

## 乙醇对超氧化物歧化酶活性邻联[二]茴香胺染色法的影响

张爱群\* 沈文梅

(解放军总医院生化科, 北京 100853)

**关键词** 超氧化物歧化酶, 邻联[二]茴香胺染色法, 乙醇, 等电聚焦

超氧化物歧化酶(SOD)活性染色法有硝基四氮唑蓝染色法(又称负染法)<sup>[1]</sup>和邻联[二]茴香胺染色法(又称正染法)两种,后者是由 Misra 在邻联[二]茴香胺 SOD 活力测定法的基础上建立的<sup>[2]</sup>。虽然该法具有许多优点,但是普遍认为其染色效果较难掌握,故应用不及负染法广泛,迄今我们仅见一篇应用报道<sup>[1]</sup>。通过对染色反应原理和染色过程进行分析,发现染色效果与染色液中邻联[二]茴香胺的溶解度有密切关系。由于邻联[二]茴香胺不溶于水而溶于乙醇,加入乙醇可以促其溶解,但过量乙醇无疑会影响 SOD 的活性,因此选择适宜的乙醇浓度是十分重要的,而文献中又缺少详细报道。本文就乙醇在 SOD 活性正染过程中的作用进行较细致的探讨,同时排除其它影响因素,以提高该法的稳定性和使用价值。

## 1 材料和方法

## 1.1 材料

邻联[二]茴香胺为 Riedel-deHaën 产品,核黄素、乙醇为国产分析纯试剂,牛 CuZn-SOD 纯品由军事医学科学院放射医学研究所惠赠,红细胞取自献血员静脉抗凝血。

## 1.2 方法

选择 2%—40% 范围内六种乙醇浓度,观察乙醇浓度递增对邻联[二]茴香胺氧化反应及 CuZn-SOD 活性的影响。实验分两组,一组不加 CuZn-SOD,另一组则加 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的牛 CuZn-SOD,其它条件相同。反应体系包括: 0.2mmol/L 邻联[二]茴香胺, 0.013mmol/L 核黄素, 10mmol/L pH 7.2 磷酸盐缓冲液(PBS)。40W 日光灯照射 8min 后,于 460nm 波长下测定吸光度。

不同含量 CuZn-SOD 的等电聚焦电泳是在 0.5 mm 厚的聚丙烯酰胺凝胶上进行的<sup>[4]</sup>。电泳后的胶板浸入染色液(2mmol/L 邻联[二]茴香胺, 0.1mmol/L 核黄素, 20%乙醇, 10mmol/L pH 7.2 PBS)中, 30min 后取出,蒸馏水冲洗两遍,再浸入 PBS 中, 40W 日光灯近距离照射 30 min, SOD 酶带呈棕现黄色。将显

色后的胶板浸入蒸馏水中,次日扫描。扫描条件:  $\lambda_1 = 460 \text{ nm}$ ,  $\lambda_2 = 680 \text{ nm}$ , 狭缝为  $8 \times 0.2 \text{ mm}$ , 扫描速度为 40mm/min, 计算峰下面积。

用同样方法对人红细胞溶血液等电聚焦电泳结果进行染色,观察 SOD 正染酶带。

## 2 结果与讨论

邻联[二]茴香胺在核黄素的催化下,生成少量的棕黄色氧化型邻联[二]茴香胺,反应基本不受乙醇的影响(图 1)。由于 SOD 能够有效地清除对氧化型邻联[二]茴香胺的生成起抑制作用的超氧阴离子( $\text{O}_2^-$ ),当 CuZn-SOD 存在时,氧化型邻联[二]茴香胺的生成明显增多,但随着乙醇浓度增至 24% 左右,吸光度开始迅速下降(图 1),显然过量乙醇使部分 CuZn-SOD 分子失活。将该法用于 SOD 凝胶染色时,由于染色液中底物浓度较高、样品的 SOD 含量存在差异,因此应选择对 SOD 活性无明显影响的乙醇浓度的高限(20%)。聚焦后的 CuZn-SOD 经含 20% 乙醇的染色液染色,呈现清晰的棕黄色带,薄层扫描显示峰下面积与 CuZn-SOD 含量间呈直线关系(图略),其灵敏度达到甚至超过文献[2]的结果。应用于红细胞溶血液,染色结果见图 2。

