

烤 2 h. 55℃ 预杂交、68℃ 杂交 6~12 h (杂交液为 6×SSPE、5×Denhardt、0.2% SDS, 100 μg 鱼精 DNA, 探针 200 μg/L, 或直接用标记的 PCR 产物 6 μl). 探针敏感性试验是将非标记 PCR 产物连续 10 倍稀释, 由 2 g/L 至 20 μg/L 分 6 个浓度, 各取 1 μl 点膜. 交叉杂交试验是用一种探针对各病例 PCR 产物进行杂交. 化学发光检测按照北京医科大学试验盒说明进行.

2 结果与讨论

TCR Vδ2-Dδ3 基因片段是一较有用的重排亚型, 利用其作为急性淋巴细胞白血病克隆特异性标志, 能更敏感地检测残留白血病细胞. 本文以巢式 PCR 在第二轮扩增中将生物素成功地掺入 Vδ2-Dδ3 扩增片段中, 标记为每个患者的克隆特异性探针, 将其用于残留白血病细胞的检测, 较 Yokota 等^[3]采用的放射性核素标记, 具有方法简单, 无放射性危害, 保存时间长, 取用方便等优点.

用所获得的 9 个病例的探针, 分别检测各自缓解期内残留的白血病细胞. 有 6 个病例获得阳性结果, 其中有 4 例连续二次检测阳性, 并在以后随访中临床复发. 另 3 例检测阴性者仍在观察中. 上述表明该探针能用于早期病情复发的监测. 最近 Steenbergen 等^[4]采用该基因片段为标志, 结合 PCR 扩增和探针杂交检测白血病患者体内残留的白血病细胞, 获较满意的结果, 进一步支持利用 TCR Vδ2-Dδ3 基因片

段为克隆特异性标记, 检测残留白血病细胞具有一定的临床应用价值.

参 考 文 献

- 1 van Dongen J J M, Wolvers-Tettero I L M. Clin Chim Acta, 1991; 198 (1~2): 1
- 2 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis J. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; 9.16
- 3 Yokota S, Hansen-Hagge T E, Lidwig W D *et al.* Blood, 1991; 77 (2): 331
- 4 Steenbergen E J, Verhagen O J H M, van Leeuwen E F *et al.* Leukemia, 1995; 9 (1): 216

Amplifying TCR Vδ2-Dδ3 Fragment by PCR and Its Clinical Value. Li Xinquan, Zheng Min (Second University Hospital, West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041, China); Li Xinyue (Medical School of Dalian University, Dalian 116012, China).

Abstract Incorporating biotin-11-dUTP, the rearranged fragment Vδ2-Dδ3 of T cell receptor gene has been amplified by nest PCR from bone marrow DNA of acute lymphoblastic leukemic patients to get biotin-labeled leukemic clonospecific probe for detection of minimal leukemic cells. The initial results of dot hybridization show that the clonospecific probes are sensitive and specific for identifying residual leukemic clone in clinical practice.

Key words PCR, leukemia, TCR, probe

一种鉴定过氧化氢酶活性的铁染色法*

董泗建 刘昌玲

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 技术, 建立了一种新的鉴定过氧化氢酶活性的方法——铁染色法. 结果表明, 细菌过氧化氢酶及牛肝过氧化氢酶显示单一的酶活性带. 该方法操作简单、快速、灵

敏度高、专一性强, 是一种切实可行的鉴定过氧化氢酶活性染色法。

关键词 过氧化氢酶, 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 铁染色法

聚丙烯酰胺凝胶电泳后一般采用考马斯亮蓝染^[1], 银染^[2]及铜染^[3]等方法, 但这些染色方法有一定的局限性, 仅适用于蛋白质的染色, 不适宜酶活性染色。我们参考Woodbury等^[4]的方法, 并加以改进, 建立了一种简便快速、灵敏、专一性强的酶活性铁染色法, 首次用于鉴定细菌及牛肝过氧化氢酶的活性, 国内未见报道。

