

3 讨 论

一步研究.

以 [^3H] 皮质酮为配体的放射配体结合测定结果表明,猪小脑突触质膜上存在皮质酮的特异结合位点.用不同浓度的 [^3H] 皮质酮所做的饱和曲线显示,这种结合是可饱和的,但饱和曲线不是典型的双曲线型,而是呈“S”型,这与本室郭佐博士在大鼠脑突触质膜上测得的结果一致.对这样的曲线,用常规的直线回归处理方法不能得到 $B_{\max}$ 和 K_d 值.本文采用计算机程序处理方法(根据最小二乘法原理进行多项式曲线拟合)求得猪小脑突触质膜 GCMBS 的最大结合量($B_{\max}$)每毫克蛋白为 $486.95 \pm 46.07 \text{ fmol}$, K_d 为 $231.67 \pm 65.26 \text{ nmol/L}$.

甾体结合特异性是鉴定甾体激素受体的一项重要指标.我们的测定结果表明,猪小脑突触质膜 GCMBS 具有较高的甾体特异性,其中以皮质酮、醛固酮和地塞米松的亲和力为最高,17 β -雌二醇、孕酮和 R5020 为中等, RU26988 和睾酮的亲和力最低,这与郭佐在大鼠脑突触质膜所得的结果不完全相同,其原因有待进

参 考 文 献

- 1 Kelly M J, Moss R L, Dudley C A. Effects of microelectro phoretically applied estrogen, cortisol and acetylcholine on medial preoptic-septal unit activity throughout the estrous cycle of the female rat. *Exp Brain Res*, 1977; 30:53
- 2 Sachs B D, Leipheimer R F. Rapid effect of testosterone on striated muscle activity in rats. *Neuroendocrinology*, 1988; 48: 453
- 3 Hua S Y, Chen Y Z. Membrane receptor-mediated electrophysiological effects of glucocorticoid on mammalian neurons. *Endocrinology*, 1989; 124: 687
- 4 傅红,郭佐,陈宜张.大鼠脑突触质膜糖皮质激素结合位点的等电点测定.生物化学与生物物理进展,1992; 19: 296
- 5 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*, 1976; 72: 248

大鼠组织中铜锌及锰超氧化物歧化酶活性的比较*

魏重琴 张菊娥 艾建芳 付 蕾 王树立

(河南医科大学生化教研室,郑州 450052)

关键词 CuZn-SOD, Mn-SOD, 动物组织

在真核生物中, CuZn-SOD (铜锌超氧化物歧化酶)分布于细胞的可溶部分(胞浆及线粒体内膜间隙), Mn-SOD (锰超氧化物歧化酶)则局限于线粒体基质.两种 SOD 均可催化超氧阴离子自由基 (O_2^-) 歧化为 H_2O_2 和 O_2 , 使组织免受过多的 O_2^- 所致的潜在损伤作用,对机体起重要的保护作用.但二者的氨基酸组成、分子量、亚基数目、特定的吸收光谱等多种理化性质,均有较大的差异,如一定浓度的氰化物可抑制 CuZn-SOD 活性,而 Mn-SOD 活性却不受氰化物的影响^[1,2].因此,根据氰化物存在与否可测定出 SOD 的总酶(T-SOD), CuZn-SOD 及 Mn-SOD 的比活性^[3,4].本文根据这一特性,对正常 Wistar 大鼠不同组织中两种 SOD 的比活性进行了比较,这将为研究某些疾病时需要测定实验动物组织中 SOD 的比活性而提供一种简单、快速、可靠的方法。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂

L-肾上腺素(Fluka 公司产品)、碳酸钠、碳酸氢钠、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾等均为国产分析纯试剂。

1.2 实验动物

健康 Wistar 大鼠,体重约 250g (由河南医科大学实验动物中心提供)。

1.3 方 法

1.3.1 动物处理:心脏取血约 1ml,肝素抗凝,分离红细胞,用生理盐水洗涤 3 次,以备测定红细胞 CuZn-SOD 比活性用.取血后将大鼠断颈椎白处死,解剖取出心、肝、脾、肺及肾脏,立即置于 4℃预冷的生理

* 属河南省卫生厅重大科研项目。

收稿日期: 1992-01-07 修回日期: 1992-03-30

盐水中。

1.3.2 匀浆制备: 去除脂肪及结缔组织,用 4℃ 预冷生理盐水冲洗 3—4 次,尽量洗去血污,每次均用 3 层滤纸挤压。称取 0.2g 湿组织,放入玻璃匀浆器中,加入 0.05 mol/L 磷酸缓冲液 (含 0.1 mmol/L EDTA, pH = 7.8), 在冰浴中制成匀浆,所加磷酸缓冲液的终体积为 5ml。14000g 离心 30min, 弃去沉淀,上清液反复冻融 3 次,每次 10000g 离心 5min, 保留上清液,以备测定 SOD 比活性用。

