

- 13 夏霞娟, 崔肇春, 顾天爵. 生物化学与生物物理进展, 1985, (5): 27
- 14 Byrne M C, Agler M S, Aquino D A *et al.* Anal Biochem, 1985; 148: 163

- 15 吴谷盛. 细胞生物学杂志, 1986; 8 (4): 145
- 16 Samson J C. Drug Ves Res, 1990; 19 (3): 209
- 17 Ladisch S, Gillard B. Anal Biochem, 1985; 146: 220

用固相 pH 梯度等电聚焦分析 Gc 蛋白亚型

郭尧君 郭 强*

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

黄力力 喻忠义

(法庭科学研究所, 北京100038)

摘要 用固相 pH 梯度等电聚焦技术及免疫固定技术对201名北京地区无关汉族群体的人血清 Gc 蛋白亚型进行了分型鉴定及基因频率的调查. Gc^{1F} 为0.3698, Gc^{1S} 为0.2812, Gc^2 为0.3490. 观察值与期望值吻合良好 ($\Sigma\chi^2 = 1.057$, $P > 0.70$).

关键词 固相 pH 梯度, 等电聚焦, 人血清 Gc 蛋白亚型, 免疫固定

固相 pH 梯度等电焦 (immobilized pH gradients isoelectrofocusing, IPG IEF) 技术是1975年由瑞典科学家 Gasparic 等人^[1]建立的, 并在80年代由意大利科学家 Righetti^[2]不断完善. 由于这种技术克服了阴极沉淀, pH 梯度稳定, 导电性和缓冲能力均一可控, 上样量大以及可达到超窄 pH 范围 (0.1pH) 及超高分辨率 (0.001pH), 所以在法医血型鉴别及分子生物学领域中得到了广泛应用.

“型特异成分” (group-specific component, Gc), 又称维生素 D 结合蛋白 (DBP), 是存在于人类血清中的一组生物活性相同、结构相似的 α_2 球蛋白. 1959年 Hirschfeld^[3] 通过免疫电泳首先发现其遗传多态性及三种常见表型 $Gc1-1$, $Gc2-1$, $Gc2-2$, 并证实由一对常染色体共显性等位基因控制 (Gc^1 , Gc^2). 1977年 Constans^[4] 用 IEF 技术将 Gc 又分成 $Gc 1F$, $Gc 1S$, $Gc 1F-1S$, $Gc 2$, $Gc 2-1S$, $Gc 2-1F$ 6种表型, 由复等位基因 Gc^{1F} , Gc^{1S} 和 Gc^2 控制^[5-7]. 我国北方汉族人 Gc 的血型鉴别机率 (D. P) 在 0.5566-0.5758 之间, 非父排除率为 16%^[8]. 按 Gc 复等位基因计算, 其 D. P 和非父排除率更高, 如香港地区汉族人 D. P 为 0.7983, 非父

排除率为 34.12%, 均大于 ABO, Rh, MN 等血型系统^[9]. 所以 Gc 遗传标记在个体识别及群体进化遗传理论上有着重要意义. 我们用国内未见有报导的 IPG IEF 技术对血清 Gc 蛋白亚型进行了研究, 以期得到更高的分辨率.

1 材料与方法

1.1 样品来源

201份血样采自北京地区无亲缘关系健康汉族未抗凝全血, 分离血清在 -20°C 保存.

1.2 仪器和试剂

1.2.1 仪器 瑞典 Pharmacia LKB 公司 Multiphor I 电泳仪及梯度凝胶灌胶附件.

1.2.2 试剂 a. 贮液: 29.1% 丙烯酰胺 / 0.9% 甲叉双丙烯酰胺, LKB 公司产品.

b. 电极缓冲液: 阳极 10mmol/L 谷氨酸, 阴极 10mmol/L NaOH.

c. Immobiline pK4.6, pK9.3 和 Ampholine pH4-6, 分别为 LKB 1985 年和 1979 年产品.

d. 脱色液: 甲醇: 冰乙酸: 水 = 4:1:5.

* 合肥中国科技大学生物系 88 届毕业生.

