

无明显影响。

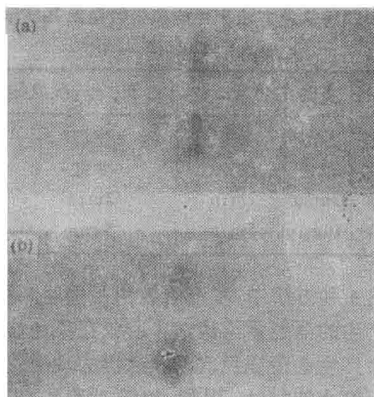


图 3 琼脂糖对 ^{32}P 探针 RNA 印迹分析结果的影响

(a) 改良法, 杂交液中加入 0.1% 琼脂糖

(b) 常规法, 杂交液中不加琼脂糖

琼脂糖凝胶中的标记探针在 105°C 3 min 后, 变性为单链, 可散在于 65°C 预热的杂交液中, 由于琼脂糖在 65°C 呈溶解状态, 故不影响核酸单链之间的特异性配对, 而且杂交体系内含有少量的琼脂糖有增强信号的作用, 其原理可能与杂交液中加入硫酸葡聚糖类似^[4]。

在改良法中试用聚丙烯酰胺凝胶代替琼脂糖, 将切下的聚丙烯酰胺凝胶块溶于 1 ml 含 7.5% β -巯基乙醇的 TBE 中, 加热助溶和变性后直接用于杂交, 也得到较好的结果。以聚丙烯酰胺凝胶分离标记探针, 是利用巯基乙醇破坏聚丙烯酰胺中的二硫键, 使网状凝胶成为可溶性的线性聚丙烯酰胺单链, 释放出探针而直接用于杂交^[4]。

3 改良法与常规法的比较

改良法制备分离探针有许多优点(图 1)。在常规

制备分离探针的方法中, 为获得纯化的目的核酸片段, 必须经过回收和纯化过程, 以消除琼脂糖等杂质对标记过程的抑制作用, 特别是在光敏生物素标记探针时, 对待标物的纯度要求较高, 因为待标物中的一些非目的 DNA、RNA 或蛋白质都能同时为光敏生物素标记, 从而直接影响到杂交结果的特异性^[5,6]。此外, 按常规法取得标记的探针后, 仍需进一步纯化以除去游离标记物, 减轻本底, 这一系列冗长的回收、纯化再纯化过程, 费时、费力, 并不可避免地造成探针量的损失。然而利用改良法, 先对混合片段全部标记, 然后再电泳分离, 选择目的片段经溶胶变性处理直接用于各种滤膜杂交。整个过程可在较短时间内完成, 步骤简单, 操作方便, 既省去了繁琐的回收纯化过程, 又避免了因此带来的探针损失, 而且标记后再电泳分离也起到纯化探针的作用。若在一个反应体系中需同时标记几个长度不等的探针, 按改良法先标记后电泳分离再选择使用, 亦将简化重复的标记过程, 带来方便和效率。

因此, 本文介绍的标记探针的快速简易制备方法, 省时省力, 不仅有利于实验室操作, 而且在临床基因诊断, 尤其光敏生物素探针快速诊断疾病的工作中会有较大的应用价值。

参 考 文 献

- 1 Cleveland D W *et al.* *Cell*, 1980; 20: 95
- 2 Chomczynski P *et al.* *Anal Biochem*, 1987; 162: 156
- 3 张贺秋等. 军事医学科学院院刊, 1990; 14(4): 309
- 4 Marotta R *et al.* *Anal Biochem*, 1983; 130: 27
- 5 Keller G H. *DNA Probes*. New York: M Stockon Press, 1990
- 6 McInnes J L. *Biotechnology*, 1987; 5: 269

凝胶上测定酪氨酸酶活性的几种方法

陈拔盛* 刘望夷

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

关键词 酪氨酸酶, 凝胶上测定酪氨酸酶活性

酪氨酸酶广泛存在于动植物及人体中, 是生物体合成黑色素的关键酶。如果人体缺乏酪氨酸酶, 或酪氨酸酶的活性不能表达, 则会导致白化病^[1]。因此, 酪氨酸酶活性的检测对于研究白化病发病的分子机制具有重要意义。

酪氨酸酶具有氧化酶的功能, 能将 L-多巴氧化成多巴醌, 多巴醌进一步变成黑色素。根据这个特性, 将

凝胶浸泡在多巴溶液里, 凝胶上的酪氨酸酶催化氧化溶液中的多巴, 在凝胶上有酶的部位形成黑色条带, 据此可检测出凝胶上的酪氨酸酶。酪氨酸酶还能把邻苯二酚氧化成邻苯醌。苯醌与酶蛋白结合, 生成红褐色

