

留. 根据各类型 SOD 对抑制剂敏感性和耐性的差异, 可以判断: 菜心中含有三条 SOD 同工酶带, 它们分别是 Mn- ( $R_f$  0.21), Fe- ( $R_f$  0.29) 和 CuZn-SOD ( $R_f$  0.38), 与 Bridges 等<sup>[7]</sup>的结果一致.

### 3 讨 论

上述实验用 Sigma 公司生产的纯 SOD (CuZn-SOD 从牛血中提取, Mn-SOD 和 Fe-SOD 从大肠杆菌中纯化) 作为各类 SOD 的标准酶, 所谓 CuZn-SOD 是指酶活性中心的金属为铜和锌, 它们的某些理化性质相似, 但并不意味着凡是 CuZn-SOD 都有相同的  $R_f$ , 同一植物, 甚至同一植物的器官, 可以有多条不同  $R_f$  的 CuZn-SOD<sup>[2]</sup>, 也可以一条也没有. Mn- 和 Fe-SOD 亦然.

### 参 考 文 献

- 1 方允中, 李文杰. 自由基与酶. 北京: 科学出版社, 1989: 71~75
- 2 Steinman H M. In: Oberley L W ed. Superoxide dismutase. Boca Raton: CRC Press, 1982; I: 11
- 3 罗广华, 王爱国, 邵从本等. 植物生理学报, 1985; 11 (2): 163
- 4 Gorecki M, Beck Y. Fifth conference on superoxide and superoxide dismutase (program and abstracts). Jerusalem: Israel, 1989: 50

- 5 王爱国, 罗广华, 邵从本等. 植物生理学报, 1983; 9 (1): 77
- 6 罗广华, 王爱国. 植物生理学通讯, 1983; (6): 44
- 7 Bridges S M, Salin M L. Plant Physiol, 1981; 68: 275

**The Location Staining Method for Distinguishing Different Types of SOD.** Luo Guanghua, Wang Aiguo, Fu Aigen (South China Institute of Botany, Academia Sinica, Guangzhou 510650, China).

**Abstract** A simple method, the location staining method, for distinguishing different SOD types was introduced. Due to the different performances of the different types of SOD against inhibitors, e.g. Cu, Zn-SOD band disappeared in the presence of  $H_2O_2$  or  $CN^-$ , Mn-SOD disappeared in the presence of  $CHCl_3-CH_3CH_2OH$ , and Fe-SOD lost in the presence of  $H_2O_2$  or  $CHCl_3-CH_3CH_2OH$  on the electrophoresis gels, the gels after electrophoresis were treated with the different inhibitors and then stained. According to the loss or presence of these bands, different SOD types can be identified.

**Key words** SOD, type of SOD, polyacrylamide gel electrophoresis

## 阳极电泳和阴极电泳的快速半干新技术

郭尧君 余 添<sup>1)</sup>

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

**摘要** 滤纸条半干技术在保证分辨率的前提下, 将凝胶电泳的电泳时间从原来的 2~4 h 缩短到 40~50 min, 并简化了操作, 节省了实验费用, 不需配制大量的缓冲液. pH 4.8 较 pH 8.9 阳极电泳提高了酸性蛋白质的电泳分辨率. pH 5.5 阴极电泳用于分离碱性样品可以得到很好的效果.

**关键词** 阳极电泳, 阴极电泳, 半干技术

<sup>1)</sup>中国科技大学生物系 90 级本科生. 收稿日期: 1995-09-13, 修回日期: 1995-10-23

电泳是生化研究中常用的实验手段. 其中凝胶电泳虽然分辨率不如等电聚焦高, 但其方法简单, 实验花费少, 可以测量天然状态下蛋白质的分子量, 所以依然是应用最广泛的电泳方法. 在水平电泳系统中, 缓冲液是重要的介质, 尤其是电极缓冲液影响电泳的时间和效果. 过去使用 500~2000 ml 新鲜配制电极缓冲液配以滤纸桥的方法既麻烦又浪费, 而且需要 2~4 h 或更长的时间<sup>[1~3]</sup>. Seymour 等<sup>[4]</sup>在 1993 年国际电泳学术会上简单介绍以滤纸条作电极缓冲液的载体进行 SDS 和凝胶电泳的半干新技术, 既无需配制大量缓冲液, 又缩短电泳时间. 1994 年我们在国内首先引入了这种 SDS 电泳的新技术<sup>[5]</sup>. 本文将提出 pH 4.8、pH 8.9 阳极电泳和 pH 5.5 阴极电泳新技术. 摸索 pH 4.8 的缓冲体系是为了提高酸性蛋白质分辨率. 而 pH 5.5 阴极电泳是用于分离碱性蛋白, 这是因为常用的阳极电泳缓冲系统不宜分离碱性样品<sup>[6]</sup>.

