

法测定卵泡 DNA 含量, 目前仅见测定腔前卵泡 DNA 的报道^[6]. 我们在此基础上发展了完整小腔卵泡 DNA 含量的荧光分析法, 可以测定 5 ng 的 DNA, 这在卵泡生长发育的研究中具有重要应用价值.

参 考 文 献

- 1 West D C, Sattar A, Kumar S. A simplified in situ solubilization procedure for the determination of DNA and cell number in tissue cultured mammalian cells. *Anal Biochem*, 1985, **147** (2): 289~295
- 2 Downs T R, Wilfinger W W. Fluorometric quantification of DNA in cells and tissue. *Anal Biochem*, 1983, **131** (2): 538~547
- 3 Wilkins R J, Kearney J T. Fluorometric assay for DNA deposited on filters. *Anal Biochem*, 1984, **136** (2): 301~308
- 4 Roy S K, Greenwald G S. Quantitative analysis of *in vitro* incorporation of (³H) thymidine into hamster follicles during the oestrous cycle. *J Reprod Fertil* 1986, **77** (1): 143~152
- 5 Hafez E S E. *Reproduction in farm animals*. 5th. Philadelphia: LEA & FEBIGER, 1987, 616
- 6 Nuttinck F, Mermillod P, Massip A, *et al.* Characterization of

in vitro growth of bovine preantral ovarian follicles: a preliminary study. *Theriogenology*, 1993, **39** (4): 811~821

Fluorometric Assay for DNA in Goat Small Antral Follicles. LI Jian, KANG Jin-Quan, ZHOU Le, WANG Jian-Chen (*Department of Veterinary Sciences, North West Agricultural University, Yangling, Shaanxi 712100, China*).

Abstract Intact goat small antral follicles were dissected from ovaries by a micro-surgical method. The follicular DNA content was estimated by a fluorometric method using the fluorochrome, 4, 6-diamidino-2-phenylindole-2HCl (DAPI). Significant positive correlations were found between the follicular diameters and follicular DNA contents in follicles smaller than 3 mm ($r = 0.9824 > 0.7800 = r_{0.001}$, $n = 12$). It suggested that this method of DNA assay would have great application value in study on follicular growth and development.

Key words fluorometry, DNA, follicle, goat

液泡膜 H^+ -ATPase 质子泵活性的荧光测定*

王 欢 祝雄伟 王延枝¹⁾

(武汉大学生命科学院, 武汉 430072)

摘要 使用荧光猝灭法测定植物液泡膜 H^+ -ATPase 质子转运活性. 比较了两种常用荧光染料吖啶橙和喹亚因在不同浓度的测定灵敏度. 探讨了不同蛋白量和缓冲系统对测定结果的影响. 得到了用 5 $\mu\text{mol/L}$ 吖啶橙, 200~250 μg 蛋白质含量, Hepes-Tris (pH 7.0) 为缓冲介质, ATP-Na 为底物的最适体系.

关键词 液泡膜, H^+ -ATPase, 泵活性, 荧光猝灭法

学科分类号 Q73.035

植物液泡膜 H^+ -ATPase 在植物细胞内离子平衡的调节中具有重要作用^[1]. 用荧光猝灭法^[2]测定质子泵活性灵敏而快捷. 常用于测定液泡膜 H^+ -ATPase 泵活性的荧光染料有吖啶橙 (acridine orange)^[3,4] 和喹亚因 (quinacrine)^[5] 等.

一般来说, 植物材料的 V 型 H^+ -ATPase 活性较低, 测定其泵活性的难度大. 我们对两种荧光染料和不同测定体系进行比较研究后, 筛选出一种灵敏度高、方便可行的泵活性测定方法. 测定效果较以前有较大提高, 且结果稳定, 与国外的测定水平^[3~6] 相当或更好.

1 材料与方法

1.1 试剂

BTP (1, 3-bis [tris (hydroxymethyl) methylamino] propane), 山梨醇 (sorbitol), 吖啶橙 (acridine orange), 喹亚因 (quinacrine), 短杆菌肽 D (gramicidine) 为 Sigma 公司产品, ATP 钠盐为 Serva 公司产品, 其他试剂均为国产分析纯.

