DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.04.041

2.2 吸收曲线

取磷标液2.0 ml，按实验方法测定其吸收曲线，实验表明，该显色体系的最大吸收波长为800 nm。

2.3 显色条件

按试验方法，调节不同酸度进行测定，结果显示，在0.25~0.35 mol/L硫酸酸度范围内吸光度值大且稳定，本文选用3 mol/L硫酸溶液1.0 ml。在不同温度、不同时间下显色，测定溶液吸光度，可知显色的最佳温度为45℃，反应20 min后吸光度达到最大值，且保持24 h稳定不变。

2.4 工作曲线

配制一系列磷标准溶液，按实验方法测定吸光度并用最小二乘法处理得工作曲线，磷在0~1.0 μg/ml范围内符合比耳定律，其回归方程为$A=2.389\times10^{-3}C+0.241$，$r=0.9994$，表观摩尔吸光系数为$2.32\times10^{4}$ $L\cdot mol^{-1}\cdot cm^{-1}$。

2.5 试样前处理方法的比较

为验证方法的准确性，本文进行了微波消解与湿法消化、干法消化处理方法的比较，结果见表1。3种前处理法结果吻合，说明本法的准确性。

表1 3种前处理肺组织方法中磷含量对照(mg/g)

样品	微波消解法	湿法消化法	干法消化法
1	0.332	0.337	0.331
2	0.359	0.345	0.360
3	0.336	0.344	0.332
4	0.371	0.361	0.367
5	0.324	0.354	0.328

2.6 试样分析

对2份肺组织样品按实验方法重复测定6次，计算方法精密度。在此试样中，加入磷标准液，重复测定5次，以平均值计算回收率，结果见表2。

表2 肺组织中磷的测定结果($n=6$)

样品	磷加入量(mg/g)	磷总量(mg/g)	回收率(%)	RSD(%)
1	-	0.329	-	1.5
	0.500	0.836	101.4	1.4
2	-	0.371	-	1.6
	0.500	0.864	98.6	1.8

2.7 共存离子干扰

取磷标液2 μg，按实验方法操作，当相对误差≤±5%时，可允许以下离子（以mg计）存在：Na^{+}、K^{+}(1.5)；Ca^{2+}、Al^{3+}、Fe^{2+}、Bi^{3+}、Mg^{2+}(1.0)；Fe^{3+}、Cu^{2+}、Zn^{2+}、Ni^{2+}、Cr^{3+}(0.2)；SiO^{2-}(0.1)；NO^{-}、CO^{2-}(200)。As(V)的干扰较重，可加入适量12% $Na_2S_2O_3$溶液消除。

关键词：微波消解；光度法；肺组织；磷
中图法分类号：R446.9 文献标识码：B

参考文献：

[1] 康格非．临床生物化学[M]．北京：人民卫生出版社，1989.86-95.
[2] 陈月莉，徐文强．密闭微波溶样方法的进展[J]．分析仪器，1997，4：12-14.
[3] 李攻科，何小青，熊国华，等．用微波消解气相色谱法测定鱼肉中的有机氯农药[J]．分析测试学报，1999，18(4)：5-8.

（编辑 谢义霞）

文章编号：1000-5404(2000)04-0395-03

技术方法

组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)新型突变体克隆载体的构建

Construction of clone vector of tissue type plasminogen activator(t-PA) mutants

周 红[1]，王国力[2]，黄培堂[2]，黄翠芬[2]（[1]第三军医大学附属西南医院烧伤研究所，重庆 400038；[2]北京军事医学科学院八所三室，北京 100071）

提 要：目的 构建含有K10Q、R30I、S165W及K10Q/R30I/S165W 4种t-PA突变体。方法 采用PCR重叠延伸法进行突变体的构建。结果 成功地构建了上述4种t-PA突变体克隆质粒，测序结果表明构建完全正确。结论 PCR重叠延伸法为构建突变体的可靠快捷的方法。

基金项目：总后"九五"重点课题
作者简介：周 红(1964-)，女，江苏省南京市人，博士，副研究员，主要从事烧伤感染方面的研究，发表论文11篇。电话：(023)68753780
收稿日期：1999-07-18；修回日期：2000-03-09