收稿日期: 1993-06-11, 修回日期: 1993-09-23

c. 染色液: 0.12% 考马斯亮蓝于脱色液中。

1.3 操作方法

1.3.1 灌制凝胶 使用 Pharmacia LKB 公司梯度凝胶灌胶模具灌胶^[10], 把表1中的贮液各8ml 分别注入梯度混合器的混合腔和贮液腔中, 排除腔间气泡, 轻轻搅拌, 然后各加入新配制的10% TEMED 35 μ l 和10%过硫酸胺40 μ l, 同时打开流出阀和腔间阀, 使两贮液按梯度混合注入模具。模具注满后, 立即放入50℃烘箱保温1h。称重, 然后用去离子蒸馏水洗去催化剂及未聚合的单体 (3 $\times$ 1h), 最后用冷风吹至与洗胶前重量相差少于5%为止, 即可电泳。

表1 IPG 聚丙烯酰胺贮液配方

	酸液 (混合腔)	碱液 (贮液腔)
Immobiline, pK4.6	414.6 μ l	679.8 μ l
Immobiline, pK9.3	165 μ l	612.6 μ l
Ampholine pH4-6	120 μ l	120 μ l
凝胶储液	1.5ml	1.5ml
甘油 (98%)	2.24ml	
定容至	9ml	9ml

注: pH4.4—5.4 ($T=5^{\circ}\text{C}$, $C=3\%$)

1.3.2 样品处理 血清按1:3加蒸馏水稀释后, 直接滴加5 μ l 在凝胶上。

1.3.3 等电聚焦 电极间距10cm, 循环水浴温度10℃, 电参数如表2。

表2 CA/IPG IEF 电泳参数

		电压 V	电流 mA	功率 W
第1相	设置值	3500	3.0	5
	最终值	3100	1.5	5
第2相	设置值	3500	15	20
	最终值	3500	1.5	6

1.4 免疫固定及染色^[11]

用3倍稀释的抗 Gc 血清浸湿醋酸纤维素

膜, 稍干后覆盖于凝胶表面 pH4.8—5.2位置上, 将胶板置于37℃免疫固定40min。取下醋酸纤维素膜用生理盐水漂洗3 $\times$ 10min, 洗去未沉淀蛋白质, 再用蒸馏水洗数分钟以去盐。吸去多余水分后在染色液中染5min, 脱色, 再用蒸馏水漂洗去脱色液。

1.5 Gc 亚型判型

根据 Constans^[4]提出的标准判定 Gc 亚型。用第一届巴黎 Gc 系统国际研讨会采用的标准判定变异型, 并用 Hardy-Weinberg 遗传平衡法则作统计^[12]。

2 结果与讨论

IEF 技术自建立以来, 获得了比其他电泳技术更快的发展^[13,14], 它经历了4个阶段^[2],

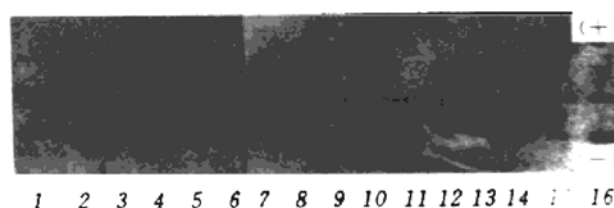


图1 pH4.5—5.4的 CA IEF Gc 图谱

1, 2, 15, 16为 Gc 2-1F; 5, 8, 13, 14为 Gc 2-1S; 10, 11为 Gc 1F; 4为 Gc 1S; 6, 9, 12为 Gc 1F-1S; 3为 Gc 1A3-1F; 7为 Gc 1A9-1F。

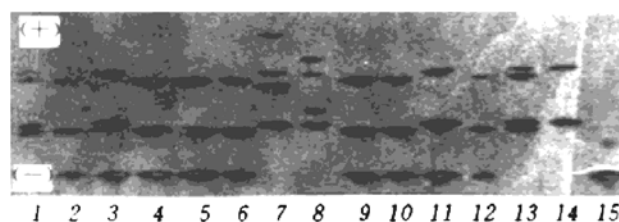


图2 pH4.4—5.4的 CA/IPG IEF 图谱

1, 13为 Gc 1F-1S; 2, 4, 5, 6, 9, 10为 Gc 2-1S; 3, 11为 Gc 2-1F; 14为 1F; 15为 Gc 2; 7为稀有 1A9-1F; 8为稀有 1A3-1F。

