

胎儿血红蛋白 $G\gamma$ 与 $A\gamma$ 电泳区带的双波长扫描法定量

刘永明 南国华 张更荣*

(江西医学院生物化学教研室,南昌)

提 要

用双波长扫描法测定改良 Triton X-100 酸性尿素聚丙烯酰胺凝胶电泳法^[6]分离的 $G\gamma$ 和 $A\gamma$ 链比值,具有准确、快速和步骤简便等优点。将凝胶干燥后作区带的双波长扫描定量,不影响测定结果,有利于标本的长期保存和进行大量的筛选工作。

胎儿血红蛋白 (HbF) 分子 γ 链分为 $G\gamma$ 和 $A\gamma$ 两类。于 γ 链第 136 位上,前者为甘氨酸,后者为丙氨酸。它们分别是类 β 基因簇中 $G\gamma$ 和 $A\gamma$ 基因的表达产物。新生儿的 $G\gamma$ 与 $A\gamma$ 比值 ($G\gamma/A\gamma$ 值)大多为 7:3 左右,少数个体有偏离,提示该 γ 链基因型可能有改变^[1-3]。此外, $G\gamma$ 和 $A\gamma$ 基因的表达,在个体发育过程中会发生变化,使 $G\gamma/A\gamma$ 值由新生儿的 7:3 转变为成人的 4:6^[4-5]。因此, $G\gamma/A\gamma$ 值的测定,在人类的遗传变异和多基因调节机制的研究中,均有重要价值。

材 料 与 方 法

一、仪器与试剂

1. 日本岛津公司产 CS-930 型双波长薄层色谱扫描分析仪。
2. Dy-600 型中压电泳仪。
3. ZVS-140 型垂直板状电泳槽 (中国科学院动物研究所设计,江苏吴县科学仪器厂生产)。
4. 试剂及其配制 按文献^[6]。

二、样品及电泳

1. 溶血液的制备 按文献^[7]将 ACD 抗凝的脐血制成 10% 溶血液。
2. Hb 解链样品的制备 按文献^[6]配制

解链液,电泳前与溶血液按 50:1 混合,制成 Hb 解链样品。

3. $G\gamma$ 与 $A\gamma$ 链的电泳分离 用改良 Triton X-100 酸性尿素 PAGE (聚丙烯酰胺凝胶电泳)法进行。电泳缓冲液为 5% 醋酸液,200 伏恒压电泳 6 小时,取胶后用考马斯亮蓝 G250 染色。详见文献^[6]。

三、凝胶干燥与保存

先将一张用蒸馏水浸湿的玻璃纸覆盖于比凝胶面积略大的玻璃板上,然后小心地将漂洗好的凝胶铺上,再覆盖一张浸湿玻璃纸,轻压排除气泡。四周用铁夹夹紧,置于通风处干燥两天左右即得到干燥的凝胶片。长期保存最好放在干燥器中。

四、扫描条件

1. 波长 样品波长 (λ_s) 为 585 nm; 参比波长 (λ_R) 为 520 nm。
2. 狭缝 宽与高为 0.4×3 mm。
3. 扫描方式 透射式,线性扫描。

结 果 与 讨 论

一、脐血 Hb 解链样品的电泳图谱

脐血 Hb 解链样品经改良 Triton X-100

* 江西省医学科学研究所生物化学技术室。

酸性尿素 PAGE 可得到四条清晰整齐的区带,从负极到正极的排列顺序为 α 、 β 、 γ 和 γ , 见图 1 (见图版 IV)。

二、扫描波长的选择

脐血 Hb 解链样品经电泳分离与考马斯亮蓝 G250 染色后,选择一着色适宜的区带测吸收光谱。该光谱吸收曲线在 520nm 处开始上升,至 585nm 时达最大(见图 2)。因此,本方法的扫描参数 λ_s 和 λ_R 分别为 585nm 和 520nm。

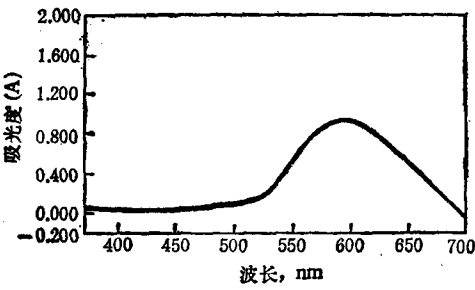


图 2 电泳区带的吸收光谱(考马斯亮蓝 G250 染色)

三、双波长扫描法测定 γ/γ 值

对改良 Triton X-100 酸性尿素 PAGE 法分离的 γ 和 γ 区带进行双波长扫描,所得两峰清楚光滑,基线漂移小,结果稳定(见图 3)。扫描仪自动记录两峰面积百分比。我们应

