

表 2 不同诱导物对 β -半乳糖苷酶的影响

纸上 X-gal 含量/ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	4. 6				2. 3			
诱 导 物	IPTG	乳糖	葡萄糖	未加	IPTG	乳糖	葡萄糖	未加
呈色反应	++++	+++	—	++	++++	+++	—	++

表 3 不同 pH 值的 X-gal 试纸对呈色反应的影响

pH 值	6. 5	7. 0	7. 5	8. 0	8. 5	9. 0
保温时间 10min	+	++	++	++	++	+
保温时间 15min	++++	++++	++++	++++	++++	++++
呈色反应 30min	++++	++++	++++	++++	++++	++++

此方法与常规的 X-gal 平皿法比较, 具有操作简便、快速、灵敏等优点, 而且实验结果重复性好. X-gal 试纸在干燥条件下保存可长期使用.

本方法的 X-gal 用量按每只平皿计算, 只是平皿法的 $1/8-1/4$, 若剪成小纸片使用, 可避免平皿法大面积无菌落造成的 X-gal 不必要消耗. X-gal 试纸曾成功地用于 D-木糖异构酶基因的亚克隆筛选^[10]. 本方法不仅适用于产 β -半乳糖苷酶微生物的筛选, 而且适用于基因克隆的检定.

参 考 文 献

- Messing J, Crea R, Seeburg H. Nuel Acids Res, 1981; 9: 309
- Anon. Protocols and applications guide, 2nd. USA: Promega Co, 1991: 53
- 郭礼和, 曹仲欣, 吴 瑞. 生物工程学报, 1985; 1 (2): 14
- Anon. Life science research products, California: Bio-rad Co, 1992: 177
- Haxahax D. J Mol Biol, 1983; 166: 577
- Ullmann A, Jacob F, Monod J. J Mol Biol, 1967; 24: 339
- Sambrook J, Frisch E F, Maniatis T. Molecular Cloning, 2nd, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; 1: 186
- 张其玖, 张兰芳, 韩恒湘等. 微生物学报, 1988; 28: 40
- Zhang Qiju, Zhang Lanfang, Han Hengxiang *et al.* Anal Biochem, 1986; 156: 413
- 侯永敏, 张其玖, 王书锦. 生物工程学报, 1990; 6 (4): 300

AST 同工酶的琼脂糖凝胶电泳 NBT 显色法

石玉玲 陈彦红 刘 讯

(广州军区武汉总医院检验科, 武汉 430070)

摘要 分布于细胞内线粒体及细胞质中的天门冬氨酸氨基转移酶 (AST·EC·2·6·1·1) 是人血清中含有的两种同工酶, 分别称为 AST-m 和 AST-c 同工酶. AST-c 电泳迁移率介于血清 α -球蛋白与 β -球蛋白之间. AST-m 电泳迁移率相似于 γ -球蛋白, 琼脂糖凝胶电泳固蓝 B 染色法对 m-AST 检出率较低. 用 NBT 显色法则可得到较好效果.

关键词 AST 同工酶, NBT 显色法, 琼脂糖凝胶电泳

分布于细胞内线粒体及细胞质中的天门冬氨酸氨基转移酶 (AST·EC·2·6·1·1) 是人血清中含有的两种同工酶。它们是由两类亚基组成的纯二聚体。按其在人体中的分布, 分别称为 AST-m 和 AST-c 同工酶。AST-c 电泳迁移率介于血清 α -球蛋白与 β -球蛋白之间。AST-m 电泳迁移率相似于 γ -球蛋白^[1]。血清 AST 同工酶检测用于判断心肌梗塞、暴发性肝炎及失代偿期肝硬化等疾病, 并可判断心肌组织及肝损害的严重程度。在判断心肌梗塞患者预后时, 有学者认为 AST-m 优于肌酸激酶及其同工酶的测定^[2]。

目前采用方法: 免疫法^[3]、柱层析法^[4]、琼脂糖凝胶电泳法^[5]。其中免疫法准确, 但试剂来源困难。柱层析法又较繁琐费时。琼脂糖凝胶电泳法固蓝 B 染色^[6], 对 AST-m 检出率较低。本文改用 NBT 显色法, 对 AST-m 检测有较高的灵敏度, 方法快速、简便、准确。现介绍如下:

1 试剂

1.1 基质液: 采用中国科学院生物物理所中生物工程高技术公司 AST 试剂盒。 α -酮戊二酸 12mmol/L; NADH 0.18mmol/L; 苹果酸脱氢酶 420U/L; L-天门冬氨酸 240mmol/L; Tris 缓冲液 80mmol/L pH 7.8。

