

增产物. 这有利于以后序列分析, 使之不致于出现较高比例的“垃圾”序列. PCR产物的5'端一般都是引物部分, 而大多数引物都是DNA自动合成仪合成, 其5'端无磷酸分子. 因此PCR产物在连接前需先在5'端由多核苷酸激酶催化加上一个磷酸. 为简便起见, 磷酸化所用 $10\times$ 反应缓冲液与连接反应缓冲液相同. 虽然磷酸化时所用亚精胺被认为有碍于平头连接, 但在我们的实验条件下, 亚精胺浓度在连接时已被稀释到约 0.1mmol/L , 并没对连接效率产生很大影响. 因此我们就直接用磷酸化后反应液做连接反应, 而不再用低熔点琼脂糖凝胶分离. 我们曾同时比较过这二种方法, 直接连接克隆的效率高于琼脂糖凝胶分离后连接克隆, 且节省不少时间和试剂. M13噬菌体5'端去磷酸可防止自身连接, 提高与插入DNA连接的效率. 此种M13噬菌体已有商品, 也可自己用碱性磷酸酶处理回收. 根据我们的实验结果, 插入DNA(约200bp)的量与M13DNA的量之比以 $20\text{ng}:20\text{ng}$ 效率最高. 但各人所

用DNA大小不同, 在估计DNA浓度时也有误差, 因此每次可试几个不同的比例. 我们已用此法反复多次克隆了5种不同的PCR产物, 结果显示每块平板可得到50—100个透明斑点, 即阳性克隆. 虽然现在已有一些新的PCR产物克隆方法出现, 但有的技术复杂, 有的需要特殊的酶或载体. 而此法只用普通载体, 一般实验室均能进行, 且通用高效, 因此值得推广.

参 考 文 献

- 1 Scharf S J, Horn G T, Erlich H A. Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences. *Science*, 1986; **233**: 1076
- 2 Hemsley A, Arnheim N, Toney M D *et al.* A simple method for site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res*, 1989; **17**: 6545
- 3 Clark J M. Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res*, 1988; **16**: 9677

尿蛋白快速 SDS-PAGE 测定及临床应用

唐志毅 许维桂 杨振华 黄一明 毛利民 吴华

(北京医院检验科, 北京 100730) (北京医院内科, 北京 100730)

关键词 尿蛋白分子量测定, SDS-PAGE, 蛋白尿

蛋白尿是肾脏病最常见的表现. 应用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行尿蛋白分子量的测定, 对于肾脏病的定位、评估和预后判断有较高的临床价值. 最近我们使用Pharmacia公司的Phast-System全自动电泳仪和Phast Image扫描仪以及改进的银染色法^[1,2]对30例肾病患者的尿标本进行蛋白分子量的测定, 尿标本不需浓缩, 蛋白浓度 0.05g/L 即可检出. 包括银染色在内的全部实验只需1.5h. 本法在快速和灵敏度方面优于国内已报道的SDS-PAGE方法^[3,4].

1 材料和方法

1.1 仪器

瑞典Pharmacia公司生产的PhastSystem全自动电泳仪. PhastImage凝胶扫描仪. 凝胶: PhastGel Gradient 8-25聚丙烯酰胺薄层凝胶板及PhastGel SDS Buffer Strip(缓冲凝胶条).

1.2 试剂

分子量标准品处理用缓冲液: 10mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH8.0), 其中含 1mmol/L EDTA, 2.5% SDS, 5% 巯基乙醇, 0.2% 溴酚蓝.

银染试剂: Pharmacia公司试剂盒或实验室配置.

低分子量蛋白质标准: Pharmacia公司试剂盒. 每瓶加入 $100\mu\text{l}$ 缓冲液溶解, 临用前 $20\mu\text{l}$ 用缓冲液按 $1:3$ 稀释, 于 100°C 煮沸3min, 冷却后离心取上清液点样.

1.3 尿标本的收集处理

收集肾病患者晨尿 10ml 离心(3000r/min , 10min), 取上清液用考马斯亮蓝G250结合法^[5]定量蛋白, 尿标本用去离子水稀释蛋白含量为 $1-2.5\text{g/L}$ 之间, 按 $1:50$ 加入 1% 叠氮钠溶液于 -20°C 冰箱备用. 健康人取晨尿 30ml , 用去离子水透析4h, 再用聚乙二醇

浓缩至 1ml, 定量蛋白后于 -20℃ 保存.

