

改进的薄层组织电泳技术对鸡胚及小鼠脏器组织同工酶的分析

殷勤伟 薛社普

(中国医学科学院基础医学研究所)

引言

50年代末, Hunter 和 Market^[1]把淀粉凝胶电泳和酶活性特异染色法结合,建立了同工酶谱的分析方法。70年代初,等电聚焦电泳的应用,分辨出了同工酶的亚带^[2],80年代前后, Bonte^[3]等用组织电泳法对定位的微量组织中同工酶谱在病理情况下的变化进行了研究,避免了在生化提取过程中可能出现的对酶活性有不良影响的种种因素。这一方法目前已应用于生物学和医学的研究,尤其用于临床活检和尸检标本的快速分析^[3-8]。

然而此方法至今主要局限于对可溶性同工酶类的分析,对膜结合性同工酶类的研究极为少见。本文用薄层组织电泳结合酶活性快速显色等改进的方法,对鸡胚脊髓组织中同工酶进行了研究,结果表明本法能较好地显示膜结合性同工酶和可溶性同工酶,而且比一般的方法有更高的灵敏度、稳定性和重复性。

材料和方法

一、器材和试剂: 高压电泳仪(江苏丹阳无线电一厂),等电聚焦多用途水平槽(北京六一仪器厂)。载体两性电介质(Ampholyte)pH 3.5—10(中科院上海生化所产品), 丙烯酰胺和 N,N'-甲叉双丙烯酰胺(Fluka 公司产品), 二硫苏糖醇(DTT), Triton X-100(merck 公司产品)

二、方法:

1. 制胶: 具体步骤参见文献^[8], 胶液的配制作些改变: 29.1% 丙烯酰胺和 0.9% N,N'-甲叉双丙烯酰胺混合液 2 ml, 60% 甘油 2.5 ml, 40% 安福林(pH 3.5—10) 0.6 ml, 加 Triton X-100 0.06 ml, 提高膜结合性蛋白的溶解性, TEMED 10 μ l 经孔径为 0.45 μ m 微孔滤膜过滤, 置 -10℃ 冰箱 3 分钟后, 加 40% 过硫酸胺 10 μ l, 混合均匀后用吸管注入胶膜。45 分

钟后置 4℃ 冰箱中存放。

2. 样品制备: 鸡胚脊髓和小鼠脏器组织的制备方法见文献^[8]。

3. 加样: 根据所要分析的酶的具体情况, 选择加样部位。一般规则是: 等电点偏酸的酶, 在碱性端加样, 偏碱的酶在酸性端加样。如分析的是膜结合性同工酶, 加样后, 在样品上可覆盖一层含有 2% Triton X-100 的滤纸, 以增加此酶的进胶量。

4. 电泳: 具体要求见文献^[8], 应注意的是适当延长样品的进胶时间, 去样品后再聚焦 2 小时即可进行酶活性显色。

5. 酶活性显色:

a. 琥珀酸脱氢酶(SDH): 称取琥珀酸钠 60 mg, 氯化镁 40 mg, 吩嗪二甲酯硫酸盐(PMS) 10 mg, 氰化钾 0.5 mg, 维生素 K₃ 10 mg, 溶于 0.3 mol/l Tris-HCl 缓冲液中(pH 7.2), 20 mg 四硝基蓝四唑溶于 1 ml 二甲基亚砜(DMSO)中, 总量 15 ml。显色前将它们充分混合, 过滤, 在暗室中玻棒将酶显色液均匀地铺在胶面上。40℃ 下显色 15 分钟即可见到酶的蓝紫色带型。用 7.5% 乙酸洗去显色液。室温下干燥保存。

b. 乳酸脱氢酶: 50 mg 乳酸钠, 5 mg 氧化型辅酶 I(NAD⁺), 2.5 mg 四硝基蓝四唑(TNBT), 1.25 mg 吩嗪二甲酯硫酸盐(PMS)溶于 1 ml 的 0.2 mol/l Tris-HCl 缓冲液(pH 8)中。以 50 μ l/cm² 的显色液均匀地铺在胶面上, 暗室中 38℃ 下显色 5 至 10 分钟, 用 40% 乙醇固定, 室温下干燥保存。

c. 胆碱酯酶: 0.2 mol/l 柠檬酸缓冲液(pH 5.5) 40 ml, 20 mmol/l 硫酸铜, 40 mmol/l 铁氰化钾, 20 mg 氯化镁, 20 mg 碘化乙酰硫胆碱。保温 4 小时后可见到黄棕色显色带。

d. 非特异性酯酶: 分别将 20 mg α -和 β -萘酚醋酸溶于 1 ml 的丙酮中, 将 50 mg 的固蓝 B 溶于 15 ml 的双蒸水中。用前充分混合, 过滤, 浸泡经过 0.3 mol/l 磷酸缓冲液(pH 7.2) 预处理的醋酸纤维膜 30 分至 1 小时, 去除膜上多余的显色液, 将其铺在胶面上, 50℃ 下 10 分钟, 即可在无背景的胶面上见到棕色的区带。

