DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.02.031

技术方法

文章编号:1000-5404(2003)02-0166-02

建立尿素-SDS-PAGE分离COX亚基技术

Establishment of urea-SDS polyacrylamide gel electrophoresis for seperating cytochrome oxidase subunits

谭小玲[1],柳君泽[1],黄小勇[2] (第三军医大学:[1]高原军事医学系病理生理学教研室,重庆 400038;[2]附属新桥医院眼科,重庆 400037)

提 要:目的 建立以线粒体蛋白为样本的COX亚基分离方法。方法 用四种不同的蛋白变性液,通过尿素变性及非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,结合免疫印迹法分析线粒体蛋白中COX亚基分离效果。结果 A液处理的线粒体蛋白经尿素-SDS-PAGE分离COX亚基效果最好。结论 尿素-SDS-PAGE是分离线粒体蛋白中COX亚基的理想方法,尿素和EDTA是蛋白质变性液中的必需成分。

细胞色素氧化酶(Cytochrome oxidase,COX)是由线粒体和核基因组共同编码的13条多肽亚基组成的线粒体内膜蛋白,在能量代谢中起关键作用。研究COX亚基蛋白表达对于在分子水平上探讨细胞能量代谢有重要意义。1980年Merie等用尿素-SDS-PAGE分离提纯的COX中的蛋白亚基,但COX的提纯过程复杂,消耗的线粒体蛋白量大,因此以提纯COX蛋白为样本研究其亚基表达受组织来源及实验条件的限制。然而目前采用的线粒体蛋白电泳条件常使COX亚基组分不能彻底分离而影响杂交结果。本研究进行深入探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠抗人COXⅠ和抗牛COXⅣ单克隆抗体购自Molecular Probe公司,其它试剂为进口分装。

1.2 实验步骤

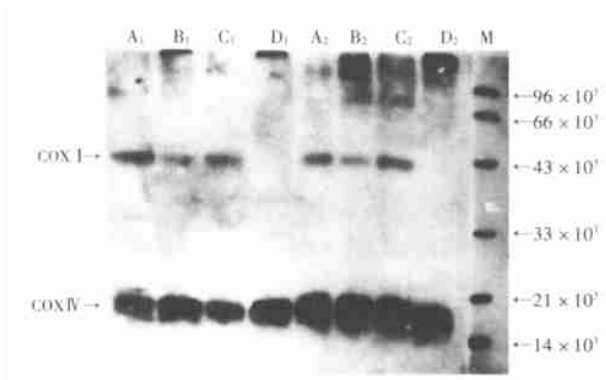
1.2.1 线粒体蛋白样品的制备与处理 采用本室建立的梯度离心法提取大鼠脑皮质线粒体[1],用Lowry′s法测定蛋白浓度。40 μg线粒体蛋白分别与四种变性液混合至总体积20 μl,四种变性液:A液,50 mmol/L Tris-Cl,pH 6.8,2% SDS,2 mmol/L EDTA,pH 7.0,4%β-巯基乙醇,10%甘油,0.03%溴酚蓝,8 mol/L尿素;B液除不含尿素外,余与A液相同;C液,50 mmol/L Tris-Cl,pH 6.8,1%SDS,4%β-巯基乙醇,12%甘油,0.01%溴酚蓝,8 mol/L尿素;D液除不含尿素外,余与C液相同。各混合液于100 ℃加热7 min,冰上冷却后,按加和不加β-巯基乙醇(1 μl)分为两组,分别标记为A_1、A_2,B_1、B_2,C_1、C_2,D_1、D_2。

1.2.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳和免疫杂交分析 经处理的线粒体蛋白分别行非变性和变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。凝胶由4%的浓缩胶和13%的分离胶组成,变性聚丙烯酰胺凝胶中尿素浓度为8 mol/L。免疫杂交过程参照《分子克隆》。

2 结果

2.1 SDS-PAGE分离COX亚基蛋白的免疫杂交

A_1、C_1产生了明显的两条带。B_1、D_1除了产生Ⅳ亚基条带外,在加样孔附近出现了一条大于96×10^3的条带—"鬼带(Ghost band)"[2]。补加β-巯基乙醇对杂交结果没有明显影响,见图1。



A_1、B_1、C_1、D_1分别代表A液、B液、C液和D液处理组不补加β-巯基乙醇的免疫印迹结果;A_2、B_2、C_2、D_2分别代表A液、B液、C液、D液处理组补加β-巯基乙醇的免疫印迹结果;M:蛋白质分子量标准物

图1 SDS-PAGE分离COX亚基的免疫印迹

2.2 尿素-SDS-PAGE分离COX亚基蛋白的免疫杂交

A_1、B_1、C_1、A_2、B_2及C_2均产生了清晰的两条带;D_1、D_2均只产生Ⅳ亚基条带,见图2。

2.3 亚基分离效果的鉴定

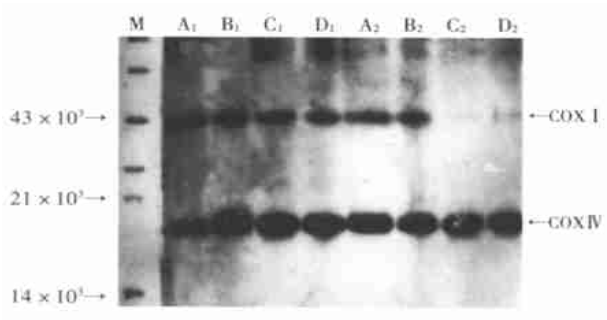
A液处理的线粒体蛋白经尿素-SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳、转印后,分别用相同浓度的COXⅠ单抗、COXⅣ单抗及两者的混合液杂交,见图3。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30097290);全军"十五"医药卫生科研基金资助项目(01MB109)