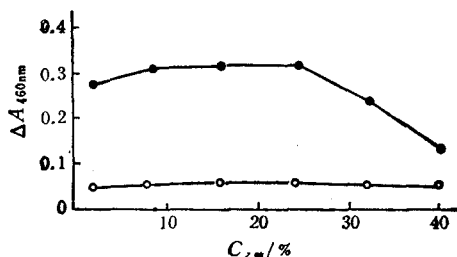


图 1 不同乙醇浓度对邻联[二]茴香胺氧化的影响

○—○ 无 CuZn-SOD 时  
●—● CuZn-SOD 存在时

\* 解放军总医院老年医学研究所。

收稿日期: 1991-12-16 修回日期: 1992-02-09



图 2 红细胞溶血液 CuZn-SOD 等电聚焦酶谱  
邻联[二]茴香胺染色

除选择适当的乙醇浓度外,在染色过程中还应注意: a. 染色液需新鲜配制,染色时不宜剧烈震荡。b. 染色后的胶板浸入水中至少过夜,以洗去背景的淡黄

色,提高对比度。c. 不宜用含乙醇、醋酸的保存液处理,否则酶带褪色。

总之,邻联[二]茴香胺染色法与负染法相比具有操作简便、试剂价格相对低廉、染色结果直观、便于扫描定量等优点,它弥补了负染法之不足,可满足 SOD 基础及应用研究中的多方面需要。

### 参 考 文 献

- 1 Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem*, 1971; 44:276
- 2 Misra H P, Fridovich I. Superoxide dismutase and peroxidase: a positive activity stain applicable to polyacrylamide gel electropherograms. *Arch Biochem Biophys*, 1977; 183:511
- 3 Arai K, Lizuka S, Makita A *et al.* Purification of CuZn-superoxide dismutase from human erythrocytes by immunoaffinity chromatography. *J Immun Met*, 1986; 91:139
- 4 Anon. *Instruction manual of LKB 2117 multiphor electrophoresis system*. Sweden, 1986: 27—56

## 关于提高 PCR 产物克隆效率的一些问题

王 志 珍

(Department of Anatomy and Cell Biology, University of  
Alberta, Edmonton, Canada T6G 2H7)

**关键词** 聚合酶链反应 (PCR), PCR 产物克隆

近年来,由于聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, 简称 PCR) 技术的飞快发展,用 PCR 产物进行克隆也越来越广泛地用于分子生物学的各个领域。PCR 的原理决定了它的产物不具有粘性末端,因此只能进行平整末端连接的克隆。一般说来,平整末端的连接的效率总是不高的,特别是 PCR 产物的末端连接效率更低。这可能是因为 PCR 产物实际上常常是不均一的,具有参差不齐的末端。虽然可以用 DNA 多聚酶的 Klenow 片段在一定程度上做末端修补,但并不能在根本上提高克隆效率。现在更多采用的是在 PCR 引物的 5' 末端加上限制性内切酶的识别顺序,这样得到的 PCR 产物经这些酶处理便可获得黏性末端,利用粘性末端的连接,克隆到有相应末端的载体中去,应该可以大大提高克隆效率。虽然这种设计在理论上是十分合理的,可是在实践中,许多实验室

还是遇到种种困难<sup>[1]</sup>,常常不能得到成功<sup>[2]</sup>,至今它还没有被证明是一种可以顺利进行的成熟技术<sup>[3]</sup>。笔者在自己的实践中,考虑到以上情况,并根据一般经验,加大限制性内切酶用量,希望得到较完全的粘性末端,但和许多实验室一样也未能得到满意结果。用自连接来检查粘性末端的质量,发现自连接形成的二体,一般只占总产物的 50—60% (未发表结果)。

制备满意的 PCR 产物的粘性末端不是很容易的,这已是一个公认的事实。这里对提高 PCR 产物克隆效率提出一些建议供读者参考。(1) 因为许多限制性内切酶对处在 DNA 片段末端的识别序列的作用效率远较处于内部的序列为低。譬如 HindIII, SmaI, SalI 以及 XbaI 这些常用的限制性内切酶都不能作用于处在 DNA 分子末端的特异位点。不同的酶对位于它们的识别序列以外的碱基对的最低长度要求不同<sup>[4-6]</sup>,