

产物测序不失为一种检测转基因动物整合的简便、灵敏、特异的理想方法，值得推广。

参 考 文 献

1 Higan B, Costantini F, Lacy E. Manipulating the mouse embryo, a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986. 180~ 182
2 Laird P W, Zijderveld A, Linders K *et al.* Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res*, 1991, **19**: 4293~ 4294
3 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning. a laboratory manual. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 6. 30~ 6. 31

A New Method of Screening Transgenic Animal: PCR and Its Products Sequencing. HE Quan, LI Peng, JIANG Liqun, CHEN Lanying (*Fu Wai Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Cardiovascular Institute, Peking*

Union Medical University, Beijing 100037, China).

Abstract The primary detection of the MLC₂-chymase fusion gene transgenic mice was carried out by means of polymerase chain reaction (PCR) with two specific primers, which span across MLC2 promoter region and chymase structure gene region. The DNA electrophoretic bands of PCR products were recovered and purified, then sequenced by PCR sequencing method with one of the two primers. Final determination of the transgenic mice was conducted through comparing the sequencing results with sequences of transferred gene. This method is convenient, effective and specific.

Key words PCR, screening transgenic animal, PCR sequencing

固相滤纸法测定鼠肝糖原合成酶的活性*

王艳荣¹⁾ 钱荣立

(北京医科大学第一医院, 北京 100034)

贺师鹏 黄天贵

(北京医科大学生物物理系, 北京 100083)

摘要 探求简捷有效的测定鼠肝糖原合成酶活性的方法。固相滤纸法测定该酶活性, 并与文献报告的漂洗法进行比较, 且用此方法观察糖尿病鼠肝糖原合成酶的活性。两种方法所测得放射性计数无明显差异; 糖尿病鼠肝糖原合成酶的活性明显降低。固相滤纸法是一种较简捷, 方便, 不易污染的测定糖原合成酶的方法。

关键词 糖尿病, 滤纸法, 糖原合成酶

糖原合成酶 (GS) 是肝和肌肉糖原合成的限速酶, 是胰岛素作用的主要靶酶, 它对糖代谢的调节和血糖稳态的维持具有重要作用^[1, 2]。糖原合成酶活性的分析测定通常是基于 UDP¹⁴C-G 在 GS 的作用下, 合成具有放射性的糖原, 带放射性的糖原和游离 UDP¹⁴C-G 的分离普遍采用 Thomas 滤纸分析法和柱层析法^[3]。本实验采用了 Whatman No3 滤纸抽滤分离, 而放射性滤纸片直接放入闪烁液测量的方法, 与文献报告的漂洗法相比, 结果表明, 固相滤纸法简单, 快捷, 污染少, 而测定结果

与漂洗法相似^[3]。

1 材料和方法

1.1 材料

UDP¹⁴C-G (英国 Amersham 公司); Whatman No 3 滤纸; 兔肝糖原 III 型, 尿苷二磷酸-葡萄糖 (UDPG), Tris (美国 Sigma 公司); POPOP, PPO (香港), DTT (德国)

* 国家教委回国人员启动基金。
¹⁾ 北京医科大学第三附属医院内分泌科, 北京 100083。
收稿日期: 1996-12-20, 修回日期: 1997-04-30

EDTA, G-6-P, 二甲苯, Na₂SO₄, NaF, 丙酮 (国产). 玻璃匀浆器, 高速离心机, 液体闪烁计数仪 Wallec 1410 型 (Pharmacia 公司瑞典). 恒温空气振荡器.

1.2 方法^[4,5]

1.2.1 肝脏糖原合成酶的制备: 将 Wistar 大鼠引颈处死, 用预冷的剪刀取出肝组织, 0.9% 冷生理盐水冲洗两次, 速冻于液氮中, 然后移入- 70℃冰箱中保存. 临用时称取上述肝组织 0.2 g, 加入 1 ml 50 mmol/L pH 7.8 Tris-HCl 缓冲液中(内含 10 mmol/L EDTA, 5 mmol/L DTT, 50 mmol/L NaF 及 0.25% 兔肝糖原 III 型), 玻璃匀浆器内匀浆, 匀浆液 10 000 g 离心 30 s, 上清液用于糖原合成酶的测定.

