

经验交流

无氧状态下产生的活性自由基中间体的 ESR 检测

杨正红 庄志雄* 高梅 王敏**

(天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京医科大学, 北京 100083)

关键词 ESR, 电子自旋共振, 无氧装置, 自由基

在药物及有害物质的自由基代谢机理研究中, 经常需要弄清生物体系反应的引发或中间过程, 而避免氧气进入反应体系进一步作用是观察反应中间产物的必要条件。酶及其自由基代谢过程的电子自旋共振 (ESR) 研究通常采用两种技术, 即连续流动法和低温冷冻法^[1,2], 但前者消耗样品量过大, 而后者可能造成冷冻前后的顺磁物质的变化, 并且不能用于有机自由基代谢的研究^[3]。本文自行设计的一套无氧装置与 BRUKER ESP 300 电子自旋共振仪的谐振腔相连, 可以克服上述困难, 实现在无氧状态下对细胞器、酶与药物作用的中间体的常温观察。

实验装置与方法

1. 实验装置

整套无氧系统如图 1 所示, 整个反应系统置于氮气中, 在氮气的进出口处均装有脱氧瓶, 必要时在脱

氧瓶与反应瓶之间加装缓冲瓶。脱氧溶液为溶于 0.1 mol/L 氢氧化钠的 0.05% 葱醌-2-磺酸盐及 5% 的连二亚硫酸钠。

2. 实验步骤与结果

孵育液根据需要由药物、辅酶等渗液及缓冲液组成, 总量约 3ml, 置于用橡皮盖密封的 10ml 反应瓶中, 预先用经脱氧液处理的高纯氮通气 5min, 以去除孵育液和反应瓶中残留的氧气。反应瓶的出口与谐振腔内的石英毛细管相通。然后用注射器向反应瓶内注射线粒体或微粒体混悬液, 继续通入氮气 2min, 药物与细胞器或亚细胞器的反应即已启动。将反应瓶倒置, 即可使孵育液通过系统在氮气压力下进入石英毛细管。此时, 波谱仪即可记录出中间产物自由基的 ESR 谱图。

讨 论

由于在严格的无氧状态下细胞器或亚细胞器与药物作用的产物失去了继续反应的条件, 就使得原来在常温大气中表现为瞬态自由基的中间产物的寿命延长 100ms—10min。这样除了可以进行流动观测外, 还可以使溶液停流进行动力学观察。由于 ESP 300 型电子自旋共振仪采用电子计算机控制扫描, 具有较高的灵敏度, 弥补了因毛细管中样品量较少导致的信噪比较低的缺陷。

与 Mason^[3] 的无氧系统比较, 本方法具有同样的灵敏度, 并且比用扁平池或混合池装置简单, 操作方便, 测量迅速, 成本低, 易于密封, 易于调节, 是一种较理想的替代手段。

本室利用这种方法成功地观察到大鼠肝脏和晶状

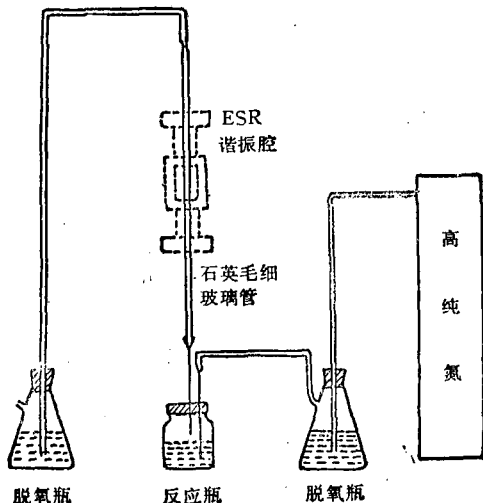


图 1 自制的无氧系统装置示意图

* 现在中山医科大学。

** 北京医科大学生物化学教研室。

介绍一种新的半干式免疫转渍法

李永兴 胡长征 王继文 李久蒂

(中国科学院植物研究所, 北京 100044)