作者简介:谭小玲(1973—),女,湖南省湘乡市人,硕士,讲师,主要从事缺氧神经系统功能及能量代谢方面的研究。电话:(023)68752339-8211

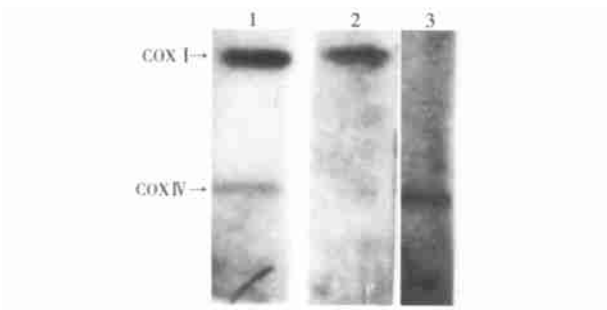
收稿日期:2001-07-18;修回日期:2002-04-16

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



A_1、B_1、C_1、D_1 分别代表 A 液、B 液、C 液和 D 液处理组不补加β-巯基乙醇的免疫印迹结果；A_2、B_2、C_2、D_2 分别代表 A 液、B 液、C 液、D 液处理组补加β-巯基乙醇的免疫印迹结果；M：蛋白质分子量标准物

图 2　尿素-SDS-PAGE 分离 COX 亚基的免疫印迹



a：用小鼠抗人 COX Ⅰ 单克隆抗体液杂交结果，大小约 43×10^3；b：用小鼠抗牛 COX Ⅳ单克隆抗体液杂交结果，大小约 17×10^3；c：用两种单克隆抗体混合液杂交结果，产生与 A、B 对应的两条带

图 3　尿素-SDS-PAGE 分离 COX 亚基Ⅰ、Ⅳ的效果鉴定

3　讨论

COX Ⅰ 和 Ⅳ是分别由 mtDNA 和 nDNA 编码的 COX 最大的两个亚基，Ⅰ 是形成酶活性中心的亚基之一，Ⅳ 通过磷酸化以及与 ATP/ADP 的相互作用参与调节酶活性[3]。研究这两个亚基的蛋白量变化，可以反映 mtDNA-nDNA 在蛋白水平上的相互作用，也有助于认识 COX 活性与亚基蛋白量之间的关系。

SDS-PAGE 分离线粒体蛋白的杂交结果说明，A 液效果最好。B 液和 D 液处理不能使 COX 亚基充分解离而产生“鬼带”[2]，见图 1。补加β-巯基乙醇改善了 B 液的处理效果，对 D 液处理结果没有影响，提示分离线粒体蛋白中 COX 亚基必需用尿素和 EDTA。Schagger 等[4] 以提纯的 COX 为样本时，发现亚基充分解离最理想的变性剂是尿素。EDTA 可阻止还原剂的氧化，防止冷却时亚基蛋白重新缔合[3]。我们进一步的研究表明，尿素-SDS-PAGE 分离线粒体蛋白，变性液中加入尿素和/或 EDTA 都可产生理想的结果，而凝胶中加入尿素，杂交结果更清晰。单抗的鉴定证实 A 液处理的线粒体蛋白经尿素-SDS-PAGE，COX 亚基充分解离，杂交条带是亚基蛋白相对含量的反映。

本方法在以往研究的基础上，避免了烦琐的 COX 提取过程和提取中的损失，能真实反映线粒体内 COX 各亚基的蛋白量；由于核基因编码的亚基是在胞浆中合成后运输到线粒体，然后与线粒体基因编码的亚基在线粒体内膜上识别并组装成有功能的 COX 全酶，因此，该方法是考察亚基在线粒体中的总量和分布的有效途径，在深入研究 COX 亚基转运、亚基组装中将有很好的应用价值。

关键词：细胞色素氧化酶；尿素；聚丙烯酰胺凝胶电泳
中图法分类号：R394-33　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 高文祥，柳君泽，吴利平，等. 急、慢性缺氧对大鼠脑线粒体能量代谢的影响[J]. 中国病理生理杂志，2000，16(10)：879－882
[2] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]，北京：科学技术出版社，1999. 76－78.
[3] Lenka N, Vijayasarathy C, Mullick J, *et al*. Structural organization and transcription regulation of nuclear genes encoding the mammalian cytochrome c oxidase complex[J]. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 1998, 61: 309－344.
[4] Schagger H, Jagow GV. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the sepatation of proteins from 1 to 100kDa[J]. Anal Biochem, 1987, 166(2): 368－379.

（编辑　薛国文）

文章编号：1000-5404(2003)02-0167-03

技术方法

大鼠同种异体耳廓异位移植模型的可行性探讨

Feasibility of rat model of heterotopic auride allotransplantation

孙志成[1]，李世荣[1]，曹　川[1]，吴　军[2]　（第三军医大学附属西南医院：[1] 整形美容中心；[2] 全军烧伤研究所，重庆 400038）

提　要：目的　建立稳定的大鼠同种异体耳廓移植模型。方法　将动物分为 A、B 两组。每组均以 10 只 SD 大鼠为供体，10 只 Wistar 大鼠为受体进行原位及异位移植。原位移植的静脉选择颈外静脉，动脉选择颈外动脉，动脉吻合平面选

作者简介：孙志成(1970－)，男，黑龙江省双城市人，硕士，主治医师，主要从事移植免疫方面的研究。电话(023)68754192
收稿日期：2001-05-16；修回日期：2002-02-11

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net