* 国家自然科学基金资助项目 (39570434).

¹⁾ 通讯联系人.

收稿日期: 1998-01-07, 修回日期: 1998-07-13

1.2 液泡膜微囊的制备

大豆发芽 3~4 d, 取中间下胚轴的一段, 按文献 [3] 制备液泡膜微囊并略做改进: 即以 8%、25% 和 40% (质量比) 不连续蔗糖密度梯度代替 6% 和 12% 葡聚糖梯度. 小心收集 8%~25% 界面组分.

1.3 质子转运活性的测定

用荧光猝灭法测定膜微囊上质子泵的活性. 2 ml 反应体系中含 33 mmol/L Hepes-Tris 或 Hepes-BTP, pH 7.0, 50 mmol/L KCl, 166 mmol/L 山梨醇, 0.33 mmol/L EGTA 和 1.5 mmol/L ATP, 加入膜微囊制剂 (蛋白质含量为 200~250 μg) 后于 22 $^{\circ}\text{C}$ 保温 4 min, 再加入浓度为 1 mol/L 的 MgCl_2 10 μl 启动反应. 若以 ATP 启动反应时则先加入 MgCl_2 . 用日立 4010 荧光分光光度计测定荧光猝灭. 酶活性用每分钟猝灭百分比表示. 吡啶橙激发波长 495 nm, 发射波长 530 nm; 喹亚因激发波长 430 nm, 发射波长 500 nm. 测定温度均为 22 $^{\circ}\text{C}$. 反应 4 min 后加入 5 $\mu\text{mol/L}$ 短菌杆肽 D, 破坏质子跨膜梯度, 荧光恢复表明荧光猝灭是由于质子跨膜转运造成的.

1.4 蛋白质含量的测定

采用 Lowry 法^[7], 以牛血清白蛋白 (BSA) 作标准, 体系含 1% SDS.

2 结果与讨论

2.1 最适荧光染料浓度的选择

用 250 μg 酶制剂在相同的反应条件下, 分别加入两种不同浓度的荧光染料, 计算反应的初速度 (%) 和 4 min 内的最大猝灭 (%), 结果见表 1.

表 1 两种不同浓度的荧光染料对测定结果的影响

$c/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	初速度 / %	最大荧光猝灭 / %
吡啶橙		
0.5	11.95	28.29
1.0	20.96	31.59
2.5	40.05	36.55
5.0	44.70	40.70
10.0	37.98	39.21
喹亚因		
2.0	30.25	36.82
5.0	27.74	31.64
10.0	17.07	27.83
20.0	10.64	18.83
30.0	7.86	11.49

其相对荧光强度与时间的关系如图 1 和图 2.