结果

一、灵敏度 and 分辨力

图1、2、3、4和5分别显示了薄层组织电泳将鸡胚脊髓中LDH同工酶分成15条亚带(图1),琥珀酸脱氢酶同工酶分成8条亚带(图2),胆碱酯酶同工酶分成10余条亚带(图3),和将小鼠心肌、肺等组织中的LDH同工酶分为30余条亚带(图4),非特异性酯酶同工酶分为50余条亚带(图5)。

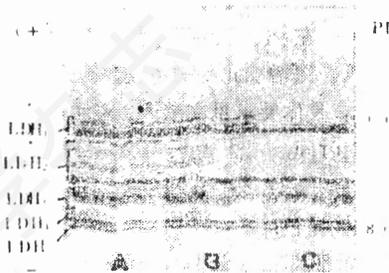


图1 鸡胚和鸡雏的腰段脊髓LDH同工酶亚带的组织等电聚焦电泳图谱
A. 生后40天 B. 生后5天 C. 胚胎18天

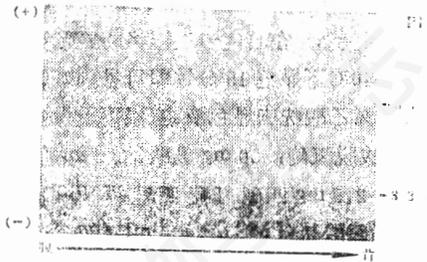


图2 18天鸡胚腰段脊髓背腹不同区域中琥珀酸脱氢酶同工酶的组织等电聚焦电泳图谱

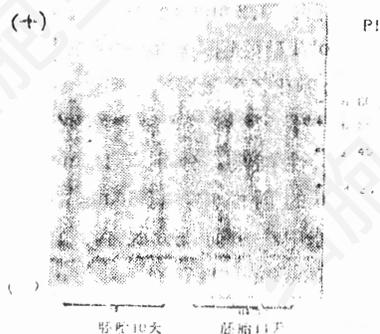


图3 鸡胚腰段脊髓中胆碱酯酶同工酶亚带的组织等电聚焦电泳图谱

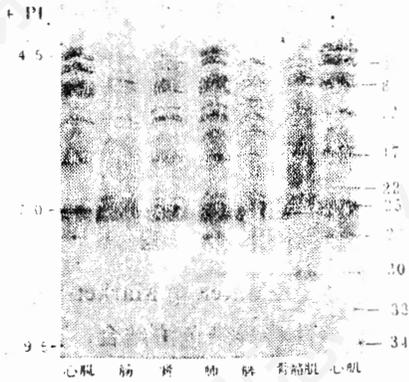


图4 小鼠六种不同组织中LDH同工酶亚带的组织等电聚焦电泳图谱

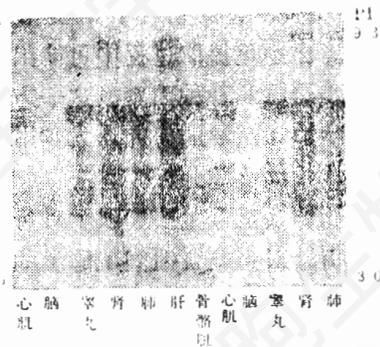


图5 小鼠七种不同组织中非特异性酯酶同工酶亚带的组织等电聚焦电泳图谱

二、同工酶在组织电泳中的定性分析

用特定底物和相应的反应液,可在凝胶面上显示特定的同工酶的亚带,然后即可对区带进行定性的分析。图4显示了小鼠6种不同组织中的LDH同工酶的组织电泳图谱,图中可见小鼠LDH同工酶主要分布在pH4.5至pH7.5之间,各脏器组织的LDH同工酶谱互有差异,其中骨骼肌的LDH同工酶有30余条亚带。心肌和骨骼肌比较,可见心肌LDH 1,2的活性较高,而骨骼肌的LDH 4,5亚带则显色较深,肝、肺和肾的LDH活性及亚带亦较多,而小肠的LDH同工酶亚带较少,活性亦较低。鸡胚脊髓组织中出现15条LDH同工酶亚带,分布于pH6.6至8.6之间,亚带数目较哺乳类的少,条带分布域亦较狭窄。由此表明组织电泳能较灵敏地分辨不同种属动物的同工酶。