1985年由 Rimpilainen 和 Righetti 提出设想, 80年代末见诸实验的第四代 IEF 是在 IPG 胶中添加 CA 的 CA/IPG 混合等电聚焦。CA 起了屏蔽分子的作用, 遮挡了蛋白分子表面的疏水基团, 明显增加了蛋白质在 IPG 中的溶解能

力. 由于 Gc 蛋白是一组较大分子的 α_2 球蛋白, 故本文考虑使用了 CA/IPG 混合 IEF 技术. 通过 pH4.5—5.4 的 CA IEF 分析 (图1) 与 pH4.4—5.4 的 CA/IPG IEF (图2) 相比较, 可发现后者带型平整、聚焦很细、分离清楚, 避免了条带太近凭肉眼主观分辨带来的判型误差. 且选择1个 pH 范围可使 Gc 的 2, 1F, 1S 带能显示在同一胶面上, 以便判型.

本文由于使用了 CA/IPG IEF 技术和免疫固定技术 (Immunofixation), 大大缩短了实验周期, 简化了实验步骤, 而且由于免疫反应的专一性, 尽管 Gc 在人血清中含量很微, 也可避免样品中大量其它蛋白质的干扰.

根据群体遗传理论中 Hardy-Weinberg 遗传平衡法则^[12], 表3中基因频率 Gc^{1F} 为 0.3698, Gc^{1S} 为 0.2812, Gc² 为 0.3490, 期望值

表3 北京地区汉族群体 Gc 亚型表型分布及其基因频率

表型	观察值		期望值		χ^2	基因频率
	N	%	N	%		
1F	26	13.5	26.3	13.5	0.003	1F=0.3698
1S	13	6.8	15.2	7.8	0.313	1S=0.2812
2	21	10.9	23.4	12.0	0.244	2=0.3490
1F-1S	40	20.8	39.9	20.8	0.000	
2-1F	50	26.1	49.5	26.1	0.004	
2-1S	42	21.9	37.7	19.8	0.493	
合计	192	100	192	100	1.057	

表4 CA/IPG IEF 和 CA IEF 结果比较

	CA/IPG IEF 结果 (f_1)	CA/IEF 结果 (f_2)	$g=f_1+f_2$	$\chi^2=\sum (h_1f_2+h_2f_1)/gh_1h_2$
1F	26	53	79	1.810
1S	13	14	27	0.685
2	21	24	45	0.749
1F1S	40	58	98	0.009
2-1F	50	79	129	0.133
2-1S	42	56	98	0.259

与观察值 $\Sigma\chi^2=1.057$, 自由度 (d.f.) = 3, 好适度 $P>0.70$, 两者无显著差异, 群体符合 Hardy-Weinberg 定律. 与黄力^[15]用 CA IEF 技术得到的数据比较见表4, $\Sigma\chi^2=3.6450$, 自由度 (d.f.) = 10, $P>0.95$, 两者吻合良好, 证明了结果的可靠性.

本结果与不同地区、人种比较, 表明汉族人群体 (包括北京、成都、香港) 与亚洲高纬度地区如日本、朝鲜无显著差异, 而与欧洲、北美白人、黑人存在显著性差异, 如 Gc^{1F} 基因频率, 亚洲人为 0.35—0.5, 欧洲人为 0.10—0.20, 黑人为 0.65—0.85. 这种遗传标记在人种上, 地域上是有不同的^[16].

