

(dT)₁₅ primer which contains Not I site. After the poly(A)⁺-RNA was removed with *E. coli* RNase H, the second strand was synthesized by means of *E. coli* DNA polymerase I, *E. coli* DNA ligase and T4 DNA polymerase. Then Sal I adapter was added and the cDNA digested with Not I. Half of the cDNA was inserted into plasmid pSPORT I and transformed *E. coli* DH 5 α . The other half was stored at -20°C. It was shown that the cDNA length ranged from

100 to 10 000 bp. Using this cDNA library as a template, four genes have been amplified successfully. They are glutamic acid decarboxylase (GAD, 1800 bp), neuron-specific enolase (NSE, 1340 bp), T3 receptor (1230 bp) and cholecystokinin (CCK, 345 bp). The method for storage of the cDNA library which can be kept for a longer period was also developed.

Key words Wistar rat brain, cDNA library, PCR, molecular cloning.

脘梯度电泳方法的技术关键

周军贤 王希成¹⁾ 张艳玲 周筠梅²⁾

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 介绍在应用丙烯酰胺-脘梯度电泳技术进行蛋白质折叠、去折叠研究工作中的实验步骤和技术关键, 并在文献方法的基础上作了改进. 通过加入 15%~0% 的甘油, 抵消在凝胶中由于脘浓度不同而引起的溶液粘度变化, 保证在凝胶上脘浓度不同的部位对蛋白质保持同样的电泳阻力, 防止前沿偏斜. 采用核黄素光照催化含脘凝胶的聚合, 以防止凝胶在梯度灌制完成前发生聚合. 加浓缩胶和样品梳于脘梯度胶上可较好地克服边缘效应, 获得好的样品迁移图谱.

关键词 脘梯度凝胶电泳, 聚丙烯酰胺凝胶, 蛋白质折叠, 肌酸激酶

丙烯酰胺-脘梯度电泳方法对研究蛋白质的折叠、去折叠是非常有用的实验技术. 其基本原理是在常规的丙烯酰胺凝胶中加入非离子型变性剂——尿素, 使其形成浓度梯度. 电泳时将此梯度垂直于电泳方向, 使同一蛋白质样品在不同浓度的变性剂环境中电泳. 蛋白质的折叠状态随脘的浓度而变化, 因而表现出不同的迁移率, 最终在显色后的凝胶中呈现出反映蛋白质构象变化的二维图象^[1]. 我们应用这一方法对一些蛋白质的去折叠和重折叠进行了研究, 对操作这一电泳实验技术方法的关键有所认识, 并对此方法做了改进.

1 仪器和方法

1.1 仪器

选用 Bio-Rad 公司 Protein II 垂直电泳仪.

因它具有以下优势: a. 用双层玻璃中间夹条 (spacer) 保证边缘的密封和无渗漏, 这使得灌完梯度胶后再作 90 度转向的操作比较容易进行. b. 可灌制成 16 cm × 18 cm 的大尺寸胶, 便于样品的迁移变异的观察. c. 具有中心水循环, 能保证电泳过程中的温度恒定; d. 充足的上槽、下槽电极液, 可使电泳进行较长时间而不必担心干胶、电解质不足等所引起的不良效应.

1.2 梯度胶的灌制

灌制线性脘梯度是靠两个蠕动泵将输液量调成 1:2 的恒定流量来保证形成准确的线性梯度. 其过程见图 1.

¹⁾清华大学生物科学技术系, 北京 100084.

²⁾通讯联系人.

收稿日期: 1995-05-29, 修回日期: 1995-08-17

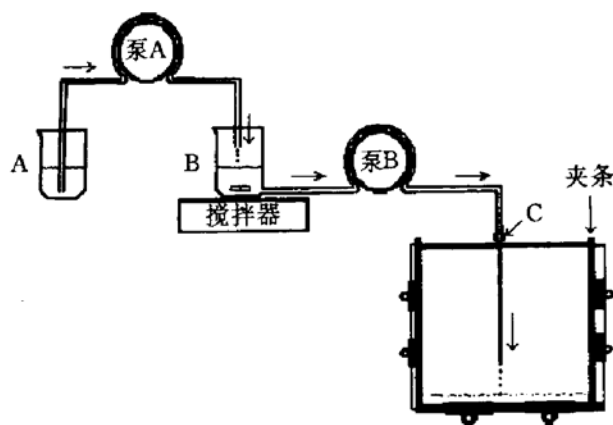


图1 梯度胶灌制装置示意图

按表1配方准确配制的A、B胶溶液分别置于A、B容器中，A泵按B泵输液量1/2的速率将A液滴加到B容器中，用电磁搅拌子将B容器中胶液充分混合，由B泵将胶液通过长针管C滴入制胶模具底部，注意匀速提高针管，保持与胶面适当的距离。

