

析仪同步扣除背景信号和同时分析多个细胞的能力, 使得它更合于人乳腺肿瘤标本涂片的细胞 DNA 定量分析.

致谢 感谢湖北省肿瘤医院毛永荣主任医师提供人乳腺肿瘤细胞涂片和病理学诊断结论.

参 考 文 献

1 Barlogie B. Abnormal cell DNA content as a marker of neoplasia: Perspectives and commentaries. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 1984, **20**: 749~ 752

2 Böcking A, Giroud F, Reith A. Consensus report of the European Society for Analytical Cellular Pathology Task Force on standardization of diagnostic DNA image cytometry. *Analyt Quant Cytol Histol*, 1995, **17** (1): 1~ 7

3 梅二文, 陈观铨, 顾文芳等. Hadamard 变换显微荧光成像技术的研究. *中国科学, B 辑*, 1995, **25** (1): 7~ 13

4 Chen G Q, Mei E W, Gu W F *et al.* Instrument of Hadamard transform three-dimensional fluorescence microscope image analysis. *Anal Chim Acta*, 1995, **300**: 261~ 267

5 梅二文, 顾文芳, 陈观铨等. 阿达玛变换显微图象分析 (I) -细胞定量分析初探. *生物物理学报*, 1995, **11** (4): 633~ 638

6 Böcking A, Alder C P, Common H H *et al.* Algorithm for a DNA-cytophotometric diagnosis and grading of malignancy. *Analyt Quant Cytol Histol*, 1984, **6** (1): 1~ 8

7 Böcking A, Chatelain R, Biesterfeld S *et al.* DNA grading of malignancy in breast cancer: Prognostic validity, reproducibility and comparison with other classifications. *Analyt Quant Cytol Histol*, 1989, **11** (1): 73~ 80

8 van Volten W A, van Duijn P, Schaberg A. Cytodiagnostic use of Feulgen: DNA measurements in cell imprints from the skin of patients with mycosis fungoides. *Br J Dermatol*, 1974, **91**: 365~ 371

Measurements of DNA Content in Breast Cancer Cell by Hadamard Transform Microscopic Image Analysis. TANG Hongwu¹⁾, CHEN Guanquan, MEI Erwen, ZENG Yun'e¹⁾ (*Department of Analysis and Measurement Science, Wuhan University, Wuhan 430072, China;* ¹⁾ *Department of Chemistry, Wuhan University, Wuhan 430072, China*).

Abstract Using acridine orange as fluorescence probe for DNA in cell, measurements of cellular DNA contents of four cases of human breast tumor were done by the system of Hadamard transform microscopic image analysis and conventional microfluorometry respectively, and the analytical results were compared. The results by the two methods are in agreement and both are concordant with pathological diagnosis. It shows that the new instrument for quantitative cytological analysis-Hadamard transform microscopic image analysis system, can provide precise analytical results as that by microfluorometer. In addition, the instrument has outstanding advantages such as high signal to noise ratio, the capability of analyzing two cells or more simultaneously and subtracting background signal synchronously.

Key words Hadamard transform, image analysis, microfluorometer, breast tumor, DNA content

琼脂糖电内渗对电泳的影响

郭尧君 李辛晖 方 勇

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 用电内渗不同(0 .0. 03 .0. 08 .0. 20 mr)的琼脂糖制成凝胶或电极缓冲液凝胶条, 观察对

电泳行为的影响. 结果表明等电聚焦电泳必须使用无电内渗琼脂糖. 不同电内渗的琼脂糖制成的电极缓冲液凝胶条对 SDS 电泳无显著影响, 但对常规聚丙烯酰胺凝胶电泳有不同程度的影响, 电内渗越高, 越不利于电泳的进行.