1 原理

过氧化氢酶在聚丙烯酰胺凝胶电泳凝胶板上能分解过氧化氢, 生成水和氧, 而没有被酶分解的过氧化氢, 仍可使高铁(Fe^{3+})还原为带普鲁氏蓝的亚铁化合物, 凝胶背景显示蓝色, 酶区域显示出淡亮黄色的区带, 可作为鉴定过氧化氢酶活性的特征。

2 材料

电泳仪、直流稳压电源及恒温控制水浴; Pharmacia LKB 公司产品; 垂直夹心电泳槽; 北京六一厂产品; 1.5 mol/L Tris-HCl pH 8.9 的分离胶缓冲液; 1.0 mol/L Tris-HCl pH 6.8 的浓缩胶缓冲液; 29% 丙烯酰胺和 1% N-N'-亚甲双丙烯酰胺的贮备液; N, N, N', N'-四甲基乙二胺; 40% 蔗糖; 1% 过硫酸铵; 25 mmol/L 三羟甲基胺基甲烷, 192 mmol/L 甘氨酸缓冲液 pH 8.3。凝胶浓度: 浓缩胶为 4%, 分离胶为 7%。

3 方法

3.1 电泳

5 mA, 10 min; 15 mA, 4 h; 温度为 5℃。

3.2 蛋白染色 染色方法按文献 [1]

3.3 酶活性染色

电泳后的凝胶板先用冷蒸馏水洗 3 次, 用滤纸将剩余的水吸干, 倒入 0.03% H_2O_2 液, 轻轻摇动凝胶板 10 min, 弃去 H_2O_2 液, 用蒸馏水洗 3~4 次, 尽量将 H_2O_2 洗干净, 滤纸吸干, 接

着加入含有 2% 三氯化铁, 2% 铁氰化钾染色液 (1:7), 轻轻摇动凝胶 5 min, 出现亮黄色带, 弃去染色液, 用蒸馏水洗 3 次。

4 结果与讨论

4.1 酶量与活性带大小的关系

在凝胶电泳板上设 A、B、C、D、E 和 F 孔, 从左到右分别加入细菌过氧化氢酶 0.0001、0.001、0.01、0.1、1 和 10 μg 。当电泳结束后, 立即进行酶活性染色。结果显示 (图 1), 随酶量的增加亮黄色的酶活性电泳带增大, 显示出良好的量效关系, 最小鉴定量可达到 0.1 ng 水平, 灵敏度高。

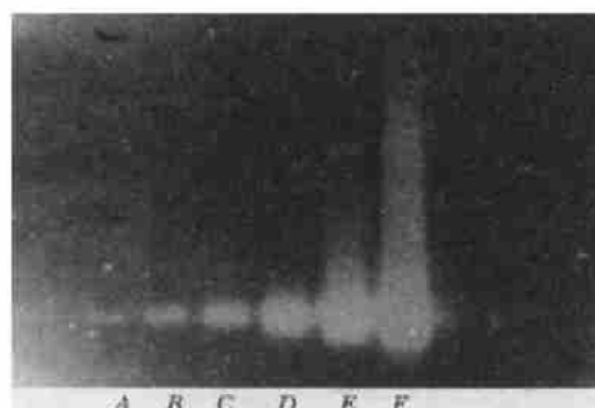


图 1 细菌过氧化氢酶量效关系

A~F, 分别表示加入 0.0001、0.001、0.01、0.1、1 和 10 μg 细菌过氧化氢酶。

4.2 过氧化氢酶活性鉴定

将同一块电泳凝胶板一分为二, 左边为 A 板, 分别加入牛血清白蛋白 2.5 μg , 细菌过氧化氢酶 0.1 μg , 牛肝过氧化氢酶 0.3 μg , 蟾蜍血清酶 10 μg , 右边为 B 板, 分别加入牛血清白蛋白 2.5 μg , 细菌过氧化氢酶 10 μg , 牛肝过氧化氢酶 15 μg , 蟾蜍血清酶 10 μg 。当电泳结束后, 将凝胶板分成两块, 立即将 A 板进行酶活性染色, B 板蛋白染色。结果显示, 蛋白染色 B 板 (图 2) 牛血清白蛋白、细菌过氧化氢酶、牛肝过氧化氢酶及蟾蜍血清酶都能显示出清晰的