1.3 方法

我们用 Laemmli 凝胶配方系统^[2]，不同之处是不含 SDS，并在胶溶液中加入尿素，形成脲浓度梯度。表1给出准确灌制一块高15 cm，宽16.2 cm，厚度0.1 cm脲梯度为0~

表1 灌制0~8 mol/L脲梯度胶的配方

	A 溶液 (不含脲， 含15%甘油)	B 溶液 (含8 mol/L脲， 不含甘油)
脲	—	8.484 g
分离胶缓冲液 ¹⁾	3.75 ml	3.75 ml
30% 丙烯酰胺-Bis 液 ²⁾	3.15 ml	3.15 ml
50% 甘油	4.05 ml	—
双蒸水	2.65 ml	2.02 ml
90℃水浴加热助溶，冷至室温		
0.1% 核黄素	67.5 μl	67.5 μl
TEMED	13 μl	13 μl
	玻棒搅匀	搅匀

¹⁾1.5 mol/L Tris-HCl, pH 8.8. ²⁾29.2 g 丙烯酰胺和 0.8 g N'-N-甲叉丙烯酰胺溶于双蒸水，定容至 100 ml.

8 mol/L脲的配方，其总体积为27 ml，丙烯酰胺浓度为 $T = 7\%$ ，交联度 $C = 2.6\%$ ，用于分子量84 000的天然态肌酸激酶的脲梯度电泳。

表1中A胶溶液中加入的15%甘油增加了A液的粘稠度，是用来平衡因B胶液含8 mol/L脲而引起的溶液粘度变化，使不同脲浓度的胶对蛋白质保持同样的电泳阻力。

我们采用核黄素光照催化凝胶聚合，以防止胶在梯度灌制完成前发生聚合。事先调整好蠕动泵A和B的输液流量，使A泵为1，B泵为2。仔细计算A、B胶液的需要量，使A、B胶液总的体积恰如所需，然后将准确配制的A、B胶液分别加进图1中所示的A、B容器中，用A泵将A胶液输送到B容器，磁搅拌子将A、B液混合，再由B泵通过细针管C小心地将胶液输入夹层玻板之中。灌胶时还应注意：a. 灌制一块如表1所述的凝胶，时间在15 min左右；b. 磁搅拌子的转速应保证将B容器中的液体充分混匀；c. 防止灌胶过程中任何部位的胶液外漏；d. 装置中C是长18 cm的空心针头，灌胶时匀速提高针尖距液面的距离，以防止溶液搅动影响线性梯度的均匀形成。

当凝胶充分聚合后，将胶板转90°，使脲梯度垂直于电泳方向，密封夹条调换位置，用1%琼脂糖填充胶底（转向前的侧边），并在上样端灌浓缩胶，借助样品梳形成样品槽。有关Protein II的操作细则参看说明书，其他的样品处理、电泳条件、染色等均与常规电泳相同。