关键词 琼脂糖, 电内渗, 半干电泳, 电极缓冲液凝胶条

琼脂糖无毒, 制胶、电泳、染色、脱色时间短, 操作简便, 是目前常用的电泳支持介质之一. 但 Duckworth 等^[1]的实验证明琼脂糖并不是电中性的, 多糖链上荷负电的取代基在电泳时有向阳极运动的趋势. 琼脂糖的这种电内渗 (electroendosmosis, EEO) 现象使一些样品的电泳带在电泳过程中向阴极飘移. 80 年代末^[2], 将琼脂糖或聚丙烯酰胺与电极缓冲液一起制成电极缓冲液凝胶条的半干电泳技术问世. 用凝胶条替代几百甚至几千毫升的电极缓冲液, 既保证了电泳的分辨率, 又省却了配置大量缓冲液的麻烦与浪费, 且可以缩短电泳时间. 但目前国际上不论是商品还是自制凝胶条^[3]均采用无电内渗琼脂糖配制, 价格昂贵. 我们观察了不同电内渗 (0、0.03、0.08、0.20 mr) 的琼脂糖对等电聚焦、SDS 电泳、常规聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Native 电泳) 的影响, 以期能够作为一种有益的探索.

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

Phastsystem 电泳仪, 聚丙烯酰胺梯度凝胶 ($T = 8\% \sim 25\%$), 无电内渗琼脂糖, 低分子质量蛋白标准为瑞典 Pharmacia Biotech 公司产品. 载体两性电解质 pH 3~ 9.5 (军事医学科学院). 琼脂糖, 电内渗分别为 0.03、0.08、0.20 mr (北京中山生物技术公司).

1.2 方法

1.2.1 溶液配置: Native 电泳样品缓冲液: 0.02 mol/L Tris-HCl, pH 8.4, 少许溴酚蓝. SDS 电泳样品缓冲液: 在上述缓冲液中加 SDS 和巯基乙醇, 使其终浓度分别为 1% 和 5%.

Native 电泳电极缓冲液: Tris-甘氨酸, 0.96 mol/L 甘氨酸, 0.125 mol/L Tris; Tris-丙氨酸, 0.88 mol/L 丙氨酸, 0.25 mol/L

Tris; Tris-Tricine, 0.2 mol/L Tricine, 0.2 mol/L Tris. SDS 电泳用的电极缓冲液需加 0.5% SDS.

1.2.2 灌制等电聚焦凝胶与电极缓冲液凝胶条: 用毛细管灌胶法^[4]灌制 pH 3~ 9.5 的琼脂糖等电聚焦凝胶. 4℃放置 2 h, 吸去表面的水后备用.

在电极缓冲液中边搅拌边加入琼脂糖, 浓度为 3%. 煮沸 5 min, 稍冷后倒入欲制形状的凝胶条模具中, 自然冷却固化后至少在 4℃放置 2 h 备用.

1.2.3 电泳: 电极间距为 4 cm. 各种电泳参数见表 1~ 表 3.

表 1 SDS 电泳参数

	<i>U</i> / V	<i>I</i> / mA	<i>P</i> / W	<i>t</i> / °C	vh
预电泳	250	10	3	12	1
加样	250	10	3	12	9
电泳	250	10	3	12	120 ¹⁾

¹⁾ 溴酚蓝前沿靠近阳极缓冲液凝胶条时停止电泳.

表 2 Native 电泳参数

	<i>U</i> / V	<i>I</i> / mA	<i>P</i> / W	<i>t</i> / °C	vh
预电泳	400	10	2.5	12	10
加样	400	1	2.5	12	2
电泳	400	10	2.5	12	120 ¹⁾

¹⁾ 同表 1.

表 3 等电聚焦电泳参数

	<i>U</i> / V	<i>I</i> / mA	<i>P</i> / W	<i>t</i> / °C	vh
预电泳	1000	5	3.5	15	45
加样	80	1	3.5	15	6
电泳	650	3	3.5	15	150

1.2.4 染色: SDS、Native 电泳^[2]和等电聚

焦^[4]染色均用考马斯亮蓝 R-250.

2 结 果

2.1 琼脂糖电内渗对等电聚焦的影响

图 1 为血红蛋白在 0 和 0.03 mr 电内渗琼脂糖凝胶等电聚焦 (pH 3~ 9.5) 中的电泳图谱. 在不同位置加样的样品在电内渗为 0.03 mr 的琼脂糖等电聚焦电泳时均不断向阴极飘移, 不能形成清晰的聚焦带, 梯度向阴极飘移约大于 2 个 pH 单位, 致使在 pH 7 左右的几个血红蛋白主带被飘移至阴极端, 见图 1b, 且胶面上不断有水出现, 需不断吸走才能继续电泳. 所以只有无电内渗琼脂糖才能用于等电聚焦.

