

AAP 肽连接, 制备的抗体是豚鼠抗 AAP (效价 1:8000), 一个实验周期为 48h. 本文除碘标技术与其不同外, 制备的抗体是兔抗 AAP (效价 1:13500), 效价较高, 在 24h 内即可出实验报告。

放射免疫技术测定 AAP 是敏感, 特异的方法, 此法的建立为科研工作者探讨 AAP 的分泌、代谢、分布等工作提供了灵敏的测试方法。

参 考 文 献

1 Aonuma S, Kohama Y, Akai K *et al.* Studies on heart.

XIX. Isolation of an atrial peptide that improves the rhythmicity of cultured myocardial cell clusters. *Chem Pharm Bull*, 1980; 28: 3332

2 Aonuma S, Kohama Y, Makino T *et al.* Studies on heart. XXIV. Inhibitory effect of antiarrhythmic peptide (AAP) on experimental thrombosis. *Chem Pharm Bull*, 1984; 32: 219

3 Aonuma S, Kohama Y, Makino T *et al.* Studies on heart XXI. Amino acid sequence of antiarrhythmic peptide (AAP) isolated from atria. *J Pharmacobio-Dyn*, 1982; 5: 40

4 李振甲等: 实用放射免疫学, 北京: 科学技术出版社, 1989; 45

5 Kohama Y, Kawahara Y, Okabe M *et al.* Determination of immunoreactive antiarrhythmic peptide (AAP) in rats. *J Pharmacobio-Dyn*, 1985; 8: 1024—1031

薄层扫描法测定寡核苷酸含量

王升启 马立人

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

张京生 石成华

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100850)

提 要

建立了薄层扫描测定寡核苷酸含量的新方法, 与传统方法相比, 该方法具有简单、微量、样品间无交叉污染等优点, 该方法的线性方程 $Y = -155.7 + 0.1428X$, 相关系数 ($r = 0.9989$), 线性范围 (10—3000ng), 平均回收率 (97.33%) 及平均变异系数 (5.5%) 均属优良。

关键词 薄层扫描, 寡核苷酸, 高效薄层色谱

现代分子生物学技术的发展及 DNA 自动合成仪器的出现使人工合成寡核苷酸的应用范围越来越广, 目前, 它不仅可用作核酸测序引物、基因克隆接头、启动子及探针等, 而且在 PCR 技术中起重要作用^[1]。近年来, 反义核酸技术的提出, 使 DNA 合成技术, 特别是大规模 DNA 合成技术显得更加重要^[2], 以上技术的发迫切需要一种样品用量少、无交叉污染、灵敏度高、测定结果可靠且可分析混合组分中某一组分含量的寡核苷酸定量方法, 目前普遍采用的测定 DNA 含量的紫外比色法^[3]已不能满

足上述要求。为此, 我们建立了一种寡核苷酸含量测定的新方法——薄层扫描法。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂

薄层扫描仪为日本岛津 CS-930, DR-2 型数据处理机, 紫外分光光度计为日本日立 557 型, 薄层色谱展开槽为瑞士 CAMAG 公司产品, 预涂高效薄层色谱板为西德 E. Merck 公司产硅胶 GF254。薄层色谱展开剂为异丙醇:

收稿日期: 1991-12-30 修回日期: 1992-02-29

双蒸水:浓氨水 (60:30:10)。

1.2 实验方法

1.2.1 标准品的制备 由 DNA 合成仪合成的 16nt 寡核苷酸,经高效薄层色谱纯化, Sephadex-G 25 脱盐后测定 $\lambda = 260\text{ nm}$ 吸收度,真空离心干燥, -20°C 保存。

1.2.2 标准溶液的配制 用微量注射器吸取一定量的灭菌注射用水将上述标准品配成 $1\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的母液并用同法稀释成一系列标准浓度。