图5为用非特异性酯酶组化方法显示出的小鼠7种组织同工酶的组织电泳图谱,可见非特异性酯酶的pH值域较大,从3.5到10之间,其亚带较多,高达50余条。不同组织间的差异亦非常明显。

三、同工酶的定量和定位分析

图2为18天胚龄的鸡胚腰段脊髓中琥珀酸脱氢酶同工酶的亚带图谱,可见同工酶的质与量的变化发生在脊髓由背至腹的不同区域上,采用电泳扫描法对不同区域中琥珀酸脱氢酶(SDH)活性进行定量的分析比较。自动扫描仪绘制的SDH同工酶的曲线图见图6,根据图6通过微电脑计算由背至腹不同切片区域

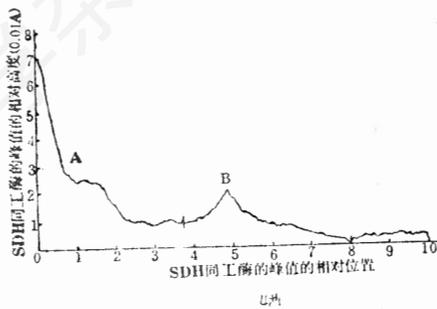


图6 SDH同工酶的密度扫描曲线图

A示pI为8.3处的同工酶, B示pI为6.7处的同工酶

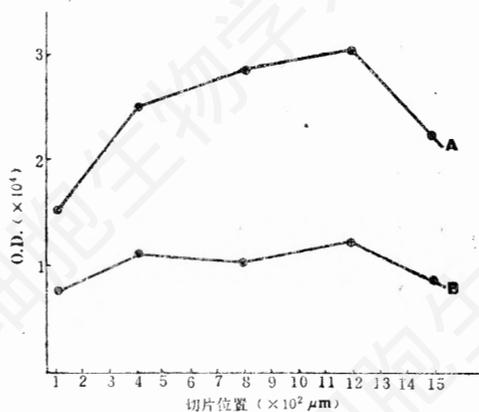


图7 18天鸡胚腰段脊髓由背至腹连续切片上琥珀酸脱氢酶同工酶的组织等电聚焦电泳区带的光密度值的变化

A示pI 8.3处的亚带, B示pI 6.7处的亚带

SDH同工酶的相对活性,其变化见图7。从图6和7中可见18天鸡胚腰段脊髓背部的SDH活性较低,而腹部其活性逐渐增高,腹部区域大致可分辨8条亚带,而背部的亚带却较少。

四、膜结合性同工酶

采用含有Triton X-100的聚丙烯酰胺凝胶和在样品上覆盖含有Triton X-100的滤纸片,可以提高膜结合性同工酶的溶解性和进胶量。图3表现了鸡胚腰段脊髓中胆碱酯酶同工酶亚带的pI差异,此同工酶的主要区带分布在pH 6.5至7.2之间,还有一些次要亚带在这区段的两边,共可分辨出10余条亚带。由此可见改进后的组织电泳完全能够用于膜结合性同工酶的分和分析,这样便扩展了组织电泳的应用范围。

讨 论

一、方法改进后的酶活性显色灵敏度

影响酶活性显色灵敏度的因素有三个方面:1.生化提取过程中人为地造成酶蛋白的降解、修饰、丢失或变性,降低了酶活性显色的灵敏度。2.用淀粉、纤维膜或聚丙烯酰胺凝胶为支持物的一般电泳可将LDH分成5条区带^[1],而等电点聚焦电泳可将其分为十几条区带^[8,9]。3.电泳后的凝胶浸泡在显色液中时间过长可造成酶蛋白扩散和丢失,以致酶活性显色浅淡和模糊。

薄层组织电泳结合酶活性快速显示法克服了上述三方面的缺点,大大地提高了同工酶显色的灵敏度。其优点为:(1)电泳直接提取组织切片中的同工酶,避免生化提取时酶量的丢失,并保持了酶结构的自然状态。(2)采用高压薄层电泳,减少了焦耳热对酶的影响,缩短了电泳时间,使蛋白质区带更为清晰。(3)由于加大酶的底物浓度,提高显色温度,减少显色时间和酶蛋白扩散和丢失的机会,从而使同工酶显色的灵敏度得到提高,产物色带更为清晰。