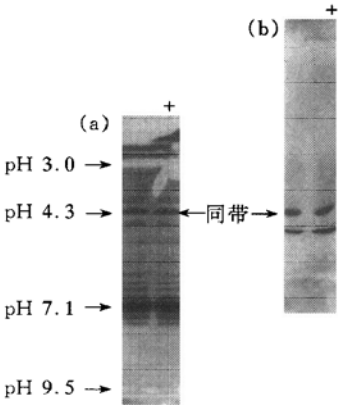


图 1 血红蛋白在电内渗为 (a) 0 mr 和 (b) 0.03 mr 的琼脂糖凝胶等电聚焦中的阴极飘移现象

2.2 琼脂糖电内渗对 SDS 电泳的影响

分别以 Tris-甘氨酸、Tris-丙氨酸和 Tris-Tricine 作电极缓冲液, 用电内渗为 0.08 mr 的琼脂糖灌制缓冲液凝胶条, 低分子质量蛋白标准的 SDS 电泳图谱见图 2. Tris-甘氨酸作电极缓冲液, 电泳需 80 vh; Tris-丙氨酸作电极缓冲液, 电泳需 118 vh; 与 Tris-Tricine 作电极缓冲液所需的 64 vh 相比, 电泳速度慢, 时间长, 而且将图 2a、b 与 c 比较, 可见以 Tris-Tricine 作电极缓冲液的电泳分离效果明显优于前两种缓冲系统.

用 Tris-Tricine 作电极缓冲液, 分别以电内渗为 0、0.03、0.08、0.20 mr 的琼脂糖灌制缓冲液凝胶条, 低分子质量蛋白标准的电泳图谱见图 3. 在此缓冲系统中, 各种电内渗的琼脂糖均可使样品分离达到满意效果, 电泳均在 64 vh 结束.

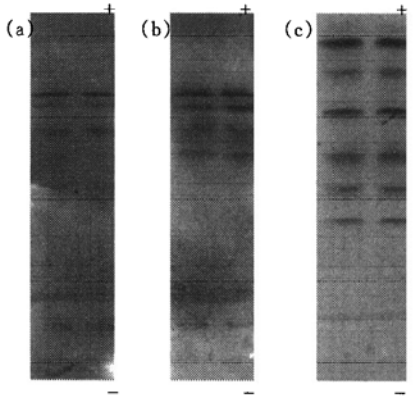


图 2 不同电极缓冲液的凝胶条对低分子质量蛋白标准 SDS 电泳的影响
(a) Tris-甘氨酸; (b) Tris-丙氨酸; (c) Tris-Tricine.

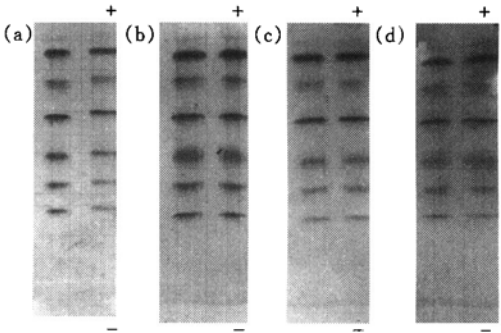


图 3 不同电内渗琼脂糖灌制的缓冲液凝胶条对低分子质量蛋白标准 SDS 电泳的影响
电内渗分别为 (a) 0 mr; (b) 0.03 mr; (c) 0.08 mr; (d) 0.20 mr.

2.3 琼脂糖电内渗对 Native 电泳的影响

采用电内渗为 0.03 mr 的琼脂糖和三种缓冲液体系: Tris-甘氨酸, Tris-丙氨酸和 Tris-Tricine 进行 Native 电泳. 使用 Tris-丙氨酸作缓冲液时, 电泳需要 80 vh, 使用 Tris-甘氨酸时需 90 vh, 而使用 Tris-Tricine 时则需要

110 v或者更多. 所以, 不同的电极缓冲液的效果是有差别的, Tris-Tricine 不宜用作Native电泳的电极缓冲液.