* 浙江大学生物科学与技术系 87 级毕业实习生。

收稿日期: 1991-06-25 修回日期: 1991-11-04

的复合物。当反应液里加进脯氨酸时,苯醌与脯氨酸发生加成反应,生成紫红色复合物^[2]。

当反应体系含邻苯二酚和 MBTH 的混合液时,氧化生成的苯醌与 MBTH 发生加成反应,生成深红色的复合物^[3]。

上述几种活性染色法操作都很简便,反应很灵敏,产生的条带肉眼可辨,是实验室测定酪氨酸酶活性较理想的方法。

1 材料与方法

电泳方法按文献[4]进行,非变性聚丙烯酰胺凝胶,分离胶 10%,浓缩胶 4.7%。3-甲基苯并噻唑酮腙(3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone hydrochloride, MBTH), L-多巴为 Sigma 公司产品,邻苯二酚为上海试剂总厂产品,脯氨酸为上海生化所东风生化公司产品。

粗酶样品从土豆,乌骨鸡皮和来亨鸡皮中提取,从土豆中提取酪氨酸酶的方法按文献[5]进行,从乌骨鸡皮和来亨鸡皮中提取酪氨酸酶的方法如下:20g 鸡皮放在 100ml 的 0.1mol/L 磷酸缓冲液里(pH6.8),冰浴匀浆,于 4℃ 搅拌过夜,然后离心(13000g, 20min),上清液对 4000ml 的 10mmol/L NaCl 水溶液透析 24h,中间换两次透析液,离心(13000g, 20min),取上清液 200μl,加等体积的缓冲液(20% 蔗糖, 1.5% Tris),混匀,即可电泳。酪氨酸酶抽提液放置 4℃ 至少可保存两周。

染色方法:取下凝胶,先后用 50ml 的 0.4mol/L 和 0.2mol/L 磷酸缓冲液(pH 6.8)浸洗 10min,然后根据染色方法的不同,将凝胶浸泡在相应的反应液里。

a. 多巴染色液:100ml 磷酸缓冲液(0.1mol/L, pH6.8, 含 10mmol/L L-多巴); b. 邻苯二酚染色液:100ml 磷酸缓冲液(0.1mol/L, pH6.8, 含 5mmol/L 邻苯二酚); c. 邻苯二酚-脯氨酸染色液:100ml 磷酸缓冲液(0.1mol/L, pH 6.8 含 3mmol/L 脯氨酸, 5mmol/L 邻苯二酚); d. MBTH 染色液:80ml 磷酸缓冲液(0.05mol/L, pH6.8, 含 10mmol/L 邻苯二酚), 0.03% MBTH 溶于 20ml 无水乙醇,使用前将两部分混匀。

凝胶在上述染色液浸泡一定时间,等酪氨酸酶条带颜色充分显现后,用蒸馏水冲洗凝胶数次,抽干后可以长期保存。

2 结果与讨论

本文报告的 4 种染色方法都很灵敏,反应条件简单,所需时间很短,适用于在凝胶上快速测定酪氨酸酶的活性。各种染色方法产生的条带颜色及其显示时间

见表 1。

表 1 四种染色方法产生的条带颜色及其显示时间
(土豆酪氨酸酶)

染色方法	多巴	邻苯二酚	邻苯二酚-脯氨酸	MBTH
反应温度	37℃	室温	室温	室温
条带颜色	棕色	红褐	紫红	深红
初显时间	5min	2min	2min	2min
终止时间	40min	5min	5min	10min

上述 4 种方法中,多巴染色法所需时间相对较长,但此法产生的黑色素很稳定,凝胶在染色液里浸泡过夜也不会产生条带褪色或背景太深的现象。染色后的凝胶泡在终止液(50% 甲醇, 12% 冰乙酸)里,可长期保存。因此,操作比较方便。另外,这种方法比较适合于测定鸡皮中的酪氨酸酶活性。因为 L-多巴在 37℃ 时比较稳定,其溶液在空气中自动氧化的速度相对较慢,为酪氨酸酶的催化氧化作用提供了足够长的反应时间,从而在凝胶上形成特异性很高的条带。从硝酸银染色的结果看,来亨鸡皮和乌骨鸡皮的粗提液里有许多种蛋白质,但在多巴染色法里,只有其中一种蛋白质(即酪氨酸酶)被显示出来,表现出极高的特异性(图 1)。这个实验结果同时表明,两种鸡皮的酪氨酸酶活性及其电泳行为无明显差异。但是用这种方法

