

- liquid chromatography-fluorescence detection method for endogenous γ -aminobutyric acid validated by mass spectrometric and gas chromatographic techniques. *Anal Chem*, 1988, **60**: 649~ 651
- 9 Petty F. Plasma concentrations of γ -aminobutyric acid (GABA) and mood disorders: a blood test for manic depressive disease. *Clin Chem*, 1994, **40** (2): 296~ 302
 - 10 Paul A H, David S, Jeffrey K, *et al.* Amino acid analysis using derivatisation with 9-fluorenylmethyl chloroformate and reversed-phase high performance liquid chromatography. *J chromatogr*, 1991, **540**: 177~ 185
 - 11 Grossman M H, Hare T A, Manyam N V B, *et al.* The stability of GABA levels in CSF under various conditions of storage. *Brain Res*, 1980, **182**: 99~ 106
 - 12 Shen Z-J, Dong Y-H, Yang S-D. Determination of γ -aminobutyric acid in serum and its application in diagnosis and treatment for child mental retardation. 7th Asian-Pacific Congress of Clinical Biochemistry, Thailand: Bangkok, 1995. PS3-22: 210

Determination of γ -aminobutyric Acid in Serum by Reverse-phase High Performance Liquid Chromatography. SHEN Zu-Jun, WANG Zhi-Guo, LI Xiao-Peng, HU Cu-Hua, YANG Shu-De (*National Center for Clinical Laboratory, Beijing Hospital Compound, Ministry of Public Health, Beijing 100730, China*).

Abstract A new highly sensitive HPLC method for determination γ -aminobutyric acid (GABA) in serum was developed by precolumn derivatiza-

tion of GABA with 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOG-Cl) using ϵ -aminocaproic acid as an internal standard. The column used was Shimadzu CLC-ODS (M), 4.6 mm $\times$ 150 mm, 5 μ m. Mobile phase A consisted of sodium acetate buffer (0.05 mol/L, pH 3.65) / water / tetrahydrofuran / glacial acetic acid (250/100/15/2.2). Mobile phase B was acetonitrile / methanol (4/1). The conditions of derivatization and chromatography were studied to find a optimal procedure, which included pH value, reaction time, ionic strength and amount of derivatizing reagent. The coefficient of variance of the method was less than 4.6% for within runs, 6.1% for between runs, respectively. The minimal detection limit ($S/N = 2$) was 3.1 nmol/L. The linearity was observed from 10 to 1 000 nmol/L, and the coefficient of determination was 0.9992. The average recovery was 97.1%.

Key words γ -aminobutyric acid (GABA), reversed-phase high performance liquid chromatography, 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOG-Cl)

高分辨电泳分离短串联重复序列 DNA 片段*

郭大玮 郎海丽 徐晓莉

(山西医科大学法医系, 太原 030001)

J. C. J. EIKENBOOM, R. M. BERTINA

(莱顿大学医院血液学系出血与血栓研究中心, 荷兰)

摘要 采用多相缓冲系统, 在成层胶 $T = 5\%$, $C = 2.6\%$, 分离胶 $T = 8\%$, $C = 5\%$ 的条件下用聚丙烯酰胺凝胶电泳对人类短串联重复序列 (STR) DNA 片段进行分离. 其中, 成层胶内主要缓冲成分为 2-二羟乙基亚胺-三羟甲基甲烷 (Bis) 、 H_2SO_4 及 N-N'-2 (羟乙基) 甘氨酸 (Bicine); 而分离胶以 Tris 、 H_2SO_4 及 2-二羟乙基亚胺-三羟甲基甲烷 (Bis) 为主, 构成多相缓冲系统. DNA 片段在成层胶中被有效地压缩, 在分离胶内又可完全解压缩, 使其按片段大小分离; 从而达到提高分辨率的目的.

* 山西省青年自然科技基金及山西省教委青年学科带头人培养对象基金资助.