1.4 电泳

取 PhastGel 一块, 在电极两端加 PhastGel-SDS 凝胶缓冲条. 于阴极端加尿标本和处理过的标准蛋白质溶液各 1μl, 按表 1 设置程序, 待溴酚蓝到达阳极后停止电泳.

表 1 SDS-PAGE 程序设置

步骤	电压	电流	功率	温度	电压·时间
	/V	/mA	/W	/℃	/Vh
1.1	150	6.0	1.8	15	90
1.2	50	0.1	0.5	15	0

电泳结束后, 照文献^[2]设置的程序进行银染色. 然后在 PhastImage 扫描仪上扫描和数据处理. 打印机绘出标准蛋白分子量对数与迁移率相关的标准曲线, 并计算出尿标本中不同蛋白组分的分子量及在总蛋白中的百分比.

2 结果和讨论

2.1 分子量标准曲线

按上述方法将低分子量标准蛋白进行 SDS-PAGE 和银染色, 重复 9 次. 结果表明, 蛋白质分子量对数与迁移率 Rf 值之间呈现良好的线性关系, 相关系数均在 0.999 以上.

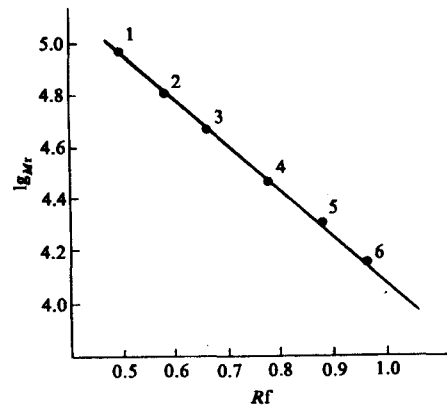


图 1 标准蛋白分子量与 Rf 的线性关系

1 磷酸化酶, 2 白蛋白, 3 卵白蛋白, 4 碳酸酐酶, 5 胰蛋白酶抑制剂, 6 α-乳白蛋白

2.2 灵敏度

取一含有 3 个区带的高蛋白尿标本用去离子水依次稀释, 使蛋白浓度分别为 5, 10, 50, 90, 130, 170, 210 和 250mg/dl, 在同一凝胶板上进行测定, 观察本法最低检测限和不同蛋白浓度对测定结果的影响. 由于本法采用 PhastGel, 凝胶厚度只有 0.35mm, 又使用改进的银染方法, 使灵敏度大为提高, 尿蛋白仅 0.05μg 即被检出. 蛋白浓度在 5—250mg/dl 之间, 3 条区带分子量测定结果的变异系数均小于 3%.

表 2 同一尿标本蛋白组分分子量和百分比重复测定的结果

	组分 1		组分 2		组分 3		组分 4		组分 5	
	Mr/kD	%	Mr/kD	%	Mr/kD	%	Mr/kD	%	Mr/kD	%
\bar{X}	195.2	10.6	128.7	25.0	97.1	15.9	70.2	6.7	55.0	41.9
SD	8.8	1.2	4.8	1.5	3.3	1.5	1.8	0.9	2.5	2.9
CV%	4.5	11.7	3.7	6.1	3.4	9.5	2.7	13.5	4.6	7.0

2.3 重现性

取一尿标本重复测定, 5 个蛋白组分的分子量及其在总蛋白中的百分比测定结果见表 2.

2.4 正常人尿中蛋白组分测定

正常人尿蛋白含量甚微, 我们取 30 例正常人尿液经浓缩后进行 SDS-PAGE, 共检出 16 种蛋白组分, 分子量在 14—160kD 之间. 30 例正常人中蛋白区带最多的可分出 7 条, 最少的为 2 条, 其中白蛋白出现率最高, 30 例均有检出. 只有白蛋白及其以下低分子量区分布的为 3 例, 占 10%, 只有白蛋白及其以上高分子量区分布的为 5 例, 占 16.7%, 其余 22 例在低分子量及高分

子量区均有分布.