蛋白区带, 酶活性染色 A 板 (图 3) 只有细菌过氧化氢酶和牛肝过氧化氢酶显示出酶活性单

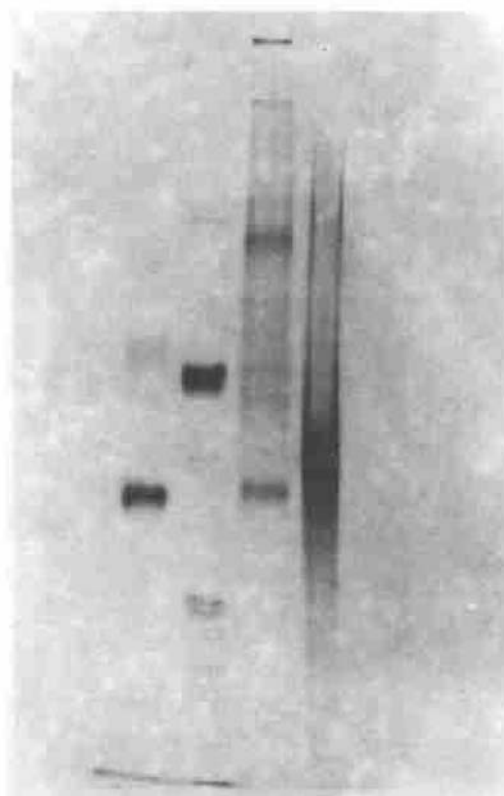


图 2 考马斯亮蓝染色蛋白区带

1: 牛血清白蛋白; 2: 细菌过氧化氢酶;
3: 牛肝过氧化氢酶; 4: 蟾蜍血清酶。



图 3 过氧化氢酶活性鉴定

1: 细菌过氧化氢酶; 2: 牛肝过氧化氢酶。

一带, R_f 值分别为 0.48、0.29, 同蛋白染色 R_f 值基本一致, 而牛血清白蛋白和蟾蜍血清酶就没有显示出这种活性带, 这说明铁染色法对过氧化氢酶活性鉴定具有专一性。

铁染色法鉴定过氧化氢酶活性有如下特点, 操作简单, 染色时间短, 只需 5 min 就能显示出酶活性结果。具有专一性, 可与其他蛋白和酶进行区别, 达到定性目的。灵敏度高, 最低鉴定酶量可达到 0.1 ng, 酶量在 0.0001~10 μ g 范围内呈良好的量效关系。因此, 采用铁染色法鉴定细菌过氧化氢酶活性是一种切实可行的方法。本法的建立, 为将来寻找新的过氧化物酶同工酶, 进一步研究这种酶的功能及化学特性提供了一种可靠的鉴定手段和依据, 扩大了聚丙烯酰胺凝胶电泳技术的应用。

参 考 文 献

- 1 Weber K, Osborn M. J Biol Chem, 1969; 244: 4406
- 2 Switzer R C, Merrill C R, Shifrin S. Anal Biochem, 1979; 98: 231
- 3 Lee C, Levin A, Branton D. Anal Biochem, 1987; 166: 308
- 4 Woodbury W, Spencer A K, Stehmann M A. Anal Biochem, 1971; 44: 301

An Iron Staining Method for Determination of Catalase Activity. Dong Sijian, Liu Changling (Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China).

Abstract An iron staining method for the determination of catalase activity based on the polyacrylamide gel electrophoresis technique was established. The results indicated that both bacterial catalase and bovine liver catalase showed unique band in the gel. This staining method was convenient, quick and sensitive for the measurement of catalase activity.

Key words catalase, polyacrylamide gel electrophoresis, iron staining