

术,可以对各种畸形染色体进行定量识别研究。

综上所述可以看出,显微光度术不仅在定量测量方面,而且在光谱分析和剖面图分析的应用中也是一种很有价值的技术。

参 考 文 献

- [1] Piller, H.: *Microscope Photometry*, 1977. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.
- [2] 中国科学院数学研究所主编:《BASIC 语言常用算法程序汇编》,中国铁道出版社。

- [3] Mariano, A. et al.: *Introduction to Quantitative Cytochemistry I.* (Wied, G. L. et al. eds.), 1966, 215—239, Academic Press New York and London.
- [4] Orkin, S. H. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 98—102, 1975.
- [5] Wheelless, L. L. et al.: *Acta Cytol.*, 17, 333—339, 1973.
- [6] Mu-ming Poo: *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 10, 245—276, 1981.
- [7] Bailly, S. et al.: *Introduction to Quantitative Cytochemistry II.* (Wied, G. L. et al. eds.), 1970, 87—103, Academic Press, New York and London.

[本文于1983年10月17日收到]

人胎 γ -GT 的浓度梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳与等电聚焦电泳分析

吴祥祺 周德义 梁熙南 魏 琦

(广西医学院生化教研室, 南宁)

自 Hanes 描述 γ -谷氨酰转肽酶(γ -Glutamyl transpeptidase), 简称 γ -GT, E.C.(2, 3, 2, 2)以来, 许多作者对哺乳动物、特别是对人(包括病人)的血清和某些组织的 γ -GT 进行了大量研究^[1-3]。但除人胎肝外^[4], 肾、脾、胰、十二指肠和胆汁中 γ -GT, 迄今国内、外报道尚少。

本文比较了人胎肝、肾、脾、胰、十二指肠和胆汁匀浆中 γ -GT 比活力的强弱, 匀浆经 Triton X-100 处理、硫酸铵分级分离, 进行4—30% 浓度梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳和等电聚焦电泳比较各组织 γ -GT 的电泳行为和等电点。

一、材料与方 法

1. 样品收集 从妊娠3—8 月人工流产的40 个胎儿中采取肝、肾、脾、胰、十二指肠和胆汁, 将各胎儿相同组织分别混合, 贮存于-10℃, 三星期内应用。

2. 试剂与仪器 N-甲萘基盐酸二氨基乙烯(简称 NED·2HCl), Sigma 出品。电泳用高分子量标准蛋白, Pharmacia 产品。 γ -谷氨酰对

硝基苯胺, 进口分装。Ampholine (pH4—10)、Triton X-100 等试剂均为国产。梯度发生器和管状梯度凝胶制备装置自制。

3. 方法

(1) 总酶活力测定 根据 Tate 和 Meister 改良法^[6]。取底物 2ml (0.05mole/l Tris-HCl 缓冲液(pH8.0)、2.5mmole/l γ -谷氨酰对硝基苯胺、20mmole/l 双甘肽、75mmole/l NaCl)、酶样品 50 μ l, 37℃ 水浴保温 30 分钟后立即加入 1.5N 醋酸 2ml 终止反应。在 410nm 下测光密度, 求酶活力单位 (37℃ 下 1 分钟使底物转变为 1 μ mole 产物的酶量称为 1 个单位)。

(2) γ -GT 分级分离 分别在人胎肝、肾、脾、胰、十二指肠及胆汁中加入四倍体积 0.01 mole/l Tris-HCl 缓冲液 (pH8.0、含 1.5 mole/l NaCl), 组织捣碎机匀浆、过滤、滤液中加 1% Triton X-100, 4℃ 搅拌 3 小时, 20—70% 饱和度硫酸铵分级沉淀, 40,000 $\times$ g 离心 1 小时, 沉淀对 0.01mole/l Tris-HCl 缓冲液(pH8.0)透析。用透析后的液体进行各项试验。

(3) 分子量测定 参照 Kojima 等^[7]方法

加以改进。先利用特制的凝胶梯度发生器和管状浓度梯度凝胶制备装置制备4—30%聚丙烯酰胺凝胶,凝胶中含0.5% Triton X-100, 10℃、70V预电泳20分钟后加样、200V恒压电泳3—4小时。取待测样品和高分子量标准蛋白同时电泳、待测样品进行酶活力定位染色,标准蛋白用氨基黑10B染色,分别求 R_f 以确定待测样品的分子量^[7,8]。