以 Tris-丙氨酸作电极缓冲液, 用电内渗分别为 0、0.03、0.08、0.20 mr 的琼脂糖灌制缓冲液凝胶条, 高分子质量标准的 Native 电泳图谱见图 4. 电内渗为 0、0.03 和 0.08 mr 时, 对电泳结果无明显影响. 但电内渗越高, 在电泳过程中, 电极下及胶面上出现的水越多. 当电内渗为 0.20 mr 时, 水急剧增多, 易烧胶, 不适用 Native 电泳. 但电内渗的差别并不明显影响电泳的分辨率.

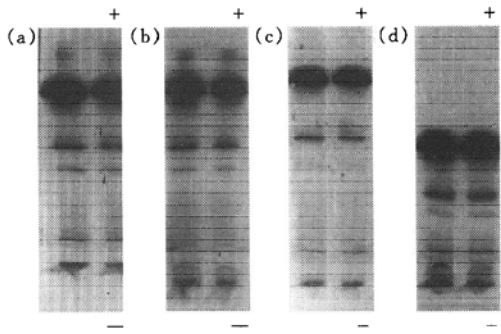


图 4 用不同电内渗的琼脂糖灌制缓冲液凝胶条
对人血清 Native 电泳的影响
电内渗分别为 (a) 0 mr; (b) 0.03 mr; (c)
0.08 mr; (d) 0.20 mr.

3 讨 论

琼脂糖是由一系列基本结构相同而取代基(硫酸基与羧基)含量不同的多糖组成的混合物. 在中性或碱性缓冲介质中, 多糖链上的硫酸基与羧基荷负电, 在电泳时有向正极移动的趋势. 由于这些基团被固定在多糖链上, 使 H_3O^+ 向阴极移动, 导致水向阴极迁移. 因此, 蛋白质分子在无电内渗琼脂糖凝胶等电聚焦电泳中可形成清晰的聚焦带, 而即使在低电内渗琼脂糖凝胶等电聚焦电泳中, 阴极飘移也很严重, 且有大量的水出现.

在《等电聚焦》^[5]一书中, 曾提到电内渗随所加电压的增加而增加. 本实验中 SDS 电

泳的电压为 250 V, Native 电泳的电压为 350 V, 等电聚焦电泳则高达 650 V. 所以在 SDS 电泳中, 琼脂糖电内渗高达 0.20 mr 时电泳也能顺利进行; 在 Native 电泳中, 琼脂糖电内渗为 0.08 mr 时就有大量水出现; 等电聚焦电泳中, 琼脂糖电内渗仅为 0.03 mr 就有严重的阴极漂移.

琼脂糖在形成具有网状结构的凝胶后, 粒子之间的距离还不是最小的. 它们继续相互作用, 使粒子进一步靠近至完全定向, 从而使凝胶骨架收缩. 在基本不改变外形的情况下部分液体从粒子间被挤压出来, 即离浆或收缩脱水 (syneresis). 所以琼脂糖凝胶或电极缓冲液凝胶条制成后, 需放置一段时间才能用于电泳. 如果立即使用, 在电泳过程中势必会导致除电内渗引起的水之外的本应属于离浆的那部分水的出现, 不利于电泳的进行. 另外, 随着放置时间的延长, 凝胶的弹性、内部结构坚固性也不断增加, 利于实验操作.

在实验中, 我们比较了放置不同时间的缓冲液凝胶条 (2 h、4 h、8 h、24 h、3 d、6 d、9 d 和 14 d) 在电泳中的效果. 在上述时间范围内, 放置时间越长, 效果越好, 但要注意胶条密封保湿. 出于节省时间的考虑, 我们选择静置 3 d.

目前, 国内尚没有无电内渗的琼脂糖产品. 如用国产低电内渗琼脂糖自制电极缓冲液凝胶条, 其价格仅是进口无电内渗琼脂糖制成的凝胶条的 1/8, 是进口商品凝胶条的 1/12.