收稿日期: 1997-08-12, 修回日期: 1998-01-07

关键词 成层胶, 分离胶, 短串联重复序列

学科分类号 Q503

短串联重复序列多态性是高度多态的遗传标记. 广泛应用于染色体连锁分析, 疾病基因的确, 产前诊断, 父权鉴定以及法医学检验领域中. 由于短串联重复序列 DNA 片段差异只有 2~4 个核苷酸, 通常采用分辨率较高的聚丙烯酰胺凝胶电泳. 缓冲系统常用 Tris-硼酸-EDTA (TBE), 但由于这一缓冲系统只在分离胶中工作, 因此限制了其分辨率, 使得有效分离距离常常大于 20 cm. 如此电泳时间长、凝胶体积大, 不便于染色等便成了这一缓冲系统的主要问题. 1991 年 Wiltfang 等^[1]利用微型胶缓冲系统分离 SDS-蛋白质复合物, 得到了较好的分离效果, 由于本缓冲系统能在成层胶中较好地使所要分离的 SDS-蛋白质复合物压缩成层, 而当其进入分离胶中又能够完全解压缩 (destacking), 使得分辨率大大提高. 缩短分离距离, 仍然能够取得较好的分离效果. 本文将此缓冲系统用于人类短串联重复序列 DNA 片段的分离提高了电泳分辨率, 兹介绍如下:

1 材料与方法

1.1 材料

聚丙烯酰胺凝胶支持膜、N, N-2 (羟乙基) 甘氨酸 (Bicine)、2-二羟乙基亚胺-三羟甲基甲烷 (Bis) 购自 Sigma 公司. 1 kb DNA 梯度标记由 GIBCO BRL Life Technologies Inc. 生产. dNTP 及 Taq DNA 多聚酶分别为 Pharmacia (Uppsala, Sweden) 公司及 PE 公司产品. 电泳在 LKB 2117 多用电泳槽中进行 (Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden).

人类 vWF 基因内含子 40 STR 区域由下列引物 (莱顿大学医院合成) 引导扩增: 5'-TGTACCTAGTTATCTATCCTG-3', 5'-GTGATGATGATGGAGACAGAG-3' (31/nt 2215~2380 根据 Mancuso 等^[2,3]资料). STR 的等位基因片段大小范围为 154~182 bp, 等

位基因标准片段由已测序的样品混合而成. DNA 样品来自健康人白细胞.

1.2 方法

1.2.1 PCR 方法: PCR 反应液的成分为: 0.5 μ mol/L 引物, 1 mmol/L dNTP, 10 μ g 牛血清白蛋白, 67 mmol/L Tris-HCl (pH 8.8), 6.7 mmol/L $MgCl_2$, 10 mmol/L β -巯基乙醇, 6.7 μ mol/L EDTA, 16.6 mmol/L $(NH_4)_2SO_4$, 2.5 U 的 Taq DNA 多聚酶, 反应总体积 100 μ L. PCR 循环条件为: 94 $^{\circ}C$ 变性 4 min, 然后进入下列循环, 变性 94 $^{\circ}C$, 40 s, 复性 55 $^{\circ}C$, 30 s, 延伸 72 $^{\circ}C$, 40 s. 30 个循环.

1.2.2 凝胶制备及电极缓冲液成分: 自制非变性聚丙烯酰胺凝胶体积为 95 mm $\times$ 65 mm $\times$ 0.5 mm, 其中分离胶长 75 mm, 成层胶长 20 mm (8 mm 为成层区, 2 mm 为点样区, 10 mm 为缓冲液条接触区). 成层胶浓度为 5.0%, 交联度为 2.6%, 凝胶缓冲液为 0.4 mol/L 2-二羟乙基亚胺-三羟甲基甲烷 (Bis), 0.1 mol/L H_2SO_4 , 8% 甘油, pH 6.7. 分离胶浓度为 8%, 交联度为 5%, 以 Tris 0.4 mol/L, H_2SO_4 0.1 mol/L 作为缓冲系统, 8% 甘油, pH 8.6. 负极电极液为 0.4 mol/L N, N-2 (羟乙基) 甘氨酸 (Bicine), 0.2 mol/L NaOH, pH 8.2. 正极电极液为 0.4 mol/L Tris, 0.1 mol/L H_2SO_4 , pH 8.1. 用高密度海绵汲取正负电极缓冲液, 以等电聚焦电泳电极接触海绵通电.