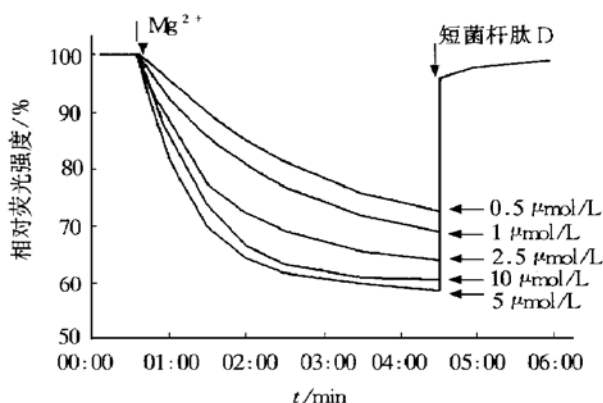


图 1 不同吡啶橙浓度的测定结果

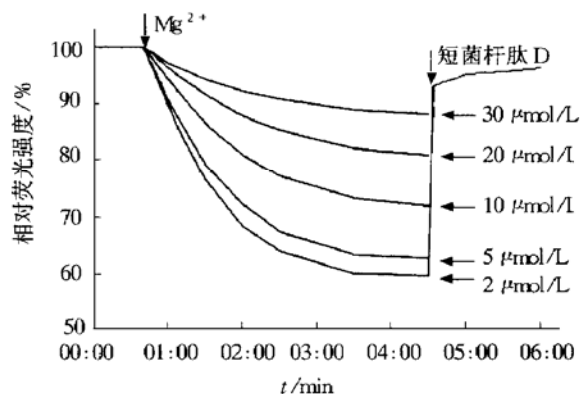


图 2 不同喹亚因浓度的测定结果

从表 1 可以看到, 随着浓度的增大, 吡啶橙所测得的泵反应初速度和最大猝灭都增加. 但到 10 $\mu\text{mol/L}$ 时, 这两个指标都下降, 所以该测试系统中吡啶橙的最适浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$. 而喹亚因测得的泵反应初速度和最大猝灭随浓度的增加而减小. 同样浓度时, 吡啶橙比喹亚因的荧光强度高. 一般而言, 荧光强度高, 变化则显著, 结果更可靠.

综合以上结果, 在测大豆液泡膜 H^+ -ATPase 泵活性时, 用吡啶橙不仅测得的初速度大, 而且最大猝灭也大. 因此后续实验采用 5 $\mu\text{mol/L}$ 吡啶橙作为监测质子转运的探针.

2.2 探针/蛋白量比对荧光猝灭的影响

在 5 $\mu\text{mol/L}$ 吡啶橙的测定体系中加入不同量的酶制剂, 测得的 4 min 最大猝灭与蛋白量的关系如图 3.

从图 3 可见, 在 250 μg 蛋白范围内, 最大猝灭与蛋白量基本呈线性关系. 超过这一范围后, 最大猝灭增加缓慢. 因此我们一般使用 200~250 μg 的蛋白量, 这样既减少蛋白用量, 又可观测到显著的猝灭现象.

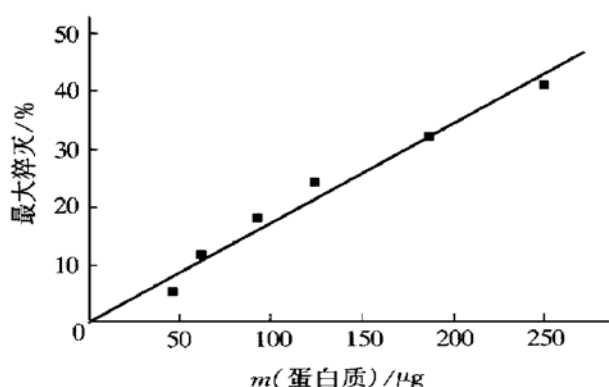


图3 探针/蛋白比对荧光猝灭的影响

2.3 缓冲介质组成对荧光猝灭的影响

有报道指出,在测定液泡膜 H^+ -ATPase 活性的体系中,Tris 的存在对 ATPase 水解活性的测定有影响^[8,9],所以广泛使用的缓冲剂是 BTP. 由于目前 BTP 价格较贵,我们希望用 Tris 代替 BTP,故在不同条件下对 BTP 和 Tris 两种体系进行了比较,探讨了 Tris 替换 BTP 的可行性. 为此比较了两种缓冲体系和三种 ATP (ATP 钠盐,经阳离子交换、分别用 Tris 和 BTP 平衡至中性的 ATP) 组合后测出的初速度和最大猝灭. 其结果如表 2.

表2 缓冲介质组成对荧光猝灭的影响

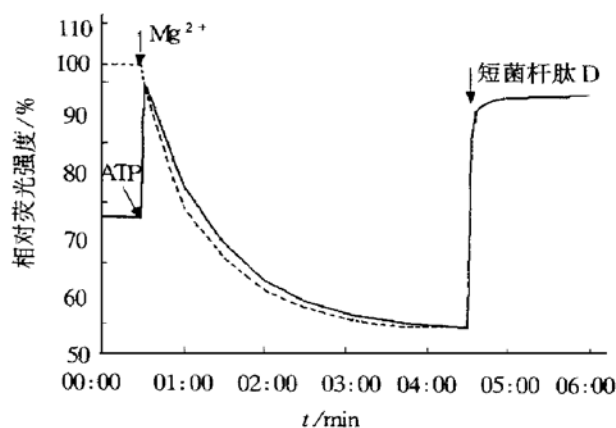
	Hepes-Tris		Hepes-BTP	
	初速度 / %	最大荧光猝灭 / %	初速度 / %	最大荧光猝灭 / %
ATP-BTP	32.90	33.30	28.64	36.49
ATP-Tris	36.73	32.48	29.10	37.11
ATP-Na	44.70	40.70	42.98	39.89