2 技术关键

2.1 均匀的脲梯度分布

在聚丙烯酰胺浓度都相同的情况下，胶中必须有均匀脲梯度分布，才能保证迁移率的改变是由于蛋白质的构象变化所致。

2.2 保持凝胶对蛋白质的泳动阻力均匀

理想的脲梯度胶中，不管脲的浓度如何，都应对蛋白质有相同的电泳阻力。但实际上由于高浓度的脲造成了附加阻力，所以电泳时能

观察到前沿线明显地偏斜。为了克服因脲梯度引起的阻力变化, Creighton^[1,3,4]采取提高不含脲的 A 液中的丙烯酰胺浓度的方法。我们认为这种调节手段是不合理的, 它虽然可以部分地纠正阻力的差别, 但又使整块胶中, 凝胶的浓度不均一。我们用在不含脲的 A 液中加入甘油克服凝胶两端电泳阻力不一致的缺点。用粘度计测定的结果表明, A 液中加入 15% 的甘油可使 A、B 两液的粘度相同。图 2 就是分别用两种手段调节电泳前沿结果的对照。图 2 中显示的条带是加在样品中用作前沿标志的溴酚蓝, 电泳在 pH = 8.3 的电极液中进行, 恒流 40 mA, 电泳 220 min。图 2a 是采取 Creighton 的方法, 电泳结果是溴酚蓝前沿仍有偏斜, 说明在胶中的阻力还不均一。图 2b 是用甘油调节阻力的方法, 电泳结果是溴酚蓝前沿比较平直, 说明在这块胶中阻力比较均匀。显然, 用甘油调节的效果优于提高丙烯酰胺浓度的调节方法。

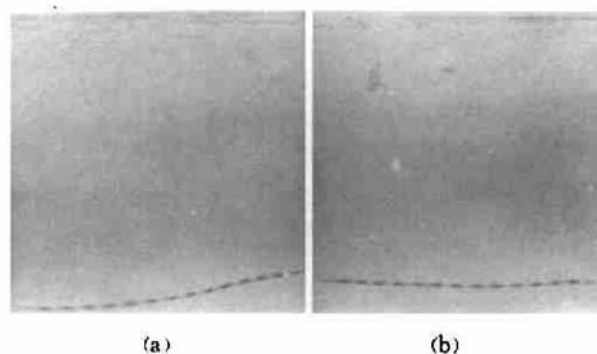


图 2 Laemmli 缓冲系统条件下溴酚蓝前沿的比较

(a) A 液, $T = 15\%$, 不含甘油; B 液, $T = 10\%$, 含 8 mol/L 脲。(b) A 液, $T = 10\%$, 含 15% 甘油; B 液, $T = 10\%$, 含 8 mol/L 脲。照片显示在完全相同的条件下, 用甘油调节粘度的手段能保证前沿线的平直。(凝胶未经染色, 直接照相)。

2.3 浓缩胶样品梳

通常做脲梯度电泳时, 将样品直接加在胶的顶端, 不加样品梳, 给出连续的样品分布如图 3a。我们发现由于聚合后的胶需要转向 90°, 密封夹条要调换位置, 这样的操作常导致上样端的胶面不够平整, 使样品分布不均

匀, 且受边沿效应的影响, 两边的样品泳动常常失真。当我们加灌了 3 cm 的浓缩胶和样品梳后, 电泳结果又有了进一步的改善。图 3 是肌酸激酶 (creatine kinase, EC 2.7.3.2.) 的脲梯度电泳图谱。可以清楚看出, 随脲浓度的增加, 在 0~2.5 mol/L 范围内, 酶的泳动速度加快 (表观分子量减小), 表明二聚体肌酸激酶在低浓度脲作用下的解离过程。当脲浓度增加至 3.5 mol/L, 出现迁移率由快向慢的转折, 表明酶分子的去折叠过程。脲浓度继续增加导致肌酸激酶的完全去折叠, 完全去折叠的肌酸激酶表观分子量明显增大, 因而在凝胶中的迁移速度变慢。图 3 清楚地显现了肌酸激酶的去折叠过程, 图 3a 和 b 两张图谱是用同样的样品在相同的电泳条件下得到的, 所不同的是图 3a 没加浓缩胶和样品梳。两图相比可以看出, 图 3a 中左端边沿区带明显的偏斜不是真实的变化, 而是边沿效应引起的。加了浓缩胶和样品梳后, 给出了十分清晰、满意的结果。