## 1 材料与方法

### 1.1 pH 8.9 凝胶电泳

**1.1.1 凝胶的准备:** 灌胶使用瑞典 Pharmacia Biotech 公司多用电泳仪的灌胶模具如图 1 组装, 把模具立于水平台上. pH 8.9 凝胶的配方见表 1. 分离胶缓冲液为 1.5 mol/L pH 8.9 的 Tris-HCl, 浓缩胶缓冲液为 0.5 mol/L pH 6.8

的 Tris-HCl, 凝胶贮液为 29.1% 丙烯酰胺和 0.9% 甲叉双丙烯酰胺. 先用移液管取 3 ml 浓缩胶贮液从模具上端小孔注入, 再加入 12 ml 分离胶贮液, 用 300  $\mu$ l 异丙醇封住液面, 隔绝空气. 在 40 $^{\circ}$ C 恒温箱中保温 1 h, 或室温下过夜<sup>[7]</sup>.

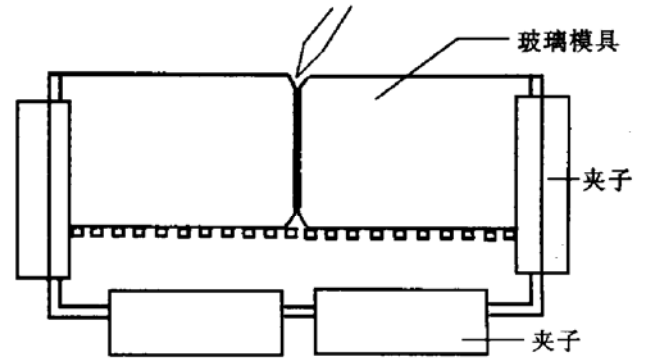


图 1 灌胶模具组装图

**1.1.2 电极缓冲液的配制和滤纸条电极的准备:** 阳极缓冲液 (pH 8.9): 175 mmol/L Tris-HCl, 0.01% NaN<sub>3</sub>. 阴极缓冲液: 567 mmol/L 甘氨酸, 0.01% NaN<sub>3</sub>. 滤纸的宽度为 55 mm, 长度为 130 mm. 滤纸条电极是由八层新华 102 中速定性滤纸用约 15 ml 缓冲液润湿, 轻压赶走滤纸间的气泡.

**1.1.3 电泳、染色和保存:** 电泳可在瑞典 Pharmacia Biotech 公司 2117 Multiphor 或其他合适的水平电泳仪上进行. 先将凝胶水平放置于冷却板上, 然后将润湿阴极缓冲液的阴极滤纸条置于胶的阴极端, 并使其距加样孔 (或准备加样处) 4 mm, 再放阳极滤纸条使之与凝胶的阳极端搭接宽度为 5 mm. 用弯头镊子或玻璃棒先阴极后阳极轻轻压平滤纸, 赶走气泡使胶面与滤纸条接触良好. 移动阴、阳电极, 使其尽量平行并靠近滤纸外边缘, 见图 2. 预

表 1 pH 8.9 凝胶配方

	浓缩胶 (T=4%, C=3%)	分离胶 (T=10%, C=3%)
凝胶储备液/ml	0.65	5.0
凝胶缓冲液/ml	0.10	0.3
87% 甘油/ml	1.00	0.3
双蒸水/ml	3.30	9.4
TEMED/ $\mu$ l	2.5	7.0
过硫酸铵/ $\mu$ l	5.0	15.0
总体积/ml	5.0	15.0
使用体积/ml	3.0	12.0

注: 表中配方可做二块 0.5 mm  $\times$  125 mm  $\times$  130 mm 的胶.