1.2 电极缓冲液: pH 8.6, 0.05mmol/L 巴比妥缓冲液。

1.3 pH 7.5 Tris 缓冲液: 0.2mol/L 三羟甲基氨基甲烷 25ml 与 0.1mol/L HCl 40.5ml 混合即成。

1.4 0.8% 琼脂糖电泳凝胶: 取琼脂糖 0.8g 加入蒸馏水 50ml 煮沸至透明, 加入 Tris 缓冲液 50ml, 冷却后 4℃ 冰箱保存。

1.5 显色液: 需 pH 7.5 Tris 缓冲液配制, 4℃ 冰箱保存。

a. 5mg/ml 氯化硝基四氮唑蓝溶液 (NBT) (避光)。b. 吩噻二甲脂硫酸盐 (固体) 临用时

少许加入。

1.6 显色合剂: 电泳结束前将基质液 2—4ml 内加入吩噻 (固体颗粒) 少许, 再加入 NBT 溶液 0.5ml 混匀即成。

2 实验步骤

2.1 制板: 将 0.8% 琼脂糖凝胶加热溶化后取 2.5ml 均匀浇于载玻片上, 冷凝后在距玻片一端 2cm 处挖槽。

2.2 加样与电泳: 加被检血清 40 μ l 于槽内, 加样端置阴极, 电压 120V, 25min。

2.3 显色: 将溶化的 0.8% 琼脂糖凝胶趁热与显色合剂 1:1 比例混合后, 均匀浇于电泳后凝胶板上, 冷凝后移至有盖湿盒内, 45℃ 避光温育 1.5—2h。

2.4 定量: 可直接用扫描仪定量。

3 结果与讨论

本法作正常血清 30 例分析, 经 Densitron 20M 光密度计扫描, 结果经统计学处理: AST-m 为 $14.73 \pm 5.2 (\bar{x} \pm s)$ 与文献报道值一致^[4,5]。检测急性心肌梗塞患者血样 16 份、急重肝患者血样 21 份。电泳 AST-c 同工酶位于 β -球蛋白区域, AST-m 同工酶位于阴极侧的 γ -球蛋白区域, 患者血清 AST-m 带较正常明显增高。见图 1。

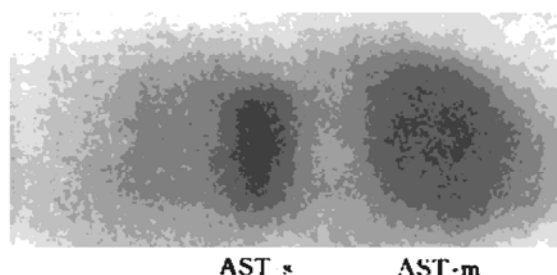
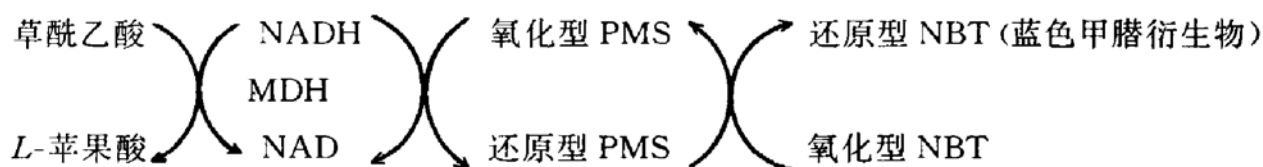


图 1 AST 同工酶琼脂糖电泳
图为急性心梗患者血清。

测定原理: L -天门冬氨酸 + α -酮戊二酸 $\xrightarrow{\text{AST}}$ 草酰乙酸 + L -谷氨酸。



本文采用 NBT 显色法测定 AST 同工酶, 因还原型 NBT 呈蓝色, 可显示清晰的两条同工酶谱带, 显色强度与酶活力成正比。本法设备要求简单, 试剂可由中生公司提供, 一般临床生化实验室皆可开展。主要临床价值在于: AST-m 存在于细胞内线粒体中, 当心肌或肝细胞坏死, 线粒体膜通透性增加时, AST-m 大量释放引起血清中活力增高。因此, 可判断心肌及肝脏损害的严重程度。当心肌、肝脏组织损害严重时 AST-m 明显升高。鉴别诊断某些肝脏疾病, 慢性活动性肝炎时 AST-m 往往升高, 而慢性迁延性肝炎时多数正常^[7]。原发性肝癌时高于肝硬化、恶性胆道梗阻高于良性胆系疾病。酒精性肝损害时 AST-m 往往明显上升, 而丙氨酸移换氨基酶 (ALT) 总活力升高