关键词 电转渍, 抗体, 显色剂

蛋白质免疫转渍法 (Western blotting) 是十年发展起来的一种生化新技术^[1-3]。其原理是用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离待分析的蛋白质样品, 然后用转渍装置把蛋白质转移到硝酸纤维素膜 (NC 膜) 上, 再利用免疫检测法检出要分析的蛋白质区带。过去报道的大多是利用液相夹心式电转渍仪完成转渍的, 这种转渍法的缺点是转渍时间长, 缓冲液用量大, 转渍过程中要采取冷却措施。为克服这些缺点, 近年来又发展了一种半干式电转渍装置^[4,5]。这种新型的电转渍仪由两个板电极组成, 板电极由石墨板或涂铂金的钛板做成。板电极之间形成高强度的电场, 产生均一的强电流, 因此转渍效率高, 可以在 15min 到 2h 内完成转渍, 而且只需少量电极缓冲液, 不需要冷却措施。本文主要介绍这种半干式免疫转渍法。

材料与方 法

半干式电转渍仪 北京科普仪器厂生产的 KP-34 型电转渍槽^[4], 槽体由上下两块石墨板电极组成, 槽盖为阴极, 槽底为阳极。板电极之间由正负电极缓冲液浸透的 6 层滤纸作为离子库, 电泳胶和硝酸纤维素膜夹在滤纸之间。转渍过程由于电极与滤纸之间紧贴, 横过胶的电场强度是最大的, 因此转渍效率高, 特别是对大分子量的分子转渍效率增加。电源部分我们采用植物所生产的低电压高电流电泳脱色仪 (一般的电泳电源不适用)。

试剂

1. 转渍缓冲液 阳极缓冲液 I: 0.3 mol/L Tris,

20% 甲醇, 阳极缓冲液 II: 0.025 mol/L Tris, 20% 甲醇。阴极缓冲液: 0.04 mol/L 甘氨酸, 0.5 mmol/L Tris, 20% 甲醇。

2. 免疫检测缓冲液 TBS: 0.02 mol/L Tris, 0.5 mol/L NaCl 用 1 mol/L HCl 调至 7.5。TTBS: 0.2 ml Tween 20 溶于 400 ml TBS 中。封闭液: 0.5g 干酪素溶于 100 ml TBS。第一抗体溶液: 7 μ l 特异性抗血清 (例如抗固氮酶铁蛋白抗体) 溶于 10 ml 封闭液中。第二抗体溶液: 偶联过氧化物酶的羊抗兔 IgG 抗血清 10 μ l (北京生物制品所生产) 溶于 10 ml 封闭液中。显色液: 二氨基联苯胺 (3,3'-diamino benzidine) 2.5mg 溶于 10 ml TBS, 搅拌过夜。临用前加 5 μ l 30% H_2O_2 , 显色。

电泳及样品制备 吸取 5ml 菌液迅速用玻璃纤维滤纸 (Whatman GF/C 直径 4.25 cm Millipore 公司产品) 在磨砂玻璃漏斗上抽滤。立即把滤纸片投入液氮中固定, 然后滤纸在 100 $^{\circ}$ C SDS 样品缓冲液中加热 3min, 以裂解菌体。10000r/min 离心, 取上清液进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。SDS 电泳按 Laemmli 法操作^[6]。

半干式电转渍操作 用阳极缓冲液 I 浸透两张 (滤纸大小与电泳胶相同) 滤纸 (滤纸 I), 平铺于阳极石墨板上。取两张用阳极缓冲液 II 浸透的滤纸 (滤纸 II), 平铺于滤纸 I 上。取一张硝酸纤维素膜 (Cole-Parmer 公司产品。带手套用清洁的剪刀和镊子操作。硝酸纤维素膜的大小可根据需要剪裁。) 用阳极缓冲液浸透, (在转渍前 1h 进行) 平铺于滤纸 II 上。将电泳后的聚

体中的线粒体或微粒体与 2,4,6-三硝基甲苯 (TNT) 和 NADPH 作用产生的 TNT 自由基中间体。

该方法不仅能进行细胞、细胞器与药物作用的研究, 还能用于毒理学和有机反应动力学观察, 以及厌氧菌活动的研究。

参 考 文 献

1 Swartz HM 著, 《电子自旋共振的生物学应用》翻译组

译。电子自旋共振的生物学应用, 北京: 科学出版社, 1978: 118—123, 452—456

2 任建平等。见: 第二届全国自由基生物学及自由基医学学术会议论文摘要汇编, 重庆, 1989: 52

3 Mason RP. In: *Methods in enzymology*. Vol. 105, New York: Academic Press, 1985: 416—422

[本文于 1990 年 3 月 19 日收到,

6 月 14 日修回]