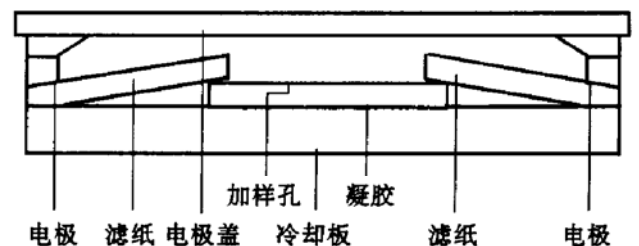


图 2 电极放置图

电泳后加样. 样品为稀释 8~16 倍的动物血清和 Pharmacia 公司的高相对分子质量标准蛋白. 电泳参数见表 2. 电泳后进行考马斯亮蓝染色和保存, 方法见文献 [7].

表 2 pH 8.9 凝胶电泳参数

		电压/V	电流/mA	功率/W	时间/min
预电泳	设置参数	300	12	6	10
电泳	设置参数	900	35	14	30
	终止状态	900	8	9	40

注: 实际工作中结束时间应以溴酚蓝前沿接近阳极为准. 冷却温度为 10℃. 凝胶尺寸 0.5 mm × 125 mm × 130 mm.

## 1.2 pH 4.8 凝胶电泳

1.2.1 凝胶的准备: 灌胶方法同 pH 8.9 的凝胶. 凝胶的配方见表 3. 分离胶缓冲液为 0.6 mol/L, pH 4.8 的 HEPES, 15 mmol/L 的 HCl, 35 mmol/L 的 KCl, 1 mmol/L 的 L-精氨酸, 0.01% NaN<sub>3</sub>. 浓缩胶缓冲液是由分离胶缓冲液用 HCl 滴定至 pH 3.8 得到.

表 3 pH 4.8 凝胶配方

	浓缩胶 (T=5%, C=3%)	分离胶 (T=10%, C=3%)
凝胶储备液/ml	1.0	5.0
凝胶缓冲液/ml	0.5	0.3
87% 甘油/ml	1.00	0.0
双蒸水/ml	3.50	9.7
TEMED/ $\mu$ l	3.0	7.0
过硫酸铵/ $\mu$ l	6.0	15.0
总体积/ml	6.0	15.0
使用体积/ml	3.0	12.0

注: 表中配方可做二块 0.5 mm × 125 mm × 130 mm 的胶.

1.2.2 电极缓冲液的配制和滤纸条电极的准备: 阳极缓冲液 (pH 5.3): 225 mmol/L 的 L-精氨酸, 0.01% NaN<sub>3</sub>. 阴极缓冲液 (pH 5.3): 225 mmol/L 的三羟甲基氨基甘氨酸, 5 mmol/L 的 NaOH, 0.01% NaN<sub>3</sub>. 滤纸条电极的准备同 pH 8.9 的凝胶电泳.

1.2.3 电泳、染色和保存: 电泳, 染色和保存方法同 1.1.3. 样品为稀释 8~16 倍的动物血清. 电泳参数见表 4.

表 4 pH 4.8 凝胶电泳参数

		电压/V	电流/mA	功率/W	时间/min
预电泳	设置参数	300	25	6	20
电泳	设置参数	1300	25	16	30
	终止参数	1300	8	10	40

注: 实际工作中结束时间应以溴酚蓝前沿接近阳极为准. 冷却温度为 10℃. 凝胶尺寸 0.5 mm × 125 mm × 130 mm.

## 1.3 pH 5.5 阴极凝胶电泳

1.3.1 凝胶的准备: 灌胶方法同 pH 8.9 的凝胶. 凝胶的配方见表 5. 凝胶缓冲液为 0.6 mol/L HEPES, 1 mmol/L 冰乙酸, 10 mmol/L 精氨酸, 0.01% NaN<sub>3</sub>.

表 5 pH 5.5 凝胶配方

	浓缩胶 (T=4%, C=3%)	分离胶 (T=10%, C=3%)
凝胶储备液/ml	0.65	5.0
凝胶缓冲液/ml	0.1	0.5
87% 甘油/ml	1.00	0.0
双蒸水/ml	3.30	9.5
TEMED/ $\mu$ l	2.5	7.0
过硫酸铵/ $\mu$ l	5.0	15.0
总体积/ml	5.0	15.0
使用体积/ml	3.0	12.0

注: 表中配方可做二块 0.5 mm × 125 mm × 130 mm 的胶.