1.2.3 薄层色谱条件和方法 将薄板左右两边的硅胶分别刮去 0.5 cm 。用 $1\text{ }\mu\text{l}$ 定量毛细管将标准品或待测样品点于薄板上,点样体积 $1\text{--}3\text{ }\mu\text{l}$,斑点与底边、左右边及斑点间距离依次为 1.5 cm , 1.5 cm 及 1.0 cm 。待斑点完全干燥后,将薄板放入饱和展开槽内,垂直展开 $7\text{--}7.5\text{ cm}$ 。展开完毕,将薄板取出并令板上展开剂自然挥干即可进行薄层扫描。

1.2.4 薄层扫描的条件和方法 采用双波长反射锯齿扫描,测定波长为 260 nm ,参比波长为 360 nm ,线性化系数 $SX = 3$,狭缝 $0.4\text{ mm} \times 0.4\text{ mm}$, $\Delta Y = 0.1\text{ nm}$ 。外标两点法测定回收率及样品含量。

1.2.5 含量计算方法 由于不同寡核苷酸片段长度、碱基组成不同,在以某一寡核苷酸为标准测定另外的寡核苷酸含量时,结果有一定偏差,因此需进行校正,根据由吸收度计算寡核苷酸含量的方法^[4],我们采用式(1)对薄层扫描测定值进行校正。

寡核苷酸含量计算公式:

$$C_{\text{校正}} = f_{\text{校正}} \cdot C_{\text{实测}} \quad (1)$$

$$f_{\text{校正}} = f_{\text{样}}/f_{\text{标}} \quad (2)$$

$$f_{\text{样}} = M_{\text{样}} / (1.54m_A + 0.75n_C + 1.17p_G + 0.92q_T)_{\text{样}} \quad (3)$$

$$f_{\text{标}} = M_{\text{标}} / (1.54m'_A + 0.75n'_C + 1.17p'_G + 0.92q'_T)_{\text{标}} \quad (4)$$

$C_{\text{校正}}$: 样品校正含量

$C_{\text{实测}}$: 样品实测含量

$f_{\text{校正}}$: 含量校正系数

$f_{\text{样}}$: 样品克分子紫外吸收校正系数

$f_{\text{标}}$: 标准品克分子紫外吸收校正系数

$M_{\text{样}}$: 样品分子量

$M_{\text{标}}$: 标准品分子量

m_A, n_C, p_G, q_T 为样品[式(3)]中 A, C, G, T 的个数

m'_A, n'_C, p'_G, q'_T 为标准品[式(4)]中 A, C, G, T 的个数

1.2.6 数据处理 均在 IEAS 计算机上用 Slide 软件处理。

2 结果与讨论

2.1 标准品的纯度 采用高效薄层色谱法纯化了 DNA 合成仪合成的寡核苷酸,经三种展开系统展开并薄层扫描分析证明为单一成分(图略)。

2.2 线性及最小检出量 从图 1 实验及统计数据可以看出,该方法线性范围 ($10\text{--}3000\text{ ng}$) 及相关系数均属优良,最小检出量可达 10 ng 左右。这可以满足绝大部分样品含量测定的需要。另外对图 1 数据进一步分析表明斑点寡核苷酸含量分别在 $10\text{--}500\text{ ng}$ 及 $100\text{--}3000\text{ ng}$ 范围内所呈线性 ($r = 0.9993$) 比在 $10\text{--}3000\text{ ng}$ 范围内所呈线性 ($r = 0.9989$) 略好,在实际应用中如要求较高可使用某一范围的两标准品浓度进行测定。