参 考 文 献

- 1 Duckworth M, Yaphe W. The structure of agar. Carbohydr Res, 1971, 16: 189
- 2 郭尧君. SDS 电泳技术的实验考虑及最新进展. 生物化学与生物物理进展, 1991, 18 (1): 32~ 37
- 3 Smit V S. Native electrophoresis to monitor chemical modification of human interleukin 3. Electrophoresis, 1994, 15: 251~ 254
- 4 郭尧君. 薄层 (0.5 毫米) 聚丙烯酰胺和琼脂糖等电聚焦技术. 生物化学与生物物理进展, 1983, 3: 50~ 55
- 5 何忠效, 张树政, 郭尧君. 等电聚焦. 北京: 科学出版社, 1985. 82~ 83

The Effects of Electroendosmosis in Agarose on Electrophoresis. GUO Yaojun, LI Xinhui, FANG Yong (*Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*).

Abstract The effects of gel or electrode buffer strips using agarose with different electroendosmosis of 0, 0.03, 0.08, 0.20 mr on electrophoresis were studied. It was shown that only

agarose without electroendosmosis can be used for isoelectric focusing. The electrode buffer strips with different electroendosmosis did not affect SDS PAGE significantly but they affect Native PAGE in certain extent. The higher the electroendosmosis was, the more difficultly it ran.

Key words agarose, electroendosmosis, semi-dry electrophoresis, electrode buffer strips

^{15}N 标记蛋白 GAL4 (62) 的 2D NMR 实验*

涂光忠¹⁾ 张日清 赵南明

(清华大学生物科学与技术系, 生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京 100084)

摘要 利用自编的脉冲程序, 采用预饱和和自旋锁定对水峰进行双重抑制的方法, 得到了 ^{15}N 标记蛋白 GAL4 (62) 的 2D ^1H - ^{15}N HSQC、HSQC-NOESY、HSQC-TOCSY 谱, 并对这几个谱在蛋白质 ^1H 谱的归属中所起的作用进行了讨论.

关键词 异核去偶, HSQC, HSQC-TOCSY, HSQC-NOESY

近年来, 多维异核脉冲技术得到了迅速的发展, 与此同时, 用同位素标记蛋白在实践中也获得了成功, 两者相结合, 大大地提高了用核磁共振来研究蛋白质溶液构象的能力.

目前, 利用基因表达的方法, 我们可以获得 ^{15}N 标记蛋白. ^{15}N 标记不仅可以克服 ^1H 谱中峰重叠现象, 而且还可以建立起一种独立的有利于谱峰归属的途径, 同时, ^{15}N 标记也大大地促进了脉冲技术的发展, 从而为异核标记 NMR 技术的形成及应用打下了良好的基础.

^{15}N 标记样品的 ^1H - ^{15}N 相关实验的引入对于蛋白质的多维核磁共振研究的发展有很大的作用. 由于 ^{15}N 的磁旋比较小, 所以所得到的相关峰的线宽相对比较窄. 又 ^{15}N 共振峰的化学位移比较分散, 实践中, 对于许多大于 20 ku 的大蛋白质, 在给定的条件下, 大部分蛋白质的 ^1H - ^{15}N 相关峰都是可以分辨的. 而且在设计多维实验时, 简并的现象还可以大大

减少. 另外, 由于弛豫速度一般比 ^1H - ^{15}N 自旋偶合 ($\sim 90\text{Hz}$) 要慢得多, 所以对于分子质量低于 40 ku 的蛋白质来说, 相关交叉峰不会因为弛豫而明显减弱^[1].

由 ^1H - ^{15}N 异核相关实验 (2D 和 3D) 可得到蛋白质 ^1H 谱的归属和序列的指认. 由 ^1H - ^{15}N 相关得到很高的分辨率可以很大程度上消除酰胺 ^1H 的简并现象. 实际上, 对一些分子质量小于 20 ku 的蛋白质, 只用 ^{15}N 标记就可以很有效地进行序列的指认. 最常用的 2D ^1H - ^{15}N 异核相关实验有 HSQC、HSQC-TOCSY、HSQC-NOESY^[2]. 本文利用异核去偶, 在 Bruker AM-500 型超导核磁共振波谱仪上实现了 ^{15}N 标记蛋白 GAL4 (62) 的异核相关实验.

* 国家自然科学基金资助项目 (39330070).

¹⁾ 北京微量化学研究所, 北京 100091.

收稿日期: 1996-07-29, 修回日期: 1997-03-20