DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.11.042

3 讨论

端粒酶具有双重作用。端粒酶的过量表达是肿瘤细胞无限增殖的必要条件,另一方面端粒酶的适量表达可以减缓染色体端粒丢失速度,从而延长细胞的寿命[1~3]。由于hTRT基因是端粒酶组份中真正具有调控端粒酶活性的亚单位,为此,我们成功构建了hTRT正、反义真核表达载体,一方面为肿瘤细胞的hTRT反义基因治疗创造条件,另一方面亦可以将hTRT正义真核表达载体导入正常体细胞中,从而为建立来源于正常体细胞的永生化细胞株奠定基础。

关键词:端粒酶;人端粒酶蛋白催化亚单位
中图法分类号:R394-33 文献标识码:B

参考文献:

[1] Meyerson M, Counter C M, Eaton E N, *et al*. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is upregulated in tumor cells and during immortalization[J]. Cell, 1997, 90(4): 785-795.

[2] Nakamura T M, Morin G B, Chapman K B, *et al*. Elomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human[J]. Science, 1997, 277(5 328): 955-959.

[3] Morales C P, Holt S E, Ouellette M, *et al*. Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase[J]. Nat Genet, 1999, 21(1): 115-118.

(编辑 薛国文)

技术方法

文章编号:1000-5404(2000)11-1114-02

双向电泳法分离LDH同工酶异常带

Separating abnormal bands of isoenzyme with two-dimensional electrophoresis

刘泽军,江海洪 (第三军医大学附属西南医院检验科,重庆 400038)

提 要:目的 采用双向电泳方法分离LDH同工酶的拖带现象。方法 经常规同工酶电泳后,改变方向90°,再进行第2次电泳将异常带分开。结果 经过2次电泳后,拖带现象消失,5种同工酶被清晰的分离。结论 普通电泳、免疫电泳、双向电泳的结合使用,能有效的分离异常同工酶,消除拖尾现象,确定异常电泳带的性质。

LDH同工酶电泳分析以其组织特异性高而在临床上广泛应用。各种不同的疾病可出现不同的典型酶谱,借此可以准确地对病灶来源准确定位、判断疾病进程和预后状况。但在实际检查工作中,常常出现一些既不是任何疾病的典型酶谱,也不是正常酶谱形式的异常谱型[1],拖尾现象是其中之一,它的出现影响到各同工酶带的分离,给正确提供检验报告造成困难。我们经过反复试验,当出现拖带现象时采用经过两次电泳、改变方向的双向电泳法,可有效的分离同工酶异常带,确定拖尾性质。

作者简介:刘泽军(1955-),男,河北省石家庄市人,硕士,副主任技师,主要从事临床生化方面的研究,发表论文60余篇。电话:(023)68754691

收稿日期:2000-03-14;修回日期:2000-09-26

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

Paragon电泳系统(Beckman),光密度计(Appraise Densitometer System, Beckman),涤纶基醋纤膜(浙江台州路桥四青生化材料厂),抗人IgG,抗人IgA,抗人IgM(Beckman)。

1.2 方法

1.2.1 LDH同工酶测定 采用本室建立的涤纶膜测定法,在Paragon电泳仪上使用涤纶膜作载体,电泳缓冲液为Tris-HCl-巴比妥-EDTA,pH 8.6,150 V,30 min条件下电泳,然后使用夹心法活性染色,最后浓度为:乳酸锂120 mmol/L,MTT 2 mmol/L,PMS 0.08 mmol/L,NAD 5 mmol/L及Tris-HCl 50 mmol/L,在37°C下孵育25 min,5%醋酸终止反应,600 nm处光密度计扫描。

1.2.2 免疫对流电泳[2] 在浸泡好的薄膜的阴极侧10 mm处点上病人血清和对照血清约5 μl,再在距阴极侧13 mm处分别点上抗IgG、抗IgA和抗IgM,然后置入Paragon电泳槽中,150

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

V 电泳 30 min, 取出电泳膜, 置于生理盐水中过夜洗脱蛋白质, 第 2 天进行 LDH 同工酶活性染色。

1.2.3　双向电泳　　按常规点样, 150 V, 电泳 30 min 后, 改变方向 90 ℃, 再电泳 15 min, 然后同工酶活性染色。双向免疫电泳步骤基本同双向电泳, 只是点样时在血清的正极侧 3 mm 处点上抗血清, 染色前要先洗脱蛋白质, 其余步骤均相同。

2　结果

图 1 为一拖带现象的同工酶电泳谱, 其中在 3 带和 5 带之间形成拖带, 分离不开。图 2 为经双向电泳后的染色图像, 拖尾现象消失, 各同工酶被分开。免疫对流电泳鉴定 LDH-免疫球蛋白复合物, 经染色后没有出现被染色带。