从表 2 中可以看到:用本体系测定大豆液泡膜 H^+ -ATPase 泵活性时,Hepes-Tris 和 Hepes-BTP 的测定结果相差不大,ATP-Tris 和 ATP-BTP 的结果相近,显然 Tris 的干扰不明显,因此在此体系中 Tris 可以代替 BTP. 另外,虽然 ATP-Tris 和 ATP-BTP 效果差不多,但 Na^+ 的存在可使初速度和最大猝灭高于 ATP-Tris 和 ATP-BTP,其原因尚不清楚.

2.4 Mg^{2+} 启动与 ATP 启动的差异

由于 Mg^{2+} 和 ATPase 都是 H^+ -ATPase 的活性所必需,所以可以用其中任何一个启动反应,而另一个预先加入保温. 通常测定泵活性时以 Mg^{2+} 启动,但在含有 Mg^{2+} 的脂酶体上测定泵活性时只能用 ATP 启动反应. 所以我们在膜微囊水平比较了

Mg^{2+} 启动与 ATP 启动的差异. 其特征时间谱线如图 4.

图4 Mg^{2+} 启动与 ATP 启动的特征时间谱线

—: ATP; - - -: $MgCl_2$.

ATP 启动时加入 ATP 前后荧光强度发生明显变化. 带正电荷的 Mg^{2+} 能少量结合吖啶橙,对吖啶橙荧光有一定猝灭. 但由于质子与吖啶橙更易结合,在产生质子后,吖啶橙荧光猝灭主要由质子产生. 而对 Mg^{2+} 启动而言,启动时的短暂的高 Mg^{2+} 浓度 (1 mol/L) 对吖啶橙荧光有猝灭作用,所以 Mg^{2+} 启动的反应初速度较大;而两种方法启动的反应最大猝灭相近;加入等量酶的特异性抑制剂 NO_3^- 后,计算出的抑制率也相近 (结果未列出). 这说明两种方法在它们各自的体系中进行数据处理时是等效的. 如果使用同一方法,其相对结果具有可比性.

上述结果表明:用荧光法测定植物液泡膜 H^+ -ATPase 质子泵活性时,用吖啶橙作荧光染料,其最适条件是:5 μ mol/L 吖啶橙;200~250 μ g 的蛋白量;Hepes-Tris 或 Hepes-BTP 缓冲体系;就大豆膜微囊而言,ATP-Na 效果较好;而用 ATP 或 Mg^{2+} 启动反应均是可行的.

致谢 本工作在中国科学院生物物理研究所生物大分子国家重点实验室完成,并感谢黄有国教授对本文的仔细审阅.

参 考 文 献

- 1 王延枝,许献忠 (Wang Y Z, Xu X Z). 空泡型 H^+ -ATPase 的研究进展. 生物化学与生物物理进展 (Progress in Biochemistry and Biophysics), 1993, 20 (1): 19~23
- 2 Adelesberg J V, Barasch J, Al-Awqati Q. Measurement of pH of intracellular compartments in living cells by fluorescent dyes.