1.3.3 SOD 活性测定: 将上清液 200μl 加 5ml 磷酸缓冲液稀释。取稀释上清液 0.5ml, 按肾上腺素自氧化法^[5]测定 SOD 活性。

1.3.4 蛋白质含量测定: 取稀释上清液 0.3ml, 采用考氏亮蓝法^[6]测定蛋白质含量 (以结晶血清白蛋白制备标准曲线)。

1.3.5 CuZn-SOD 及 Mn-SOD 比活性的计算: 首先用不同浓度的 KCN 观察其对大鼠红细胞 SOD 提取液^[5]及组织匀浆稀释上清液 SOD 活性的抑制作用。用对 SOD 活性起最大抑制作用的 KCN 的最小终浓度 (0.2 mmol/L), 区分两种类型的 SOD 并测定其活性。实验结果表明, 反应液中 KCN 终浓度为 0.2mmol/L 时, 红细胞中 CuZn-SOD 的活性被抑制 92%, 而肝匀浆上清液中 CuZn-SOD 被抑制 85%—92%。

设不加 KCN 所测 SOD 活性为 $X(U/ml)$, 即 SOD 总酶 (T-SOD) 活性。加入 KCN 至反应液中 KCN 终浓度等于 0.2mmol/L 时, 所测 SOD 活性为 $Y(U/ml)$ 。

则 CuZn-SOD 活性 = $(X - Y)/0.92U/ml$; 0.92 代表 CuZn-SOD 活性被 KCN 抑制了 92%。

Mn-SOD 活性约等于 T-SOD 活性减去 CuZn-SOD 活性。

上述 3 种 SOD 的比活性用它们的酶活性 (U/ml) 与其蛋白质含量 (mg/ml) 的比值, 即每 mg 蛋白质中的酶活性 (U/mg) 表示。

2 结 果

2.1 不同浓度的 KCN 对 SOD 活性的抑制作用

将不加 KCN 测定的红细胞 SOD 提取液及匀浆上清液中 SOD 活性定为 100%, 在上述反应液中分别加入不同量的 10mmol/L 的 KCN 溶液, 使其终浓度为 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.2, 0.3mmol/L, 再测定 SOD 活性, 并以 SOD 活性的百分数为纵坐标, KCN 终浓度为横坐标, 绘制 KCN 对 SOD 活性的抑制曲线 (见图 1)。

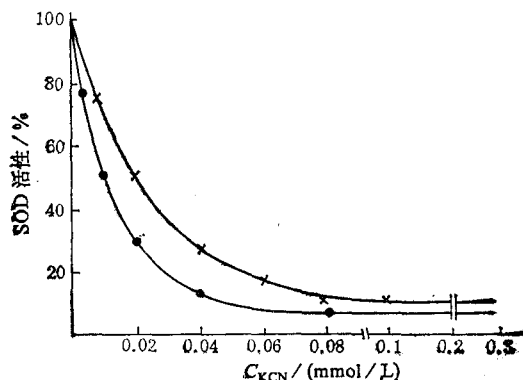


图 1 KCN 对 SOD 活性的抑制作用

× 大鼠肝匀浆上清液 SOD 活性
• 大鼠红细胞 SOD 活性

在不同时间, 用不同的大鼠红细胞 SOD 提取液及组织匀浆上清液 (大鼠肝) 样品, 反复 5 次进行 KCN 对 SOD 活性的抑制实验。由结果可见, 尽管不同组织来源的 SOD 活性不同; 不同浓度 KCN 对 SOD 活性的抑制百分数也不完全相同, 但总的抑制趋势基本相同 (见图 1)。同一份组织匀浆上清液同时测定 10 次, 其变异系数 $CV = 1.604\%$ 。一周内同一样品重复测定 4 次, 其变异系数 $CV = 2.454\%$ 。

2.2 正常大鼠不同组织中 T-SOD, CuZn-SOD, Mn-SOD 比活性的测定

表 1 大鼠组织中 T-SOD、CuZn-SOD 及 Mn-SOD 比活性的比较⁽¹⁾

	n ²⁾	T-SOD		CuZn-SOD		Mn-SOD		Mn-SOD/T-SOD (%)	
		$\bar{X}$	S	$\bar{X}$	S	$\bar{X}$	S	$\bar{X}$	S
心	62	16.795	4.395	14.848	3.700	3.039	1.206	17.78	4.54
肝	61	44.084	14.436	41.530	12.579	4.812	1.551	10.91	2.65
脾	61	10.703	3.539	8.645	2.912	2.721	1.434	24.54	9.28
肺	61	10.569	2.308	8.008	1.524	3.280	1.525	28.95	10.63
肾	62	17.202	4.372	15.708	3.840	3.025	1.568	15.43	6.61
红细胞	61			56.947	9.48				