1.3.2 电极缓冲液的配制和滤纸条电极的准备: 阳极缓冲液 (pH 5.8): 113 mmol/L 的  $\epsilon$ -氨基己酸, 5 mmol/L 的冰乙酸, 0.01% NaN<sub>3</sub>. 阴极缓冲液 (pH 3.6): 30 mmol/L 的冰乙酸, 0.01% NaN<sub>3</sub>. 滤纸条电极的准备基本同 pH 8.9 的凝胶电泳. 但放置电极滤纸条时, 应先放置阳极滤纸条后放置阴极滤纸条.

1.3.3 电泳、染色和保存: 电泳方法同 1.1.3. 样品为一种蝎毒蛋白和经 8 mol/L 尿

素处理 3 d 后的 Pharmacia 公司的宽等电点标准蛋白 (pH 3~10). 电泳参数见表 6. 电泳后, 等电点标准蛋白进行考马斯亮蓝染色<sup>[7]</sup>, 蝎毒蛋白用小肽染色<sup>[8]</sup>, 然后保存<sup>[7]</sup>.

表 6 pH 5.5 凝胶阴极电泳参数表

		电压/V	电流/mA	功率/W	时间/min
预电泳	设置参数	500	10	10	10
电泳	设置参数	1200	14	14	30
	终止状态	1200	3.5	4	40

注: 实际工作中结束时间应以指示剂焦宁 (pyronine) 前沿接近阴极为准. 冷却温度为 10℃. 凝胶尺寸 0.5 mm × 125 mm × 130 mm.

## 2 结果和讨论

图 3 和图 4 分别是 pH 8.9, pH 4.8 凝胶电泳分离动物血清的图谱. 电泳分辨率较理想. 对比图 3 与图 4, 不难看到 pH 8.9 电泳分离

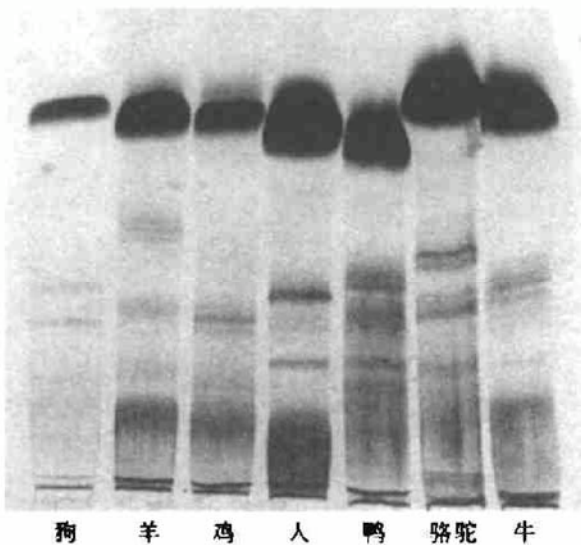


图 3 稀释 8~16 倍的动物血清的 pH 8.9 阳极电泳图谱

的蛋白带较 pH 4.8 分离的多, 而 pH 4.8 电泳图谱较 pH 8.9 电泳图谱清晰. 这是因为动物血清中  $pI < 8.9$  的蛋白较  $pI < 4.5$  的蛋白种类多. 而分离酸性蛋白质, pH 4.8 的电泳分辨率比 pH 8.9 的电泳高. 在 pH 4.8 的电泳图谱中, 在点样孔的阴极方向是血清中  $pI > 4.5$

的蛋白带. 图 5 是 pH 8.9 凝胶电泳分离 Pharmacia 公司的高相对分子质量标准蛋白的图谱. 蛋白带窄细, 分辨效果良好. 图 6 是 pH 5.5 阴极电泳分离经 8 mol/L 尿素处理 3 d 后的 Pharmacia 公司等电点标准蛋白 (pH 3~10) 的图谱. 在点样孔阳极侧是  $pI < 6.0$  的蛋白带. 由于有一个蛋白在 pH 5.5 条件下溶解不理想, 故用 8 mol/L 尿素处理, 以提高溶解度. 图 7 为用 pH 5.5 阴极电泳分离等电点在 pH 9 左右的蝎毒蛋白图谱. 用 SDS 电泳分离得一条带, 与我们用 pH 5.5 阴极电泳分离的谱带数相同. 蝎毒蛋白仅有一个亚基. 由于蝎毒蛋白的相对分子质量为 7000 左右, 所以用小肽染色.