1.2.2 糖原合成酶的测定: 取上述上清液 25 μl 加入 50 μl 50 mmol/L pH 7.5 Tris-HCl 缓冲液, 内含 5 mmol/L EDTA、1% 兔肝糖原 III 型、0.75 mmol/L UDPG 和 UDP-¹⁴C (每管为 2.22 × 10⁴ 衰变次数/min (dpm). I 型 (活化型) 酶测定的介质含 15 mmol/L 硫酸钠, 总酶 (I+ D) 活性测定的介质不含硫酸盐, 但是含 10 mmol/L 6-磷酸葡萄糖二钠. 在 37℃条件下, 总酶保温 5 min, 而 I 型酶保温 30 min. 1 单位酶的活性定义为在一定条件下每克肝组织每分钟催化 1 μmol 来自 UDPG 的葡萄糖转入糖原的酶量 (μmol•min⁻¹•g⁻¹).

1.2.3 标记糖原的分离: a. 漂洗法: 将保温介质滴在直径约 2.5 cm 的 Whatman-No 3 滤纸片上, 然后立即将该纸片浸泡在 70% 的乙醇中. 5 min 后, 将该纸片转移到大烧杯中, 并在恒温空气振荡器上摇动, 用 500 ml 70% 的乙醇漂洗 30 min, 每 10 min 更换乙醇, 最终用丙酮漂洗 5 min, 干燥后将其转移到液闪瓶中, 添加 1 ml 水将滤纸完全浸湿, 使糖原溶解, 然后加入 5 ml 闪烁液 (0.5% PPO 和 0.05% POPOP, Triton X-100: 二甲苯为 3: 7), 用液体闪烁计数仪测定放射性. b. 抽滤法: 保温介质中加入 0.5 ml 70% 乙醇以终止反应, 置于冰浴中, 反应介质滴在直径为 2.5 cm Whatman-No3 滤纸上, 用真空泵进行抽滤,

继而 70% 乙醇冲洗两次, 最后丙酮冲洗, 干燥后加入 5 ml 闪烁液 (0.5% PPO 和 0.05% POPOP 的二甲苯溶液), 用液体闪烁计数仪测定放射性.

1.3 数据处理

根据数据的性质及分布情况分别采用 *t* 检验和方差分析.

2 结 果

我们对抽滤法和漂洗法进行了比较, 得出结果表 1.

表 1 抽滤法和漂洗法测定 GS 的比较				
放射性计数/ min				
酶类型	例数 <i>I n</i>	抽滤	漂洗	<i>P</i>
失活酶	4	148.55 ± 46.10	111.58 ± 26.17	> 0.2
I 型酶	6	881.67 ± 93.75	798.92 ± 77.01	> 0.1
总酶 (I+ D)	6	1413.22 ± 85.37	1283.75 ± 172.78	> 0.1

注: $\bar{x} \pm s$.

从表 1 中可以看出, 两种方法所得出的结果非常接近, 两组数据基本上无差异; 而且抽滤法的绝对值均略高于漂洗法, 这可能与长时间的漂洗致使少量的标记糖原水解或溶解不彻底有关.

对均相法与固相法比较的结果如下: 取总放射性为 (21856.9 ± 134.05) 衰变次数/min 的 UDP-¹⁴C-G, 滴在 Whatman-No 3 滤纸片上, 干燥后一组滤纸片添加 1 ml 水将滤纸完全浸湿后加入 5 ml 含 Triton X-100 的闪烁液, 而另一组直接加 0.5% PPO 和 0.05% POPOP 的二甲苯溶液, 用液体闪烁计数仪测定放射性, 前者测得的计数率为 (19642.1 ± 142.5) 放射性计数/min, 其衰变率 (1982.9 ± 153.2) 衰变次数/min, 其计数效率 93.61% ± 12.14%; 后者测得的计数率为 (18058.1 ± 193.4) 放射性计数/min, 因此其计数效率为 86.06% ± 9.31%, 故由此计数效率可算出滤纸上的放射性活度, 进一步得出酶的活性.

通过对上述结果的比较, 本实验采用了固相抽滤的方法对糖尿病鼠肝糖原合成酶进行测定, 结果见表 2.