(4) 酶活力定位染色 按 Selvaraj 和 Balasubramanian 方法^[9]。电泳完成后剥离出的凝胶浸入底物染色液[0.2 mmole/l Tris-HCl 缓冲液(pH8.3)、4mmole/l γ -谷氨酰对硝基苯胺、80 mmole/l 双甘肽、1g/l 亚硝酸钠、4g/l NED·2HCl, 用前新鲜配制]中, 37℃保温30分钟, 用0.05mole/l Tris-HCl 缓冲液(pH8.5)洗涤, 加入0.38mole/l 三氯醋酸, 在10℃放置数分钟即显紫红色区带。30分钟后移入0.2mole Tris溶液(pH9.7)中浸泡1小时, 以0.05mole/l Tris-HCl 缓冲液(pH8.5)洗涤至底色退尽, 贮于同样缓冲液中。

(5) 凝胶等电聚焦电泳 按管型凝胶等电聚焦法^[10]。制备6.5%聚丙烯酰胺凝胶(含1% Ampholine、pH4—10), 经等电聚焦电泳后, 将凝胶浸入0.2mole/l Tris-HCl 缓冲液(pH8.3)10—20分钟, 待凝胶中指示剂甲基红颜色消退即进行酶活力定位染色。另取同样已电泳的凝胶, 切成0.4cm长的薄片, 分别浸入2ml 重蒸蒸馏水(pH7.0)中, 17小时后测pH。

(6) 蛋白浓度测定 按 Lowry 法。

二、结果与讨论

1. 人胎肝、肾、脾、胰、十二指肠及胆汁中 γ -GT比活力(单位/mg蛋白质)强弱顺序为: 胆汁(0.1440)>肾(0.0564)>肝(0.0505)>胰(0.0197)>十二指肠(0.0130)>脾(0.0095), 可见彼此不同。Selvaraj^[4]等人报道人胎肝匀浆中 γ -GT比活力为0.096单位/mg蛋白质, 较本文为高, 这可能与胎儿年龄有关, 他们收集的是14—20星期人胎肝。我们收集的是3—8个月的胎儿。

2. 4—30% 浓度梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳

(1) 人胎组织 γ -GT具多型性 按前述方法进行 γ -GT电泳及酶活力定位染色, 从图1可见人胎各组织及胆汁都含 γ -GT, 且肝与胆汁的电泳谱极相似, 除脾外每种组织都有几条 γ -GT电泳区带。本结果支持人组织 γ -GT具多型性的观点^[5]。

L K S P D B

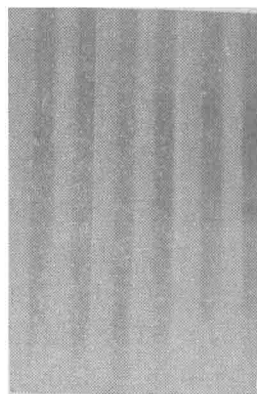


图1 4—30% 浓度梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

L——肝 K——肾 S——脾 P——胰
D——十二指肠 B——胆汁

近年来大多用聚丙烯酰胺凝胶盘电泳研究 γ -GT的电泳行为^[1], 也有用浓度梯度聚丙烯酰胺凝胶垂直板状电泳的^[11]。本文采用的是4—30%浓度梯度聚丙烯酰胺凝胶盘电泳。电泳后酶定位染色, 多数作者所用底物是 γ -谷氨酰 α

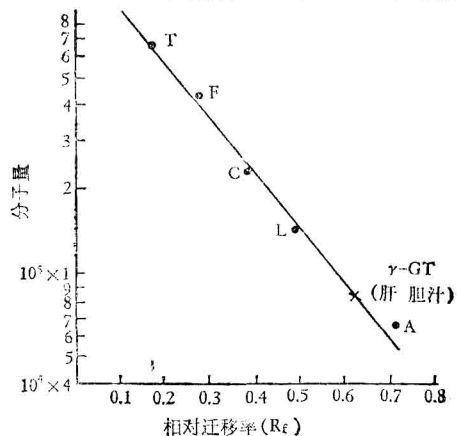


图2 标准蛋白分子量对相对迁移率曲线

(4—30% 浓度梯度聚丙烯酰胺凝胶,
内含0.5% TritonX-100)

T——甲状腺球蛋白 660,000 F——马脾铁蛋白 440,000
C——过氧化氢酶 232,000 L——乳酸脱氢酶 140,000
A——牛血清白蛋白 69,000