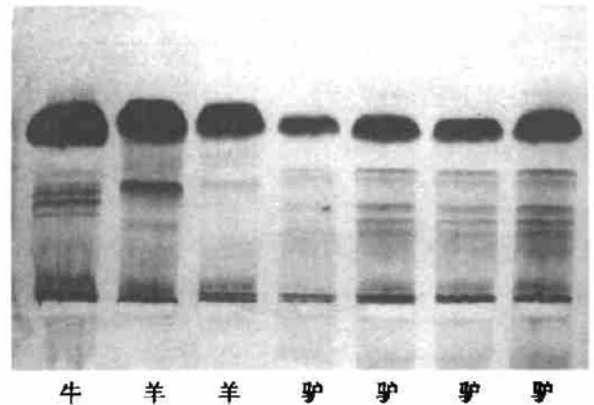


图 4 稀释 8~16 倍的动物血清的 pH 4.8 阳极电泳图谱



图 5 Pharmacia 公司的高相对分子质量标准蛋白 pH 8.9 阳极电泳图谱



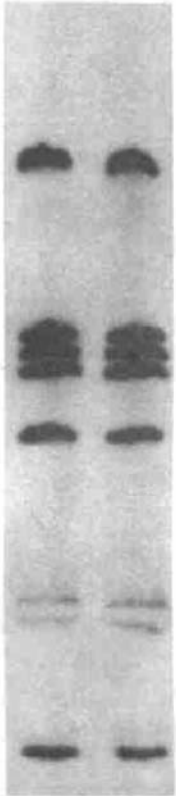


图6 经尿素处理 Pharmacia 公司等电点标准 (pH 3~10) 蛋白 pH 5.5 阴极电泳图谱



图7 蝎毒蛋白的 pH 5.5 阴极电泳图谱

缓冲体系的选择是基于对电泳时间与分辨率的综合考虑。蛋白质的等电点与凝胶缓冲液的 pH 值相差越远，则蛋白质泳动速率越快，但分辨率也越低。用 pH 4.8 的凝胶进行电泳是为了更好的分辨酸性蛋白质。由于使用高压，故电泳时间不长。应注意的是凝胶缓冲系统中离子强度不宜过大，否则将出现电流始终很大，电压上不去，拉长电泳时间的现象。

pH 8.9 凝胶电泳阴极缓冲液中含甘氨酸，我们使用过 1988 年东方科学仪器进出口公司与 1962 年北京化工厂生产的甘氨酸，电泳过

程中在前沿均出现一条黄线。为此我们曾用三羟甲基氨基甘氨酸 (tricine) 替代，前沿不出现黄线。说明黄线是由甘氨酸造成。但黄线不影响结果，染色后便消失，而三羟甲基氨基甘氨酸较贵，故我们仍使用甘氨酸。

电极应尽量靠近滤纸边缘，因为只有胶与电极之间的滤纸中所含的电极缓冲液才是有效的。若电极放置过于靠近凝胶或滤纸层数过少都会造成滤纸电极干枯而使电泳停止。滤纸长度应与胶长相同，滤纸宽度取决于分离距离，滤纸层数则由滤纸厚度所决定。

pH 5.5 聚丙烯酰胺凝胶阴极电泳主要是为了分离  $pI > pH 6.0$  的偏碱性蛋白。它可以分离一些溶血产物或亲脂蛋白，如大麦、小麦，谷物的抽提物。但必须使蛋白溶解，必要时可用 1/10 浓度的凝胶缓冲液稀释样品，也可以添加尿素和非离子去污剂增加样品溶解度。

pH 5.5 阴极电泳的电泳指示剂可用焦宁 (pyronine, 是一种染细胞核的红色染料)。焦宁在 pH 5.5 条件下带正电，故电泳时从阳极向阴极泳动。焦宁有许多种，我们试用过  $C_{17}H_{20}ON_2$  (上海化工厂)， $C_{21}H_{27}ON_2Cl$  (吡罗红 B, 进口分装)， $C_{17}H_{19}ON_2Cl$  (吡罗红 G, 北京化工厂)。这三种染料仅仅是颜色上有些不同，作为指示剂没有不同之处。