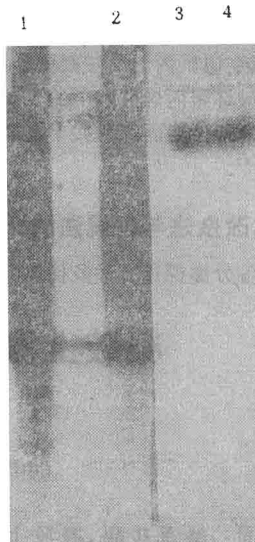


图 1 多巴染色法与银染色法的比较

(1)(3) 为乌骨鸡皮酪氨酸酶抽提液; (2)(4) 为来亨鸡皮酪氨酸酶抽提液。其中(1)(2)为硝酸银染色, (3)(4)为多巴染色

测定土豆和乌骨鸡皮的酪氨酸酶活性时,发现两种不同来源的酪氨酸酶的迁移率和活性存在很大差别(图 2)。

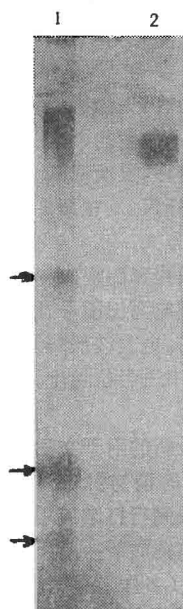


图 2 土豆和乌骨鸡皮的酪氨酸酶电泳行为的比较
(多巴染色法)

(1) 为土豆酪氨酸酶抽提液, 图中箭头所示为酪氨酸酶条带, (2) 为乌骨鸡皮酪氨酸酶抽提液

在相同的条件下, 土豆酪氨酸酶的条带在保温 1h 后即已充分显色, 而乌骨鸡皮酪氨酸酶的条带则在保温 10h 后才显示出来。两者不同的迁移率可能是由于酶分子的空间或化学结构不同或等电点的不一样。上述结果似乎说明: 物种亲缘越远, 酪氨酸酶的结构和活性相差越大。这一点有待进一步研究。

利用本文的 4 种方法测定土豆中酪氨酸酶的活性, 都得到两条以上迁移率不同的条带 (图 3)。这表明土豆中至少存在两种空间或化学结构不同或等电点不一样的酪氨酸酶。

邻苯二酚染色法和邻苯二酚-脯氨酸染色法的产

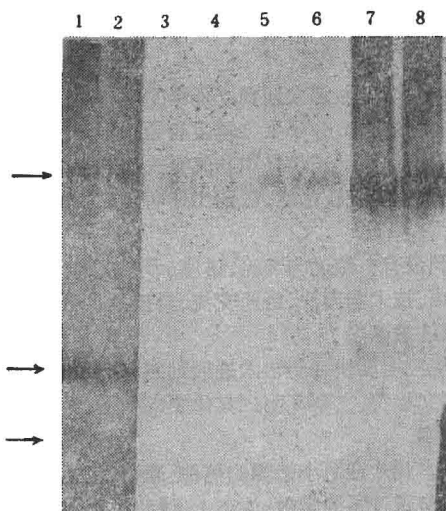


图 3 土豆酪氨酸酶活性的 4 种测定方法

(1)(2) 为多巴染色法; (3)(4) 为邻苯二酚染色法;
(5)(6) 为邻苯二酚-脯氨酸染色法; (7)(8) 为 MBTH
染色法。酪氨酸酶条带如图中箭头所示

物都不很稳定。当凝胶在染色液中浸泡时间较长时, 与酶的位置相对应的条带会渐渐褪色以至完全消失。因此, 在条带颜色充分显示后, 应立即进行光密度扫描分析, 或直接拍照。

参 考 文 献

- 1 季立才, 生命的化学, 1991; 11(1): 3
- 2 Leszek M R *et al.* *Anal Biochem*, 1989; 179: 375
- 3 Nellaiappan K *et al.* *Stain Technol*, 1986; 61: 269
- 4 Hames B D 等著, 刘毓秀, 程桂芳译, 蛋白质的凝胶电泳: 实践方法. 北京: 科学出版社, 1986: 1—47
- 5 朱綺琴等, 化学通报, 1987; (5): 50

欢迎订阅《细胞生物学杂志》

邮发代号: 4-296, 季刊, 48 页, 单价: 1.00 元。主办单位: 中国细胞生物学学会, 中国科学院上海细胞生物研究所。编辑部地址: 上海市岳阳路 320 号。电话: 4315030-36, 邮

码: 200031。报道内容: 细胞生物学领域内最新进展综述, 研究报告, 实验技术, 新技术介绍, 经验交流, 译著、讲座、动态与名词讨论等。本刊还辟有教学园地栏目。