本实验检出9个两种 Gc 亚型稀有型, 占全部201个样本的4.5%, 按 Hardy-Weinberg 法则适用于能随机交换等位基因的孟德尔大群体中, 即没有自然选择、突变、迁移等因素作用理想数学模型, 故计算正常亚型的基因频率时未将稀有突变型计在内. 北京人变异型均在 Gc 1S 阳极侧, 按1971年巴黎 Gc 会议命名法, 命名为1A9和1A3. 这是 Kambob^[17]报告中均在华人、亚洲群体中发现的有地区人种特征的稀有型.

本文所用的瑞典 LKB 公司的 Immobiline 和 Ampholine 虽然已经过期10年之久, 但对实验结果并无影响.

参 考 文 献

- 1 Gasparic V, Bjellqvist B, Rosengren A. Swedish patent, 1975, 140, 49-1; US patent, 1978, 4, 130, 470; French Patent, 1980, 7637402
- 2 Righetti P G. Immobilized pH gradients: theory and methodology. Amsterdam: Elsevier, 1990; 5—11
- 3 Hirschfeld J. Acta Pathol Microbiol (Scand), 1959; **47**: 160—168
- 4 Constans J, Viau M. Science, 1977; **198**: 1070
- 5 Antonio A. Journal of Forensic Sciences, 1988; **33** (5): 1267
- 6 Budowle B. Forensic Science International, 1987; **33**: 187
- 7 Pflug W. Electrophoresis, 1988; **9**: 443
- 8 贾静涛. 法医学杂志, 1985; **1**: 13
- 9 Kyy K. Human Genetics, 1981; **59**: 72

- 10 Righetti P G. Immobilized pH gradients: theory and methodology. Amsterdam: Elsevier, 1990: 119—139
- 11 Lucia P S. Electrophoresis, 1988; 9: 1602
- 12 李宝森, 胡宝庆. 遗传学. 天津: 南开大学出版社, 1991; 469—516
- 13 Righetti P G. Isoelectric focusing: theory, methodology and applications. Amsterdam: Elsevier, 1983: 1—6

- 14 郭尧君. 生物物理学报, 1988; 4 (4): 389
- 15 黄力力, 喻忠义, 许博博. 中国法医学杂志, 1993; 8 (4): 211
- 16 Smith T A. Journal of Forensic Sciences, 1990; 35 (6): 1436
- 17 Kamboh M I. Human Genetics, 1984; 67: 378

用 RNase 保护试验检测珠蛋白基因表达*

刘庆辉 刘德培 梁植权

(中国医学科学院基础医学研究所医学分子生物学国家重点实验室, 北京 100005)

摘要 mRNA 的定量分析是基因表达调控研究中应用的重要方法. 与斑点杂交、RNA 印迹法相比, 用 RNase 保护试验测定 RNA 具有灵敏度高、操作简便等优点. 应用 RNase 保护试验成功地对转基因鼠中人 β E-珠蛋白基因及鼠 α -珠蛋白基因的表达水平进行了分析.

关键词 RNase 保护试验, 珠蛋白基因, 转基因小鼠

同位素标记的 RNA 探针可以象 DNA 探针一样用于分子杂交实验, 从而对特异性 RNA 含量进行测定并可对基因和 mRNA 的结构进行分析^[1-3]. RNase 保护试验(RNase protection assay)就是一种利用 RNA 探针对基因表达产物 RNA 进行定性定量分析的有效方法. 图1是该方法的操作原理示意图. 向待测 RNA 溶液中加入过量的反意 RNA 探针, 互补的部分形成 RNA*:RNA 杂交分子. 经 RNase 选择性水解去除未形成 RNA*:RNA 杂交双链的单链使成单核苷酸. 测定未被 RNase 水解的 RNA* 探针的长度及含量, 即可对待测 RNA 进行定量和定性分析.

RNase 保护试验灵敏度极高, 可以检测出 0.1pg 水平的 mRNA^[3]. 由于用 RNase 水解 RNA*:RNA 杂交反应中单链 RNA 产生的假带较用 S1 水解 RNA:DNA 反应中单链核酸产生的假带少, 所以该方法逐渐成为检测 RNA 的一种标准化方法. 本文结合转基因小鼠中珠蛋白基因表达水平检测对 RNase 保护试验作一介绍.