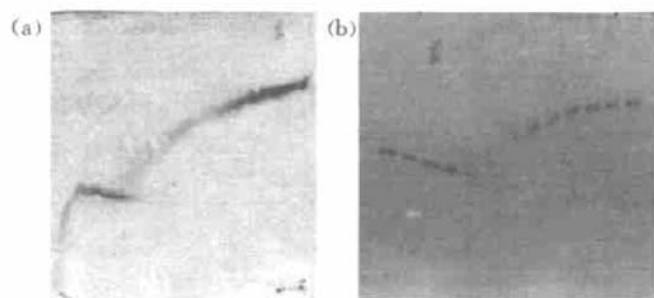


图 3 加浓缩胶样品梳对电泳结果的影响

(a) 无浓缩胶、样品梳的结果, 受边沿胶的影响, 蛋白质条带较为模糊; (b) 加浓缩胶、样品梳的结果。两侧电泳均在同一条件下进行, 样品为肌酸激酶, 电极液为 0.025 mol/L Tris-Gly, pH 8.3, $T = 7\%$, $C = 2.6\%$ 。

脲梯度电泳作为一种试验技术, 应用在蛋白质的去折叠、重折叠、折叠中间体和 DNA 基因突变碱基定位检测等方面, 国外已有不少报道, 而国内尚不多见。据我们的初步经验, 只要把握好上述的技术关键, 脲梯度电泳法是能够更多地发挥作用的。

参 考 文 献

- 1 Creighton T E. J Mol Biol, 1979; 129: 235
- 2 Laemmli U K. Nature, 1970; 227: 680
- 3 Creighton T E. Methods in Enzymology, 1986; 131: 156
- 4 Creighton T E, Shortle D. J Mol Biol, 1994; 242: 670

The Key Technique in Urea-gradient Electrophoresis. Zhou Junxian, Wang Xicheng¹⁾, Zhang Yanling, Zhou Junmei (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101, China*; ¹⁾*Department of Biological Science and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China*).

Abstract An improved procedure by using urea-gradient gel for protein folding and unfolding

investigation is provided. Some key techniques such as urea gradient homogeneity, gel viscosity and gel edge effects have been discussed. An inverse gradient of glycerol is used to compensate for the small effects of urea on the electrophoretic mobilities of both folded and unfolded proteins. The glycerol gradient used here of 15% at 0 mol/L urea to 0% at 8 mol/L urea was designed to give a constant mobility of creatine kinase at all urea concentrations. The gel was photopolymerized in the presence of riboflavin. 5% stacking gel and sample combs were also used on urea gradient gel to improve the sample pattern.

Key words urea-gradient electrophoresis, polyacrylamide gel, protein folding, creatine kinase

改良硫代巴比妥酸荧光法测定血清过氧化脂质

张秀明 严丽娟 柴建开 周伟强 王丽霞

(河南省精神病医院检验科, 新乡 453002)

摘要 对目前使用的过氧化脂质 (LPO) 硫代巴比妥酸 (TBA) 荧光测定法进行了改进. 血清样本在冰醋酸存在的条件下, 100℃ 水解 60 min, LPO 释放的丙二醛 (MDA) 与 TBA 形成复合物, 用甲醇沉淀血清蛋白质并减少非特异性干扰, 以 $\lambda_{ex} = 515 \text{ nm}$ 、 $\lambda_{em} = 550 \text{ nm}$ 测定 MDA-TBA 复合物的荧光强度. 此法操作简便、快速, 结果准确, 荧光稳定. LPO 含量 (以 MDA 表示) 在 0~20 $\mu\text{mol/L}$ 与荧光强度呈线性关系 ($r = 0.9994$), 最低检测限为 0.16 $\mu\text{mol/L}$, 回收率为 105.08%, 重复性 $CV = 4.23\%$.

关键词 过氧化脂质, 荧光, 分光光度法

自由基可使脂质发生过氧化作用而形成 LPO. 体内 LPO 与动脉粥样硬化症、心脑血管疾病、肝脏疾病、糖尿病等多种疾病及衰老密切相关^[1]. 血清 LPO 含量可反映体内自由基水平, 是体内脂质过氧化的指标. 目前, 其测定方法以 TBA 反应法应用最广, 这类方法包括比色法^[1~3] 和荧光法^[1,4,5] 两种, 尤以 TBA 荧光法灵敏度高, 特异性好, 但目前使

用的荧光法操作复杂、预处理时间长, 且方法中所用正丁醇具有强烈刺激性气味, 对人体健康有一定危害. 我们参考文献 [1, 3~6] 对其进行了改进, 经方法学检验和临床应用结果满意.