2.5 初步临床应用

利用 PhastSystem 全自动电泳仪进行尿蛋白分子量测定具有灵敏、快速和简便的特点, 对于肾脏疾病的进一步鉴别诊断具有较高的临床价值. 我们对 30 例肾病患者尿标本 SDS-PAGE 测定结果进行分析, 发现同正常人一样, 白蛋白仍是出现率最高的区带, 不同的是检出的蛋白区带增至 20 种, 分子量在 12—230kD 之间, 而且主要分布在白蛋白以上大分子量区, 同时有大分子蛋白和中小分子蛋白即混合型蛋白尿法出现的有 9 例, 占 30.0%, 只有白蛋白及小分子蛋白出现即肾小

管性蛋白尿仅1例,占3.3%。该结果提示,目前在临床上最常见的为肾小球病变患者,以混合尿为特征的肾小球和肾小管同时受损的并不多见,而单纯肾小管蛋白尿更少见,但早期诊断十分重要。尿蛋白的SDS电泳不仅与临床诊断相一致,而且为临床的早期诊断提供了可靠依据。另外,若利用SDS-PAGE对肾病患者尿蛋白分子量的改变情况连续进行监测,对于治疗效果和预后的判断都有较高的临床价值。

参 考 文 献

1 Stierle H E, Oser B, Boesken W H. Improved classification of proteinuria by semiautomated ultrathin SDS poly-

acrylamid gel electrophoresis. *Clin Nephrol*, 1990;33(4): 168

2 Cooper E H, Jackson P J, Olsson B. Rapid analysis of proteinuria using SDS gradient PAGE and IEF. *PhastSystem Application File No 370*. Pharmacia LKB, Uppsala, 1987

3 许丽芬,张惠珠,陈梅芳.快速区分肾小球及肾小管蛋白尿的方法.中华医学检验杂志,1981;4(3):143

4 罗佩,王平.快速灵敏的尿蛋白电泳检测法及其初步应用.中华医学检验杂志,1989;12(5):303

5 赵善政,陈明伟.微克水平蛋白质的染料结合比色法——应用于尿蛋白和脑脊液蛋白定量.中华医学检验杂志,1983;6(4):210

自旋捕集短寿命自由基的低温保存

丛建波 孙存普 莫 简*

(军事医学科学院放射医学研究所,北京 100850)

关键词 自旋捕集,短寿命自由基,ESR,自旋加合物

自旋捕集^[1] (spin trapping) 技术的建立,为化学反应中的自由基中间体和生命过程中的短寿命自由基的ESR检测开辟了新的途径。此方法是利用捕集剂与短寿命自由基结合生成相对稳定的自由基,即自旋加合物,但自旋加合物的寿命仍然很短,只有几分钟或几十分钟,必须在捕集自由基后立即进行ESR测量,因此限制了许多实验研究。

我们采用液氮(77°K)保存自旋加合物的方法,延长了自旋加合物的寿命。结果表明,低温贮存几日后自旋加合物浓度基本不变。

1 材料与方 法

1.1 试剂

1.1.1 捕集剂 DMPO (5,5-dimethyl 1-pyrroline-1-oxide),为美国Sigma公司产品,经活性炭纯化^[2]后工作液无ESR信号,置-20℃避光保存。

NtB (2-methyl-2-Nitrosopropane Dimer) 为美国Sigma产品,配制后避光搅拌过夜,呈淡蓝色可用。

1.1.2 羟基自由基($\cdot\text{OH}$)产生体系中 H_2O_2 , EDTA, $\text{Fe}(\text{NH}_4\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Fe^{2+})均为国产AR级试剂,临用前用双蒸水配制。

1.1.3 超氧阴离子自由基(O_2^-)产生体系 次黄

嘌呤(hypoxanthine, HX), Fluka, 上海试剂采购站分装;黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XO),中科院上海生化所东风生化技术公司产品;DETP(二乙烯三胺乙酸)为国产试剂,均用0.05mol/L磷酸缓冲液,pH7.4(PBS)配制。

1.1.4 胸腺嘧啶核苷(dT)和四环素类衍生物(IC),用PBS配制待用。

1.2 自由基加合物的形成及其存放。

1.2.1 DMPO-OH加合物^[3] DMPO 0.08mol/L + H_2O_2 0.03mmol/L + EDTA 5mmol/L + Fe^{2+} 0.2mmol/L。

1.2.2 DMPO-OOH加合物^[3] DMPO 0.08mol/L + HX 0.43mmol/L + DETP 0.1mmol/L + XO 0.07 U/ml。

1.2.3 dT和IC自由基加合物 NtB 0.01mol/L + dT 0.2mg/ml; DMPO 0.08mol/L + IC 0.3mg/ml。二者均 ^{60}Co γ 射线200Gy照射。

将上述各体系制备好数份样品,装入塑料离心管中,除一份立即测ESR波谱外,其余立即置于液氮中冻

*西安第四军医大学化学系, 邮编 710032。

收稿日期: 1992-06-05 修回日期: 1992-09-07