表 2 糖尿病鼠肝糖原合成酶活性改变				
$\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$				
组别	例数	I 型	I+ D 型	I/(I+ D)
实验组(T)	13	0. 18 $\pm$ 0. 06 ¹⁾	1. 52 $\pm$ 0. 43 ¹⁾	0. 12 $\pm$ 0. 04
对照组(C)	17	0. 24 $\pm$ 0. 09	1. 84 $\pm$ 0. 42	0. 14 $\pm$ 0. 05

注: $\bar{x} \pm s$; ¹⁾ $P < 0. 05$.

表 2 显示, 无论是活化型, 还是总酶的活性, 实验组动物都明显低于对照组, 说明对于糖尿病鼠肝糖原合成酶的活性下降, 这可能与肝糖原合成酶对胰岛素刺激的敏感性降低有关, 也可能是产生胰岛素抵抗的一个重要细胞内缺陷的因素, 且本实验的结果与文献报告相符, 也支持这种方法的可行性.

3 讨 论

糖原合成酶作为糖原合成的限速酶, 它对血糖稳态的维持起着重要作用. 而糖原是葡萄糖的主要贮存形式, 糖尿病鼠主要的细胞内在缺陷在于糖原合成^[6], 因此, 对糖尿病动物模型糖原合成酶的研究, 有助于了解胰岛素抵抗的细胞内生化基础, 这对于进一步研究占糖尿病绝大多数的非胰岛素依赖型糖尿病的发病机理具有重要意义. 故寻找一个快捷, 简单, 准确的测定方法就显得尤为重要.

如前所述, 漂洗法需要较大量的 70% 乙醇进行漂洗 (每次 500 ml), 每次需要更换 2 次, 而且未被结合的 UDPC¹⁴C-G 从滤纸上洗脱后, 容易造成污染; 而抽滤法则克服了上述缺点, 保温介质用多头细胞收集器将¹⁴C-糖原收集在 Whatman 滤纸上, 游离的 UDPC¹⁴C-G 被洗脱, 收集入抽滤瓶中, 避免了污染, 而且固相法避免了对液闪瓶的污染, 可重复应用, 因此我们认为固相抽滤法是一种较简单, 快捷, 方便, 不易污染的测定糖原合成酶之方法, 它可为其他同类实验提供一种参考, 但更

为准确有效的方法仍需进一步探讨.

参 考 文 献

1 谢明智, 刘海帆, 张凌云等. 实验性肥胖及糖尿病大鼠模型. 药学报. 1985, 20 (11): 801~ 806

2 Golden S, Wals P A, Katz J. An improved procedure for assay of glycogen synthase and phosphorylase in rat liver homogenates. Anal Biochem, 1977, 77: 436~ 445

3 Thomas J A, Schlender K K, Larnier J *et al.* Rapid filter paper assay for UDP glucose glycogen glucosyl transferase, including an improved biosynthesis f UDP-glucose. Anal Biochem, 1968, 25: 486~ 499

4 Keuszynska Y T, Home P D. Liver and muscle insulin sensitivity, glycogen concentration and glycogen synthase activity in a rat model of non-insulin dependent diabetes. Diabetologia, 1988, 31: 304~ 309

5 Kruszynska Y T, Home P D, Alberti K G M M. *In vivo* regulation of liver and skeletal muscle glycogen synthase activity by glucose and insulin. Diabetes, 1986, 35: 662~ 667

6 Kida Y, Antonella Esposito-del Puente, Bogardus C *et al.* Insulin resistance is associated with reduced fasting and insulin-stimulated glycogen synthase phosphatase activity in human skeletal muscle. J Clin Invest, 1990, 85: 476~ 481

A Solid Phase Filter Paper Method for the Assay of Glycogen Synthase Activity in Rat Liver. WANG Yanrong, QIAN Rongli (*Department of endocrinology of the first hospital of Beijing Medical University, Beijing 100034, China*); HE Shipeng, HUANG Tian-gui (*Department of Biophysics of Beijing Medical University, Beijing 100083, China*).

Abstract A method improved for the assay of glycogen synthase (GS) is proposed in the present study. GS activity in NIDDM rat liver is determined by the solid phase filter paper method in comparison with washing method reported in the literatures. There is no obvious difference in the determination of radiation counts between the two methods. This method has been employed in the determination of GS activity of the diabetic rat liver, which exhibited more decrease then the normal rat liver. Therefore, the solid phase filter paper method is simple, convenient for the assay of GS activity and shows no tendency to be polluted.

Key words diabetes mellitus, filter paper method, glycogen synthase