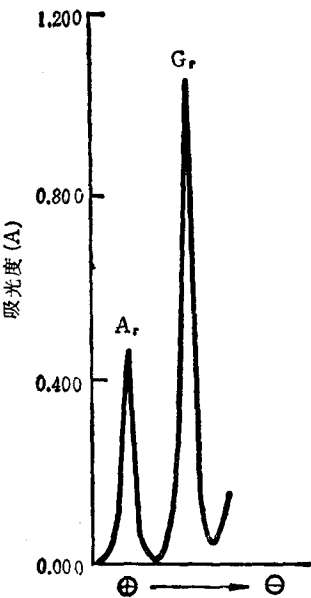


图 3 γ 和 γ 区带的双波长扫描图谱

用此法测定了 503 例江西汉族新生儿 HbF 中 γ/γ 值,结果显示 97% 的新生儿其 γ 百分比率为 70% 左右。此结果与文献[1,2]用高效液相色谱 (HPLC) 法所得结果一致。可见,本法具有准确、可靠,且设备简单,易于推广等优点。

四、双波长扫描的重现性

为了检测本法的精确性,我们做了扫描结果的重现性观察,显示重现性甚好(见表 1)。

表 1 双波长扫描测定 γ/γ 百分比率的重现性

扫描次数	1	2	3	4	5	6	$\bar{x} \pm SD$
γ (%)	69	68.5	68.9	68.5	68.6	68.4	68.6 ± 0.4

五、凝胶干燥前后的扫描结果比较

对 8 例脐血进行了凝胶干燥前后扫描测定 γ 百分比率的比较,从表 2 看出两组数据十分接近,经统计学处理无显著差异 ($P > 0.05$)。可见,凝胶干燥前后对区带的扫描定量结果无影响。干燥方法简易,不仅有利于标本的保留,而且为普查工作带来方便。

表 2 凝胶干燥前后测定 γ/γ 百分比率的比较

脐血编号	γ (%)	
	干燥前	干燥后
1	66.7	66.4
2	71.7	72.5
3	68.7	68.2
4	67.2	67
5	68.8	70.7
6	70.8	70.8
7	64.5	63.1
8	71.3	70.6
$\bar{x} \pm SD$	68.7 ± 2.5	68.7 ± 3.1

本文承蒙曾昭建和熊丽萍两同志协助部分技术工作,特此致谢。

参 考 文 献

[1] Gilman, J. G. et al.: *Blood*, 1984, **64**(2), 452.
[2] 曾溢滔等:《科学通报》,1982, 19, 1208.
[3] 朱芝芳等:《中国医学科学院学报》,1986, **8**(6), 445.
[4] Sukumaran, P. K. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 1983, **11**(13), 4635.
[5] Stefan Karlsson, et al.: *Ann. Rev. Biochem.*, 1985, **54**, 1071.

人外周淋巴细胞多巴胺受体的测定方法研究

董竞武 刘春芳 全新荣 丁训诚

(上海市劳动卫生职业病研究所毒理研究室)

提 要

用 $[^3\text{H}]$ -spiperone 作为特异配体,与人的淋巴细胞膜上多巴胺受体进行结合反应,在淋巴细胞浓度 1×10^6 个/ml,反应温度 37°C ,反应时间 60min 条件下,此结合反应具有低容量和高亲和力的特点。 $K_d = 8.87\text{nmol/L}$, $B_{\max} = 181\text{fmol}/1 \times 10^6$ 个淋巴细胞。用单点法分析,34 例正常人特异结合平均值为 $139(\text{fmol}/1 \times 10^6 \text{LC})$ 。此法用量少重复性优,从而适用于临床研究。

脑纹状体多巴胺 (DA) 受体的抑制已经证明是引起巴金森氏症及锰等重金属中毒的重要原因。G. le Fur. (1980) 等报道了人淋巴细胞 (LC) 膜上存在 DA 受体,并且通过巴金森氏症病人脑纹状体和血淋巴细胞多巴胺 (LC-DA) 受体的检测,了解到二者存在密切相关^[1]。由此可以通过检测血中 LC-DA 受体来反映脑内纹状体 DA 受体的功能。我们从受体检测的角度结合有关精神神经系统临床诊断及治疗的实际需要,采用一种可行的由人外周血 LC-DA 受体的测定来反映脑 DA 受体的功能状态,具有取材容易可多次重复等优点。目前有关人 LC-DA 受体的研究尚开始不久,我们以放射配体分析 (Radiolig and Assay) 来检测 DA 受体的功能,测定人外周 LC 的 $[^3\text{H}]$ -spiperone 特异结合,为 DA 受体的临床进一步研究建立了必要的方法。

材 料 和 方 法

1. 试剂

$[^3\text{H}]$ -spiperone 英国放化中心 (Amersha-

m) 产品, 703 GBq/mmol 氟哌啶醇 上海第十二制药厂产品。49-型玻璃纤维滤膜 上海虹光造纸厂产品。闪烁体 ppo 上海试剂一厂产品, popop 上海试剂一厂产品。

2. 方法

(1) 淋巴细胞的分离和鉴定 采用密度梯度离心法将 LC 分离并鉴定^[2,3]。用此法分离所得 LC 纯度为 90%, LC 存活率 95% (用台盼蓝染色后计数)。再进行 LC 计数板计数,以 Hank's 液调整浓度至 $1 \times 10^7 \text{LC/ml}$ 。 4°C 条件下保存备用。