1.2.3 电泳及染色条件: 样品同载样液以 1:1 稀释, (载样液: 溴酚蓝溶于双蒸水中, 终浓度为 0.025%). 电泳条件: 最大电流, 电压分别为: 25 mA, 350 V, 电泳时间 45~60 min, 电泳温度为 10 $^{\circ}C$. 银染色条件如下: 20% 三氯醋酸, 20 $^{\circ}C$, 5 min, 5% 戊二醛 20 $^{\circ}C$, 10 min, 20 $^{\circ}C$ 水洗两次各 5 min. 0.4% 硝酸银 20 $^{\circ}C$, 18 min, 20 $^{\circ}C$ 水洗两次各 5 min, 于 0.014% 福尔马林、5% 碳酸钠溶液中显色 15 min, 最

后在 20℃ 5% 醋酸中停显 8 min.

2 结 果

人类 vWF 因子基因内含子 40 STR 等位基因片段大小分别为: 182 bp, 174 bp, 170 bp, 166 bp, 162 bp, 158 bp 及 154 bp,

在本电泳系统中已清楚地分开. 图 1 显示 von Willebrand 因子基因内含子 40 中 STR 的等位基因的片段, 不同等位基因之间片段长度仅差 4 bp, STR 中各个等位基因数字 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 分别含 14, 13, 12, 11, 10, 9 及 16 个 TCTA 重复子.

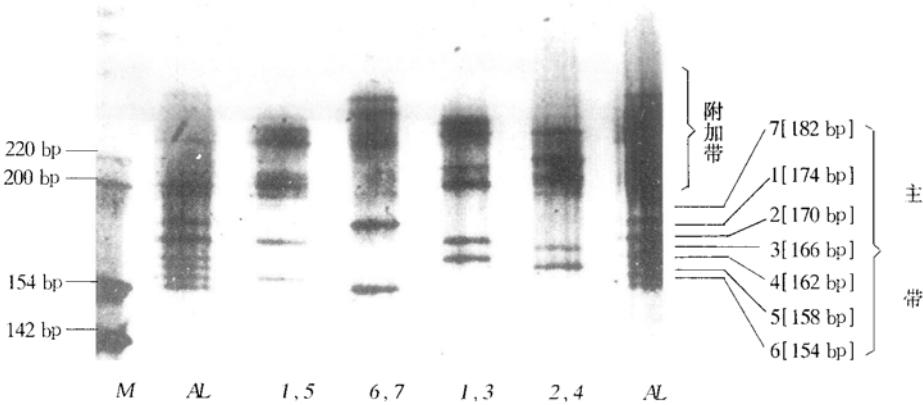


图 1 人类 von Willebrand 因子基因内含子 40STR 扩增产物电泳图

AL: 等位基因标准, 数字表示等位基因序号; M: 分子质量标准 (1 kb Ladder, GIBCOBRL Life Tech. Inc.).

3 讨 论

在本电泳系统中, 成层胶以 2-二羟乙基亚胺-三羟甲基甲烷 (Bis-tris) 及 SO_4^{2-} 为先导离子, N, N-2 (羟乙基) 甘氨酸 (Bicine) 为尾随离子, 二者之间于成层胶中形成了较大的电压降, 其尾随离子的净迁移率为 -0.11, 使 DNA 居中并被压缩成窄带, 进入分离胶后, 前述电压降消失, Tris-SO_4^{2-} 成为先导离子, 2-二羟乙基亚胺-三羟甲基甲烷 (Bis-tris) 及 SO_4^{2-} 为尾随离子, 此时影响 DNA 泳动的主要因素是胶浓度及交联度, 由于分离胶的凝胶孔径变小, 胶浓度 (T) 及交联度 (C) 分别已由 5% 变为 8%, 由 2.6% 变为 5%, 因此, DNA 在分离胶中能够按其片段大小得到有效的分离. Wiltfang 等首先利用这一系统进行蛋白质-SDS 复合物的微型胶分离. 本试验中, 多相缓冲系统的条件有所改变以使其适于分离短串联重复序列等位基因片段: 通过增加两电极条的离子强度, 使其缓冲能力得以加强, 从

而消除了谱带弯曲现象, DNA 片段分离完毕其电流仍可保持 8 mA 左右, 说明此缓冲系统有足够的缓冲能力使分离完成; 将电压, 电流最高值预置在 350 V, 25 mA 范围可以有效地防止凝胶烧毁, 在本实验条件下, 电泳分离可在 45~ 60 min 之内完成.