1) SOD 比活性以 U/mg 表示

2) n 为例数

3 讨 论

体内 O_2^- 产生于微粒体并依赖于还原型辅酶 II 的酶促反应、线粒体电子传递及一些物质的自氧化等过程。 O_2^- 的产生与清除处于动态平衡。动物体内不同组织中 CuZn-SOD 及 Mn-SOD 的分布及其活性不同是与各组织亚细胞结构形成 O_2^- 的量不同有关。它们属于同工酶,具有组织器官和细胞部位特异性,它们的这一特性在体内自由基代谢调节方面以及生物学和医学研究方面均具有重要意义。测定不同组织中这两种 SOD 比活性有助于衰老机理研究及心血管疾病、肿瘤、肾病等病因探讨。Oberley 等人^[1]报道,几乎所有肿瘤组织 Mn-SOD 活性均降低或缺少,这一现象可作为判断肿瘤的基本特征之一。不同类型的肝癌组织 T-SOD 和 Mn-SOD 均低于正常肝组织。急性心肌梗塞患者在发病 24h 内,血浆 Mn-SOD 活性升高,阳性率达 100%^[2]。另有文献^[3]报道衰老的大、小鼠肝脏中 T-SOD 比活性明显降低。

将肾上腺素自氧化法与 KCN 抑制法区分两种 SOD 的方法相结合,应用于 Mn-SOD 活性测定尚未见报道。本实验结果提示:在反应液中 KCN 终浓度为 0.2 mmol/L 时红细胞 CuZn-SOD 活性被抑制 92%,组织匀浆上清液 SOD 活性被抑制 85—92%,这与文献报道^[1,4]基本相符。该方法重复性、稳定性良好,而且操作简便。

参 考 文 献

1 方允中,李文杰主编. 自由基与酶——基础理论及其在

生物学和医学中的应用. 北京: 科学出版社, 1989; 71—80

- 2 Marklund S L. Copper- and zinc-containing superoxide dismutase, manganese-containing superoxide dismutase, Catalase, and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal human tissues. *Cancer Research*, 1982; 42: 1955
- 3 Tyler D D. Polarographic assay and intracellular distribution of superoxide dismutase in rat liver. *Biochem J*, 1975; 147: 493
- 4 Mennella M R F, Jones R. Properties of spermatozoal superoxide dismutase and lack of involvement of superoxides in metalion-catalysed lipid-peroxidation reaction in semen. *Biochem J*, 1980; 191: 389
- 5 魏重琴, 艾建芳. 超氧化物歧化酶肾上腺素自氧化测定法的研究, 生物化学与生物物理进展, 1988; 15(2): 124
- 6 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976; 72: 248
- 7 Oberley L W, Buettner G R. Role Superoxide Dismutase in Cancer: A Review. *Cancer Research*, 1979; 39: 1141
- 8 石湘芸等. 急性心肌梗塞患者血清超氧化物歧化酶动态变化的观察. 中华内科杂志, 1989; 12: 714
- 9 Reiss U, Gershon D. Comparison of cytoplasmic superoxide dismutase, in liver, heart and brain of aging rats and mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 1976; 73: 255

化学法标记高敏感性生物素化基因探针

刘钟琨 杨贵贞*

(哈尔滨医科大学免疫学教研室, 150086)

关键词 生物素化基因探针, Southern 杂交, 菌落原位杂交

非同位素 DNA 探针由于具有可长期保存、对人体无害、能缩短检测时间等优点,因而应用潜力很大。其缺点是检测敏感性较差,故在检测特定基因,特别是人基因组单拷贝基因时受到限制。我们曾报道运用化学方法将生物素标记在 λ DNA 上,探针检测敏感性达到 4 pg^[1],在此基础上我们对一系列实验条件进行了探讨和改进,又用该法制备了生物素化 IL-2R。基因探针和 λ L-6 cDNA 探针,探针敏感性高达 pg 以

下水平,将它们用于 Southern 杂交和菌落原位杂交,均获良好结果,并可从人基因组 DNA 中清楚检测出单拷贝基因。

1 材 料 和 方 法

1.1 材料

* 白求恩医科大学免疫学教研室。

收稿日期: 1991-12-05 修回日期: 1992-01-09