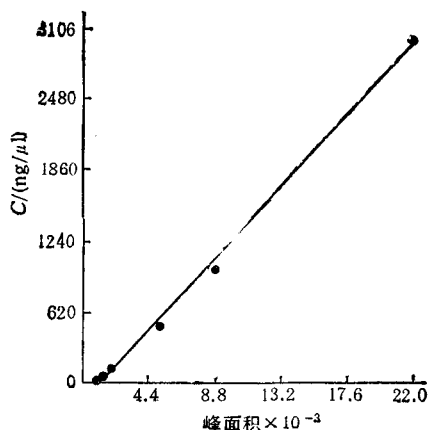


图 1 薄层扫描法测定寡核苷酸含量的线性

$$Y = -155.7 + 0.1428X \quad r = 0.9989$$

2.3 回收率及精密度 将一定量不同浓度的寡核苷酸标准品点于薄板上,展开后进行扫描,以实测值与加入量的百分比计算回收率。

表 1 薄层扫描法测定寡核苷酸含量的回收率

加入量 (ng)	实测值 (ng)	回收率 (%)	S_x	$\bar{X}(n)$	CV (%)
50	47,51,47	94,102,94	4.6	97(3)	4.8
500	460,480,520,520	92,96,104,104	6.0	99(4)	6.1
1000	920,960,930,1040	92,96,93,104	5.4	96(4)	5.6

结果(见表 1)表明当加入量分别为 50ng, 500 ng 和 1000ng 时,回收率依次为 97%, 99% 和 96%;变异系数(CV%)依次为 4.8%, 6.1% 和 5.6%。上述结果完全可以满足寡核苷酸定量分析要求。

2.4 薄层扫描法与紫外比色法比较 为评价该方法的准确性,分别用薄层扫描法及紫外比色法测定了 4 个纯化的寡核苷酸样品含量,测定结果(见表 2)表明两种方法无显著差异($P > 0.5$),因无法得到足够称出实际重量的样品来配制确切浓度,因此无法评价那一方法更准确,但从方法本身看,薄层扫描法应比紫外法更准确,因为薄层扫描法总是同时采用标准浓度进行标定,这可以克服系统误差,而紫外法则是取样品直接测定,这受仪器等因素影响较大。

由此可见,薄层扫描测定寡核苷酸含量的

表 2 薄层扫描与紫外比色对寡核苷酸定量方法的比较

样品	样品含量 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	
	紫外比色法	薄层扫描法
S_1	0.81	0.73
S_2	0.10	0.11
S_3	0.17	0.19
S_4	0.04	0.04

$P > 0.5$

新方法线性及回收率均属优良,与传统的紫外比色法相比,该方法具有以下优点: a. 可测非纯化样品中寡核苷酸量; b. 样品用量极少; c. 可同时测定多个样品; d. 结果可靠; e. 样品间无交叉污染。

参 考 文 献

- 1 黄培堂,俞伟源. PCR 技术的原理和应用. 北京: 中国科学技术出版社, 1990:136—157
- 2 王升启,马立人. 反义核酸技术及其应用——反义寡核苷酸,军事医学科学院院刊, 1991;15(3): 191
- 3 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning. A Laboratory Manual* 2nd ed, Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: E5
- 4 Anon. Applied biosystems. *User Bulletin*, 1989;11: 20

组织中氧化型和还原型谷胱甘肽荧光测定法

张迺哲 赵会军 付宏杰 宋玉忱*

(河北省医学科学院实验医学研究所,石家庄市 050021)

提 要

介绍了一种同时测定组织中氧化型谷胱甘肽(GSSG)和还原型谷胱甘肽(GSH)的荧光方法,应用邻苯二甲醛作为荧光试剂,GSH 和 GSSG 的标准曲线($2-10\mu\text{g}$)均呈线性关系。测定了 17 例正常人肺组织及肺癌组织胞浆和线粒体内 GSH 含量的亚细胞分布,本法简单、灵敏、重复性好、回收完全,比高效液相层析法容易推广。

关键词 谷胱甘肽,氧化型和还原型谷胱甘肽的测定,荧光法

谷胱甘肽(GSH)广泛存在于活体细胞内,并参与多种生物学反应,在机体对外界异物的

* 河北医学院第四医院外科。

收稿日期: 1992-01-07

修回日期: 1992-02-20