我们的方法经过近百次的实验,结果证明

是具有高度的重复性和稳定性的,这一特点亦是其他电泳方法较难办到的。它也许能为今后制定同工酶亚带图谱提供新的分带标准。

二、组织电泳对膜结合性同工酶的显示

组织电泳至今多用于可溶性蛋白和酶的分析,极少用于膜结合性蛋白或酶的研究^[4,7]。因为后者很难在水相溶解,这也许是所用的凝胶性质和切片处理方法上的限制所造成的。一般组织电泳所用凝胶不加去垢剂,切片也不经溶膜试剂处理,故与膜结合的蛋白很难入胶被分离。在我们实验中采用在凝胶中加入 Triton X-100 和切片先用 Triton X-100 处理的方法,从而增加了膜结合性酶的分离和进胶能力。在组织电泳对琥珀酸脱氢酶和胆碱酯酶的分离中得到了较好的结果,证实了我们方法的可行性。

三、LDH 同工酶的亚带问题

Yamamura^[10]用微型电泳法将小鼠组织的 LDH 同工酶分成 15 条亚带。并认为 A 亚基有三种不同的存在形式即 A₁, A₂, A₃, 而 B 亚基只有一种类型。根据因子分离组合定律,理论上在组织可能存在着 35 种 LDH 同工酶亚带,但至今尚未证实。最近,李士鹏等报告^[9]用等电聚焦电泳可将北京鸭 LDH 同工酶分成 11 条亚带,提出鸟类中的 LDH 同工酶可能由两种 B 亚基类型和 1 种 A 亚基类型组成,按此计算,理论上应存在 15 条亚带,但至今也尚未得到实验证明。本实验采用薄层组织电泳法,首次将小鼠的 LDH 同工酶分成 34 条亚带,将鸡胚脊髓中 LDH 同工酶分成 15 条亚带,与上述推论的条带数量接近一致,从而为小鼠组织中的 LDH 同工酶存在着三种 A 亚基和一种 B 亚基及其全部组合类型提供了直接证据。同时也为鸡组织中的 LDH 同工酶存在着两种 B 亚基和一种 A 亚基及其全部组合类型提供了可靠依据。这些发现使我们对 LDH 同工酶有更进一步的认识,对不同组织中存在数量不同的亚带以及它们与组织发生及分化的关系上,在阐明不同种属动物组织特征上将有重要意义。不

同同工酶类型及亚带表型可能反映了不同种属动物及不同组织中同工酶相关基因的多型性,表达的差异性 or 生理功能上的复杂性,同一组织的不同部位或同一细胞的不同亚细胞器中,可能都具有各自适当的同工酶,在不同的微环境中高效地参与细胞和组织的相应代谢活动。同工酶亚带的本质和它们与生理功能的相关性等等,组织电泳技术将可提供有价值的研究手段。

摘 要

本文介绍用改进的组织电泳及快速酶活性显色法对鸡胚脊髓及小鼠脏器组织切片中可溶性和膜结合性同工酶的分析研究。结果表明:本方法能成功地将鸡胚脊髓中的 LDH 同工酶分成 15 条亚带,胆碱酯酶分成 10 余条亚带,琥珀酸脱氢酶分成 8 条亚带,并将小鼠脏器组织中的 LDH 同工酶分成 34 条亚带,非特异性酯酶分成 50 余条亚带。为对不同物种同工酶的亚基组成、组合类型与酶谱变化的分析、动物组织种属的鉴定与临床标本的鉴别诊断提供了依据和实验手段。

参 考 文 献

- [1] Hunter, R. L. et al., 1957, *Science*, 125:1294.
- [2] Klose, J. et al., 1975, *Biochem. Genet.*, 13:707.
- [3] Bonte, W. et al., 1981, *Science Tools*, 28:1.
- [4] Olsson, T. et al., 1983, *Acta. Neurol. Scand.*, 67:202.
- [5] Thompson, B. J. et al., 1981, *Electrophoresis*, 2:251.
- [6] D' Andrea, A. L. et al., 1985, *Electrophoresis*, 6:468.
- [7] 陈世雄等, 1984, *实验生物学报* 17:161.
- [8] 殷勤伟, 薛社普, 1989, *细胞生物学杂志* 11(2):85-89.
- [9] 李士鹏, 吴鹤龄, 1986, *遗传学报* 13:60.
- [10] Yamamura, K. I., 1979, *J. Exp. Zool.*, 208:271.