表 1 人胎五种组织及胆汁 γ -GT 的估计分子量

组织名称	分 子 量									
肝 脏	86,000		250,000							
肾 脏					430,000	490,000				880,000
脾 脏			245,000							
胰 脏					405,000			705,000		
十二指肠	90,000	122,000			405,000		600,000			880,000
胆 汁	86,000		215,000	328,000						

萘胺,以固酱紫显色。也有用含 $\text{NED} \cdot 2\text{HCl}$ 和 γ -谷氨酰对硝基苯胺的底物显色液^[4,9]。后者显色的酶活力区带较前者清晰。本文采用后者。

(2) 人胎组织 γ -GT 分子量的测定 分别求出 γ -GT 和标准蛋白在电泳凝胶上的相对迁移率(R_f)以标准蛋白分子量对数对 R_f 作图(图 2)。根据各种组织 γ -GT 的 R_f ,从曲线中查出相应的 γ -GT 分子量(表 1)。由表 1 可以看出,肝和胆汁中的 γ -GT 分子量最小(86,000),而肾和十二指肠中存在高分子量的组分(880,000)。

文献报道正常成人肝、肾、胰和胆汁的 γ -GT 分子量,在 9 万—12 万范围内^[1,3],也有的在 16 万左右^[5]。Echetebeu 和 Moss^[5] 报道用去垢剂纯化的人肝 γ -GT,除去脱氧胆酸后其分子量由 16 万变为 55 万,作者认为这是由于聚集作用的结果。我们测定的人胎肝、胆汁和十二指肠的小分子量 γ -GT 为 9 万左右,接近于正常成人肝 γ -GT 分子量。此外我们还观察到:①同一组织含有不同分子量的 γ -GT,且分子量间似呈一定倍数关系,也提示可能存在聚集作用;②各组织的 γ -GT 分子量存在一定差异,可能与组织特异性有关。然而,肝、胆汁和十二指肠存在相近小分子量 γ -GT,是否由于它们的发生学上存在同源关系值得考虑。

3. 凝胶等电聚焦电泳 每个样品分为两组

同时电泳后,一组测定凝胶各部分 pH,以 pH 对凝胶长度绘制凝胶各点 pH 分布曲线(非线性的),另一组 γ -GT 定位染色后测出各条酶区带的准确位置,再从曲线上找出相应 γ -GT 的等电点:肝脏 5.05;肾脏 6.02、6.77;脾脏 5.03;胰脏 5.15、5.85、6.10;十二指肠 4.92、5.35;胆汁 5.00、6.82、7.00。

尚未见文献报道人胎各组织 γ -GT 的等电点。本文测得人胎各组织 γ -GT 的等电点较文献报道^[2]的正常成人 γ -GT 等电点偏碱,其原因尚待探讨。

本室朱芳洪、朱其芳和唐秀莲同志参加部分工作。

参 考 文 献

- [1] Shaw, L. M. et al.: *Clin. Chem.*, **26**, 1523, 1980.
- [2] Huseby, N. E.: *Clin. Chim. Acta*, **111**, 39, 1981.
- [3] Wenham, P. R. et al.: *Clin. Chim. Acta*, **112**, 113, 1981.
- [4] Selvaraj, P. et al.: *Enzyme*, **30**, 21, 1983.
- [5] Echetebeu, Z. O. et al.: *Enzyme*, **27**, 1, 1982.
- [6] Tate, S. S. et al.: *J. Biol. Chem.*, **249**, 7593, 1974.
- [7] Kojima J. et al.: *Clin. Chim. Acta*, **106**, 165, 1980.
- [8] 王锦兰等:《生物化学与生物物理进展》, (3), 61, 1983.
- [9] Selvaraj, P. et al.: *Clin. Chim. Acta*, **121**, 291, 1982.
- [10] 莽克强等:《聚丙烯酰胺凝胶电泳》,第一版,科学出版社, p. 81, 1975.

[本文于 1983 年 12 月 6 日收到]

中日科技人员在京召开 DNA 合成仪技术交流会

本会由国家科委中国生物工程开发中心主持,于 1984 年 10 月 24—27 日在中国农业科学院分子生物学及基因工程研究室召开。参加会议的有日本 Zeon 公司和我国 18 个单位从事分子生物学的科技人员。会上讨论了 DNA 合成原理,所用试剂及详细的操作技

术,并用日本 Zeon 公司制造的 Genet 型全自动和手动 DNA 合成仪做了示范表演,合成了由中国科技人员编排的含有 30 个碱基长度的 DNA 序列。通过会议,中日双方科技人员交流了技术,增进了相互了解。

[中国农业科学院分子生物学及基因工程研究室郭三堆]