不明显。此为区别于病毒性肝炎的主要特征之一。临床动态观察血清 AST-m 活性变化, 对急性心梗、重肝患者病情及预后估价有重要意义。

参 考 文 献

- 1 Bergmeyer H U, Tutzing G N, Bowers J *et al.* Clin Chem, 1977; **23**: 884
- 2 叶应妩主编, 临床实验诊断学, 北京: 人民卫生出版社, 1989: 669
- 3 Inagaki N, Kamisaki Y, Kiyama H *et al.* Brain Res, 1985; **325**: 336
- 4 徐克成, 实用内科杂志, 1986; **6** (12): 634
- 5 Sampson E J, Miller S A, Mckneally S S *et al.* Clin Chem, 1978; **24**: 1805—1812
- 6 石玉玲, 广东生化通讯, 1986; **3** (1): 27
- 7 陈国兴, 临床肝胆病杂志, 1986; **2** (4): 207

用 Fura-2 双波长荧光法测定神经细胞内游离钙*

卢步峰 黄治森

(镇江医学院生化研究室, 镇江 212001)

鲁友明

(海军神经生物学研究中心, 南京 210049)

摘要 采用新型 Ca^{2+} 荧光指示剂 Fura-2 建立双波长荧光法测定分离的大鼠神经细胞内游离钙浓度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$)。结果显示, 在静息状态下, 其 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 为 $109 \pm 12 \text{ nmol/L}$ 。30mmol/L KCl 可显著增加 $[\text{Ca}^{2+}]_i$, 并且 KCl 的这种效应呈一定的剂量依赖关系, 提示该法灵敏、可靠。

关键词 荧光指示剂 (Fura-2)、细胞内游离钙, 神经细胞, 大鼠

Fura-2 {2-[6-双乙酸基-5-(2-双乙酸氨基)-5-甲苯氨乙氧基]-2-苯并咪唑基-5-噻唑酸五钾盐} 属第二代荧光指示剂, 其荧光强度高, 对 Ca^{2+} 选择性好, 测定灵敏等优点, 是国外研究 Ca^{2+} 在生命科学中生理、生化功能的重要手段之一^[1,2]。目前, 国内大部分实验室均采用

Fura-2 单波长荧光法^[3,4], 未能充分利用 Fura-2 固有优点, 故直接影响到测定的准确性和可靠性。本文报道采用 Fura-2 双波长荧光法测

* 江苏省自然科学基金资助项目。

收稿日期: 1993-05-18, 修回日期: 1993-08-27

A Test Paper Method for Rapid Detecting β -Galactosidase. Yuan Suli, Fu Li, Zhang Qijiu. (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; **21** (3): 271

A X-Gal test paper method for detecting β -galactosidase has been developed. This method is based on the degradation of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -galactoside, a chromogenic substrate, into blue 5-bromo-4-chloro-indole by the reaction of β -galactosidase. Advantage of the method is that it not only consumes X-gal less, but it is also more simple and convenient than the previous method. The present method is suitable for detecting a large number of the colonies containing gene encoding for β -galactosidase from an agar plate.

Key words X-gal test paper, β -galactosidase, gene cloning

Agarose Gel Electrophoresis Staining With NBT for AST Isoenzyme Measurement. Shi Yuling, Chen Yanhong, Liu Xun. (*Wuhan Gen. Hosp., Guangzhou Mil. Reg., Wuhan 430070*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; **21** (3): 273

Mammalian aspartate aminotransferases (AST • EC • 2 • 6 • 1 • 1) exist in two predominant forms: one mitochondrial (AST-m) the other of cytosolic origin (AST-c). The electrophoretic migration rate of AST-c is between α - and β -glubulin, and the electrophoretic migration rate of AST-m is similar to γ -

glubulin. The method of solid blue B dye with electrophoresis on agarose is not sensitive to AST-m. So the nitroblue tetrazolium (NBT) dye is used instead of the solid blue B dye.

Key words aspartate aminotransferase isoenzyme, nitroblue tetrazolium dyes, agarose gel electrophoresis

Determination of Intracellular Free Ca^{2+} Concentration in Neurocytes with Fura-2 Double-Wavelength Fluorecent Technique. Lu Bufeng, Huang Yisen, Lu Youming. (*Department of Biochemistry, Zhenjiang Medical College, Zhenjiang 212001*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; **21** (3): 275

The intracellular free Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) was measured in isolated neurocytes prepared from *Sprague-Dawley* rats with Fura-2 double-wavelength fluoremetry. The results showed that the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ of the resting neurocytes in Ca^{2+} -containing solution was $109 \pm 12 \text{ nmol/L}$ ($\bar{x} \pm s$, $n=9$). KCl (30mmol/L) markedly evoked $[\text{Ca}^{2+}]_i$ of the neurocytes ($P < 0.01$, $n=9$), and the rises of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ by KCl is a concentration-dependent response. These results suggest that the adoption of Fura-2 double-wavelength fluoremetry in dissociated rat neurocytes in a useful and relatively easily applicable technique for monitoring intracellular Ca^{2+} changes.

Key words Fura-2, intracellular free calcium, neurocytes, rat