综上所述, 由于这一电泳系统的成层胶能对被分离的 DNA 进行有效的“带压缩”, 在分离胶中又能完全解压缩, 使其具有很高的分辨率, 因而可作为常规 STR 分析方法.

参 考 文 献

1 Wiltfang J, Arold N, Neuhoﬀ V. A new multiphasic buffer system for sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of proteins and peptides with molecular masses 10000-1000, and their detection with picomolar sensitivity. Electrophoresis, 1991, 12 (2): 352~ 366
2 Mancuso D J, Tuley E A, Westfield L A, et al. Structure of the gene for human von willebrand factor. J Biol Chem, 1989, 264 (33): 19514~ 19527
3 Ploos van Amstel H K, Reitsma P H. Tetranucleotide repeat polymorphism in the vWF gene. Nucleic Acids Res, 1990, 18 (16): 4957

Seperating Short Tandem Repeat DNA Fragments by High-resolution Electrophoresis.

GUO Da-Wei, LANG Ha-Li, XU Xiao-Li (*Department of Forensic Serology Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China*); J. C. J. EIKENBOOM, R. M. BERTINA (*Department of Hematology, Hemostasis and Throbosis Research Center, Unversity Hospital Leiden, 2300 RC, Leiden, The Netherlands*).

Abstract A multiphasic buffer system was used

to seperate the human short tandem repeat DNA fragments. In stacking gel the main content of buffer were bistris, sulfuric acid and bicine while tris, sulfuric acid and bistris play a major role in seperating gel. The DNA fragments, which can be stacked efficiently in stacking gel and destacked completely in seperating gel, were seperated according to their size. By this way the high-resolution results can be achieved.

Key words stacking gel, seperating gel, short tandem repeat DNA fragment

重组中国汉族人源 γ -干扰素的纯化和鉴定*

王清明 毕建进 范国才 陈惠鹏 蒋中华 魏汉东 贺福初

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 在 *E. coli* 中高表达的中国汉族人源 γ -干扰素是以包涵体的形式存在的, 包涵体经各种溶液洗涤后, 用 8 mol/L 尿素裂解, 裂解上清在 8 mol/L 尿素存在下, 经离子交换柱层析和凝胶过滤两步纯化, 得到纯度大于 95% 的 γ -干扰素, 稀释复性后, 其比活为 5.5×10^5 U/mg. 激光解析电离质谱分析表明, 中国汉族人源 γ -干扰素的分子质量为 17.32 ku, 其 N 端序列与 Gray 等报道的 γ -干扰素 N 端序列一致. 中国汉族人源 γ -干扰素的氨基酸组成分析结果也与其理论值相吻合.

关键词 γ -干扰素, 中国汉族人源 γ -干扰素, 包涵体, 尿素, 复性

学科分类号 Q78

干扰素 (interferon, IFN) 是由多种细胞因子组成的异源家族. 诱导细胞对病毒感染产生抗性是干扰素家族共有的生物学活性. 大多数的干扰素可归属于三个亚类, 即 α , β 和 γ 干扰素, 其中 γ -干扰素 (IFN- γ) 又称免疫干扰素, 与 α 、 β 亚类的干扰素相比, IFN- γ 具有更强的免疫调节功能和抗细胞增殖效应^[1,2]. 根据贺福初等^[3] 分子进化规律的预测, 东西方人群间 IFN- γ cDNA 存在序列多态性. 鱼咏涛等^[4] 的报道证实了这一预测, 即中国汉族人源 IFN- γ cDNA 与 Gray 等^[5] 报道的 IFN- γ cDNA 序列存在两个核苷酸位点的差异, 应该导致 IFN- γ 在蛋白质水平上存在一

个氨基酸位点的差别. 为进一步开发、利用中国汉族人源 IFN- γ , 我们对大肠杆菌中高表达的中国汉族人源 IFN- γ 进行了变性、复性、纯化和鉴定.

1 材料和方法

1.1 工程菌的发酵

参阅文献 [6].

1.2 包涵体的提取、洗涤和裂解

表达菌体用 50 mmol/L Tris-HCl

* 国家自然科学基金重点项目 (39730310) 和军事医学科学院开发基金资助项目.

收稿日期: 1997-07-31, 修回日期: 1997-11-10