369, 289

In vivo naked DNA gene transfer method was used in gene therapy of Parkinson's disease (PD). The complex of rat tyrosine hydroxylase (TH) expression plasmid and Lipofectin was injected stereotactically into striatum of PD rat model. The asymmetric rotational behavior was reduced substantially and quickly. On the third day after injection, drug-induced rotation decreased 50% compared with pretreatment scores. Immunohistochemical staining showed TH-positive nerve cells in striatum of injection side, which indicated that TH gene was uptaken and expressed by nerve cells. These preliminary results have general implications for the application of naked DNA transfer technique in gene therapy of human neurological disease and specific implications for PD.

Key words Parkinson's disease, gene therapy, tyrosine hydroxylase

Production of TSH-Free Thyroid Stimulating Hormone Serum. Zhou Ling. (*Department of Isotope, China Institute of Atomic Energy, Beijing 102413*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; 21 (4): 370—371

Using affinity chromatography to eliminate TSH from normal human serum. Preliminary treatment to TSH with 33% saturated ammonium sulfate were coupled to agarose in alkaline condition and packed in column (1.2cm $\times$