- Methods in Enzymology, 1989, **172**: 85~ 95
- 3 Ward J M, Sze H. Proton transport activity of the purified vacuolar H^+ -ATPase from oats. *Plant Physiol*, 1992, **99** (3): 925~ 931
 - 4 Chi Meng, Lu Hui, Rong Long. Inhibition of tonoplast ATPase from etiolated mung bean seedlings by S -isothiocyanate. *Biochem J*, 1992, **285** (3): 737~ 743
 - 5 Müller M L, Irkens-Kiesecker U, Rubinstein B, *et al.* On the mechanism of hyperacidification in Lemon. *J Biol Chem*, 1996, **271** (4): 1916~ 1924
 - 6 Ward J M, Reinders A, Sze H. Dissociation and reassembly of the vacuolar H^+ -ATPase complex from oats roots. *Plant Physiol*, 1992, **99** (1): 161~ 169
 - 7 Lowry O H. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, **226** (1): 193~ 265
 - 8 Michael G P. An H^+ -ATPase assay: proton pumping and ATPase activity determined simultaneously in the same sample. *Plant Physiol*, 1990, **94** (3): 882~ 886
 - 9 Good N E, Winget G D, Winter W, *et al.* Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochemistry*, 1966, **5** (2): 467~ 477

Fluorescence Measurement of Proton Pumping of Tonoplast H^+ -ATPase. WANG Huan, ZHU Xiong-Wei, WANG Yan-Zhi (*School of Life Science, Wuhan University, Wuhan 430072, China*).

Abstract Fluorescence quenching method was to measure the proton pumping activity of tonoplast H^+ -ATPase from higher plants. The sensitivity of two common fluorescent dyes was compared. Acridine orange is better than quinacrine with the initial slope and maximum quenching. The optimum for the fluorescence measurement of acridine orange dye were: 5 μ mol/L acridine orange, 200 ~ 250 μ g protein, Hepes-Tris or Hepes-BTP (pH 7.0). Initiating with ATP or Mg^{2+} was both valid.

Key words tonoplast membrane, H^+ -ATPase, pump activity, fluorescence quenching method

一种 PCR 产物克隆的新方法——T-A 克隆法

李新波 赵小松 田德志 朱依纯 姚 泰

(上海医科大学生理学教研室, 上海 200032)

摘要 介绍一种 PCR 产物克隆的新方法——T-A 克隆法。用改良碱裂解法抽提 pBluescript SK (+) 质粒, 用 *EcoRV* 将 pBluescript SK (+) 质粒切成平端, 利用 Taq DNA 聚合酶及 dTTP 制备 pBluescript SK (+) T-A 载体。将 β -actin cDNA 片段克隆入自制的 pBluescript SK (+) T-A 载体, 经 *EcoRI* 及 *HindIII* 双酶切得到与设定长度一致的 β -actin cDNA 片段。

关键词 T-A 克隆载体, PCR 产物, β -actin

学科分类号 Q782

对 PCR 产物进行克隆是分子生物学领域以及基因工程领域里常用的方法。以前对 PCR 产物进行克隆实验, 采用的方案有以下几种: 一是将 PCR 产物切成两端平齐的双链 DNA, 然后克隆到切成平端的质粒载体上, 或在 PCR 产物的两端加上人工接头 (linker), 经限制性内切酶处理后, 克隆到质粒载体的相应位点上; 二是在设计 PCR 引物时, 使 PCR 引物的 5' 端含有可切成粘性末端的限制性内切酶酶切位点的识别序列, 在 PCR 反应结束时, 将 PCR 产物再用相应的限制性内切酶进行处理, 以便于克隆到含相应限制性内切酶酶切位点的质粒载体上。这两种方法虽然有效, 但均较繁琐。

本实验的目的在于利用 pBluescript SK (+) 质粒、Taq DNA 聚合酶及 dTTP 自制 T-A 克隆载

体, 对从 RT-PCR 中得到的 β -actin cDNA 片段进行克隆。

1 材料与方法

1.1 试剂

Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、*EcoRV*、*EcoRI*、*HindIII* 等限制性内切酶及 X-gal、异丙基硫代- β -D-半乳糖苷 (IPTG)、PCR 扩增 β -actin 片段所用试剂等来自 Promega 公司, 质粒载体用 pBluescript SK (+), 来源于中国科学院细胞生物研究所, 琼脂糖由 Sigma 公司进口分装, 柱离心式胶回收试剂盒来源于 Qiagen 公司, 扩增 β -actin