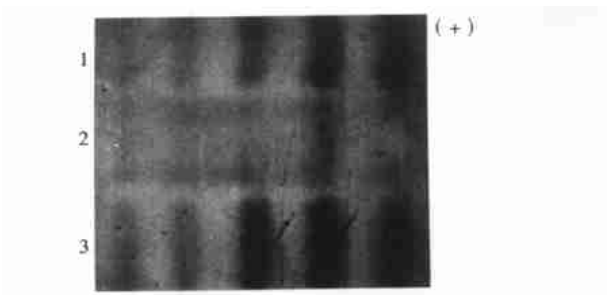


图 1　同工酶拖带的电泳酶谱形式(第 2 泳道)

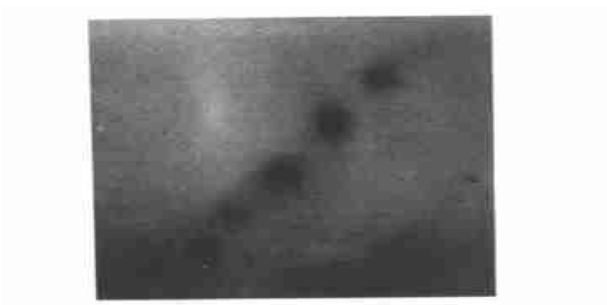


图 2　双向电泳后的酶谱形式

3　讨论

LDH 同工酶在各种疾病中的酶谱形状不同, 如心肌疾病型、肝脏疾病型、肌肉疾病型、血液疾病型等类型, 临床上根据这些不同谱型可对各种疾病进行正确诊断[3]。但有时检查中却出现一些既不是已知疾病的典型图谱, 也不是正常谱型。这些异常结果常给报告结果带来困难, 影响病人的诊断和治疗。

电泳中拖带现象是异常酶谱的一种, 其特征是在各同工酶中形成连接各带的拖尾现象, 使得各带之间不能清晰的分离, 扫描时也不能算出各带所占比例的正确结果, 造成试验失败。拖带现象的出现可能由于血中的某些物质与某一种或几种同工酶结合形成复合物, 在电场中电泳时随结合的同工酶一起移动, 如果结合较松散, 则在移动过程中逐渐解聚, 导致拖尾现象。如果结合较紧密, 则拖尾现象较轻或者不出现, 如大部分的 LDH-Ig 免疫球蛋白复合物[4,5]。

分析中使用改变方向的双向电泳法可以将结合较松散的聚合物分开, 因为改变方向电泳后, 第 1 次电泳中脱落下来的物质已基本不影响 LDH 同工酶的迁移率, 因此各同工酶带按照自己的电泳距离移动, 在电泳膜上形成近似对角线的图像, 比较图 1 和图 2, 可以看出经两次电泳后, 拖尾消失, 同工酶被分开, 因此可以较容易的算出各带所占比例, 给临床报告结果。

经免疫对流电泳鉴定, 没有观察到染色带, 证明本例不是酶-免疫球蛋白复合物, 可能是结合较松散的聚合物, 经双向电泳证实确实如此。因此将普通电泳、免疫电泳、双向电泳结合应用, 对异常同工酶谱型的分析, 特别是拖尾现象的解决, 是一个有效的方法。

关键词: 双向电泳; 同工酶分离; 拖尾现象

中图法分类号: R446.1　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 刘泽军. 乳酶脱氢酶同工酶酶谱异常谱型解析[J]. 国外医学: 临床生物化学与检验学分册, 1998, 19(4): 153－155.

[2] Liu Z, Yang X. Determination of LDH-Ig complex with counter immunoelectrophoresis using terylene cellulose acetate memberane as supporting media[J]. Clin Lab Sci, 1999, 12(3): 134－136.

[3] Maekawa M. Diagnostic significance of lactate dehydrogenase isoenzyme[A]. In: Miyai k, kanno T, Ishikawa E, eds. Progress in clinical biochemistry[M]. London: Oxford Elsevier Science Publishers B V, 1992. 351－355

[4] Tozuka M, Hidaka H, Okumura N, *et al*. A case of immunoglobulin A-λ conjugated with lactate dehydrogenase-5 isoenzyme, causing an extremely high enzyme activity in serum[J]. Clin Chem, 1996, 42(8): 1 288－1 290.

[5] Liu Z, He C, Huang X, *et al*. Lactate dehydrogenase-immunoglobulin G complex in the serum of the postburn patient[J]. Clin Chem, 1998, 44(11): 2 368－2 369

（编辑　冯崇英）

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