1 材料与方法

1.1 材料

异硫氰酸胍 (GIT), 氯化铯 (CsCl) 和丙烯酰胺为美国 BRL 公司产品, 限制性内切酶 EcoR I, BamH I 等为中国协和医科大学友谊公司产品, 体外转录试验试剂盒 (Riboprobe Gemini) 为美国 Promega 公司产品, RNaseA, RNaseT1, 酵母 RNA 均为华美公司产品.

溶液配制:

GIT 缓冲液: 称取 94.53g GIT, 加 1.67ml 3mol/L 醋酸钠 (pH6.0), 加水至 200ml, 0.2 μ m 滤器过滤后加入 1.67ml 巯基乙醇.

CsCl 缓冲液配制: 称取 95.97g CsCl, 加入 0.83ml 醋酸钠 (pH6.0), 加水至 100ml, 过滤.

洗脱缓冲液: 取 1.67ml 3mol/L 醋酸钠和 20 μ l 0.5mol/L EDTA, 加水至 10ml, 消毒后 -20℃ 冻存.

* 863 计划资助项目.

收稿日期: 1993-06-25, 修回日期: 1993-09-07

It has been reported that angiotensin I (A I) has antioioid effect. However, the mechanism of this action is still not understood. To evaluate a possible interaction on c-fos protooncogene expression between A I and DPDPE (δ receptor agonist) or NDAP (κ receptor agonist), the changing patterns of Fos protein in rat brain (less cortex and cerebellum) tissue induced by them were determined by immunoprecipitation. The results indicated that A I at $0.1 \mu\text{mol/L}$ markedly evoked the Fos protein expression in brain tissue. Meanwhile, both DPDPE ($0.1 \mu\text{mol/L}$) and NDAP ($0.1 \mu\text{mol/L}$) could induce Fos protein increase in brain although their effects were less than that induced by A I. The levels of Fos protein expression by A I plus DPDPE or NDAP are lower than that induced by A I individually. It is suggested that the action on c-fos expression between A I and opioids is antagonistic. And opioids may weaken the evoked action of A I on c-fos expression in the brain.

Key words Fos protein, brain, angiotensin I, opioids

Determination and Analysis of Pig Brain Gangliosides. Pan Ying, Huang Rubin, Wang Zesheng, Tong Dashan, Shi Xiaoling. (Department of Biochemistry, Capital Institute of Medicine, Beijing 100054). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; 21 (4): 353—355
Gangliosides are one of the glycosylceramides, which are particularly abundant in the central nervous system of vertebrates. The content and components of pig brain Gls were detected. There were 0.0894% (W/W) Gls presented in the pig brain. It was about 0.39% (W/W) of total lipid. The main components were GM1, GD3, GD1a, GD1b and

GT1b. GM1 and GD1a of the pig brain were higher than that of human brain.

Key words gangliosides (Gls), pig brain, determination of content

Subtyping of the Gc System by Immobilized pH Gradients Isoelectrofocusing. Guo Yaojun, Guo Qiang, Huang Lili, Yu Zhongyi. (Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; 21 (4): 356—359

The distribution of Gc subtypes of 201 unrelated, healthy donors in the Han population in Beijing were investigated. Gc^{1F} is 0.3698, Gc^{1S} , 0.2812, Gc^2 , 0.3490. There was good agreement between the observed and the expected value. ($\Sigma x^2 = 1.057$, $P > 0.70$).

Key words immobilized pH gradients, isoelectrofocusing, Gc subtypes of human serum, immunofixation

Determination of Globin Gene Expression by RNase Protection Assay. Liu Qinghui, Liu Depei, Liang Zhiquan. (Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; 21 (4): 359—362

Quantitative analysis of mRNA is an important technique in the study of gene expression regulation. RNase protection assay shows higher sensitivity and easier operation than Dot blot and Northern blot. The expressions of human β E-globin gene and mouse α -globin gene in transgenic mice were successfully analyzed by RNase protection assay.

Key words RNase protection, globin gene, transgenic mice

Direct Micro Determination of Glutathione Peroxidase Activity in Mice Blood. Rong