为避免凝胶的杂质干扰电泳，自制凝胶最好进行预电泳，预电泳时间 10~20 min 为最佳，预电泳时间太短起不了净胶的作用，时间太长会使电解产物进入凝胶，电极缓冲液成分也会发生改变，都会影响最终结果<sup>[5]</sup>。在预电泳与电泳之间可以增加一步低电压设置，这是为使样品可以平缓进入凝胶而避免拖尾现象。

**致谢** 承蒙王大成组提供蝎毒蛋白，陈楚楚组提供各种焦宁，本组李辛晖热情帮助，谨致谢意。

## 参 考 文 献

- 1 Gorg A, Postel W, Westermeier R *et al.* J Biochem Biophys

Methods, 1980; 3: 273

2 Lynn W R, Macleod R M, Morrison J C *et al.* J Biochem Biophys Methods, 1985; 12: 57

3 顾学范, 陈瑞冠, 齐家仪. 生物化学与生物物理进展, 1985; (5): 59

4 Seymour C, Gronau S, Schickle H P. In: Solum N O ed. Program and Abstracts, ICES-ELPHO 93, Sandefjord (Norway): International Council of Electrophoresis Societies, 1993; 125

5 郭尧君. 生物化学与生物物理进展, 1994; 21 (3): 265

6 Andrews A T. Electrophoresis: theory, techniques, and biochemical and clinical applications. New York: Oxford University Press, 1981; 52~53

7 郭尧君. 生物化学与生物物理进展, 1991; 18 (1): 32

8 Righetti P G, Gianazza E. J Chromatogr, 1987; 157: 243

Tian (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101, China*).

**Abstract** Rapid semi-dry technique by filter strips shortens running time from 2~4 h to 40~50 min without lowering resolution and using large amount of electrode buffer. It also simplifies operation and saves materials. Being compared with pH 8.9 anode PAGE, pH 4.8 PAGE has higher resolution in acid protein separation. Very good results can be obtained by using pH 5.5 cathode PAGE with semi-dry technique by filter strips for alkaline sample separations.

**Key words** anode PAGE, cathode PAGE, semi-dry technique

**New Rapid Semi-dry Technique Used in Anode PAGE and Cathod PAGE.** Guo Yaojun, Yu

# 人细胞差异表达基因 cDNA 消减杂交体系的建立\*

黎伯铨 吴旻

(中国医学科学院肿瘤研究所, 分子肿瘤学国家重点实验室, 北京 100021)

**摘要** 为克隆肺腺癌分化相关基因, 采用诱导分化与消减杂交相结合的策略, 建立了全反式维甲酸 (RA) 诱导前后人肺腺癌细胞系的 cDNA 消减文库, 得到 124 个 cDNA 消减克隆. 经加-减法杂交差异筛选、DNA 和 RNA 印迹、cDNA 全序列测定和生物学功能分析, 分离到 3 个在人肺腺癌细胞系分化过程中由 RA 激活而特异表达的新的 cDNA 序列. 这一策略和技术路线适用于分离细胞中呈过量表达或表达抑制基因的 cDNA 克隆, 并具有反映细胞分化过程中基因表达动态变化特征和相对简便适用的特点.

**关键词** 消减杂交, 分化相关基因, cDNA 克隆, 维甲酸, 肺癌

癌的发生是细胞增殖失控和分化障碍的结果. 应用各种方法分离细胞癌变或分化过程中呈差异表达的基因, 一直是肿瘤学研究的前沿课题. 80 年代末, 本室设计了应用全反式维甲酸 (all-*trans* retinoic acid, RA) 诱导食管癌细胞系发生终末分化、消减杂交富集 RA 特异

性 cDNA 探针钓取和筛选目的基因 cDNA 的一整套方法<sup>[1]</sup>, 分离到一个使癌细胞分化的基因, 此后我们又建立了更为成熟和有效的在

\* 国家“863”高科技发展计划、攀登计划、博士后基金及 World Lab. 资助项目.

收稿日期: 1995-09-18, 修回日期: 1995-12-05