(2) DA 受体特异结合测定 按文献 [4] 方法改进,取 $1 \times 10^7 \text{LC/ml}$ 的 LC 悬液 $100\mu\text{l}$, 加入用 Hank's 液稀释的 $[^3\text{H}]$ -spiperone $50\mu\text{l}$ (浓度 $0.25-16\text{nmol/L}$), 每反应管中用 Hank's 液补足体积至 $1000\mu\text{l}$, 作双复管为总结合管; 同时在另外双复管中加入浓度高于 $[^3\text{H}]$ -spiperone 1000 倍的氟哌啶醇 $50\mu\text{l}$ (排除非特异结合), 每管反应总体积为 $1000\mu\text{l}$ 。 37°C 保温 60min 并振荡混匀。反应结束后反应管置冰浴中终止反应 5min, 用 49 型微孔滤膜抽滤收集

[6] 刘永明等:《江西医学院学报》, 1987, 4 (在印刷中)。

[7] 南国华等:《生物化学与生物物理进展》, 1984, (11),

刘永明等：“胎儿血红蛋白 G_γ 与 A_γ 电泳区带的双波长扫描法定量”一文的图 1

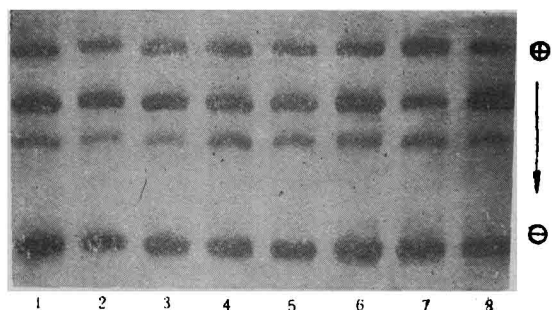


图 1 脐血 Hb 解链样品的电泳图谱
1—8 为 8 例脐血样品的板电泳结果

叶正华等：“钙调素亲和层析柱的制备及其应用”一文的图 4

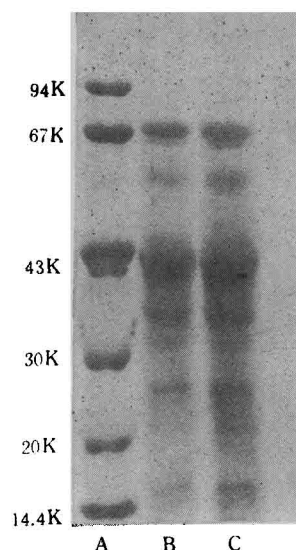


图 4 小麦细胞壁 CaM 结合蛋白的 SDS 电泳分析
A 为标准蛋白；B 和 C 为两次分别提取的小麦细胞壁 CaM 结合蛋白

王华岩：“一种简单快速回收 DNA 片段的方法”一文的图 1—2

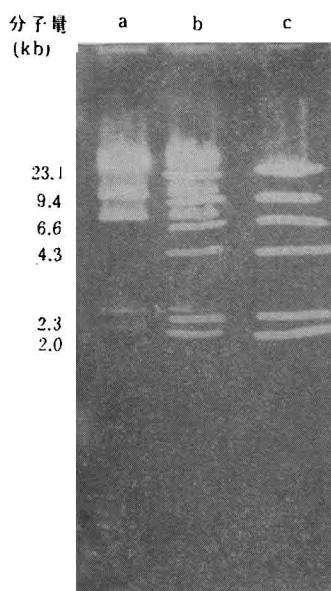


图 1 $1.4\mu\text{g}\lambda$ DNA-Hind III 经 0.7% 琼脂糖凝胶电泳分离

a. 1.5 小时后 DNA 带分开；b, 把 DE-81 滤纸片插在 DNA 带前；
c. 继续电泳后 10 分钟，DNA 转移到滤纸上

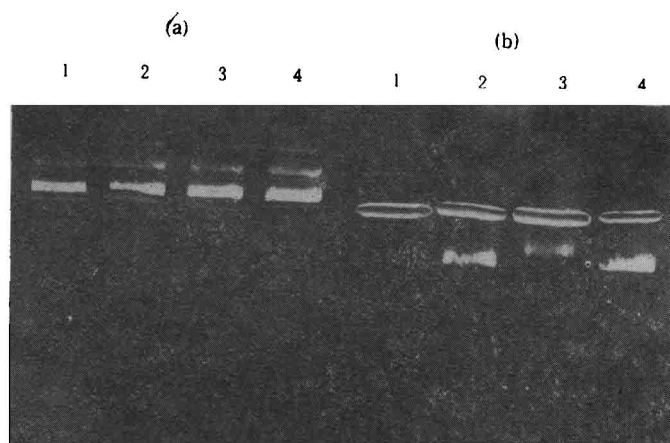


图 2 不同滤纸回收 DNA 的比较

(a) 质粒 pUC19 DNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离，三条带分别为超螺旋、线性和开环的质粒 DNA。将滤纸插入超螺旋带前沿。1—4 分别为 DE-81，新华滤纸，Whatman 3MM，硝酸纤维滤纸。
(b) 继续电泳 20 分钟后，四种滤纸吸附 DNA 的情况