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

组织型纤溶酶原激活剂（Tissue type plasminogen activator, t-PA）是治疗栓塞性疾病的有效药物，但由于野生型 t-PA 在血液中的半衰期太短（＜5 min），需反复多次给药，这不仅导致治疗费用昂贵，而且有导致颅内出血的危险，故我所通过计算机分子设计手段，在氨基酸水平采用点突变的方法进行蛋白质的结构－功能关系的研究，以期获得半衰期延长或对血栓亲和力提高的 t-PA 突变体。本文仅对构建 t-PA 3 种突变体载体的工作报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料

含 t-PA 质粒 pMM5065 为北京军事医学科学院八所保存；pUC19 购自华美公司；*E.Coli* JM109 用作转化宿主菌（其基因型及表型见文献[1]）；所用限制性核酸内切酶、T4DNA 连接酶、T4DNA 聚合酶购自 Promega 公司或 Gibco 公司；其它生化及化学试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 实验仪器

PCR 扩增仪为 PE 公司 2400 型 PCR 扩增仪。

1.3 实验方法

质粒提取、纯化，限制性核酸内切酶反应，DNA 片段分离回收，细菌感受态制备，T4DNA 连接酶反应及连接物转化均采用参考文献[1]的有关方法。

突变引物及检测引物均由北京军事医学科学院八所四室或上海生工合成，见表 1，经 PAGE 电泳分离纯化。

DNA 序列分析由北京军事医学科学院八所四室 DNA 自动测序仪进行。

PCR 法点突变、信号肽 ATG 前 ATG 的去除均采用 PCR 延伸重叠法[2]。

PCR 法筛选突变克隆的方法见文献[2]。

与突变引物 P1 配对的扩增引物为 B0013＃（5′ AACAGCTATGACCATG 3′，上海生工），与 P2 配对的扩增引物为 B0011＃（5′ GTTTTCCCAGTCACGAC 3′，上海生工）。

表 1 突变引物及检测引物

突变点	突变引物		检测突变引物
K10Q	靶序列：	5′ GCCAGATCTTACCAAGTGATCTGCAGAGATG	
AAA		AAAAAACGCAGATGATATAC 3′	5′TGATCTGCAGAGATGAC 3′
↓	P1：	5′ ATCATCTGCGTTTTGTCATCTGCAG 3′	
CAA/CAG	P2：	5′ GCCAGATCTTACCAAGTGATCTGCAGAGATGACAGAACGCAGATGATATAC 3′	
R30I	靶序列：	5′ GCTCAGAAGCAACCGGGTGGAATATTGCTGGTG 3′	
CGG	P1：	5′ CACCAGCAATATTCCACGATGTTGCTTCTGAGC 3′	5′ GCTCAGAAGCAACATC 3′
↓	P2：	5′ GCTCAGAAGCAACATCGTGGAATATTGCTGGTG 3′	
ATC			
S165W	靶序列：	5′ CGTCTTTAAGGCGGGGAAGTACAGCTCAGAGTT	
TCA		CTGCAG 3′	5′ GGGAAGTACAGCTGG 3′
↓	P1：	5′GCAGAACTCCCAGCTGTACTTCCCCGCCTT 3′	
TGG	P2：	5′ CGTCTTTAAGGCGGGGAAGTACAGCTGGGAGTTCTGC 3′	

2 结果

2.1 突变载体的构建

将 pMM5065 用 *Hind* Ⅲ和 *Sac* Ⅰ 双酶切后回收 1 357 bp 片段，并将该片段与 pUC19 相连。连接产物转化 JM109，采用含氨苄青霉素的 LB 平板筛选白斑，*Hind* Ⅲ和 *Sac* Ⅰ 双酶切鉴定结果表明构建正确。该质粒命名为 pPEZ02（3 998 bp）。

2.2 t－PA K10Q、R30I、S165W 突变体的构建

采用 PCR 重叠延伸法进行突变体的构建，突变载体为 pUC19，见图 1、2。经 PCR 鉴定阳性者进行测序，测序结果表明目的突变均发生。（该质粒分别命名为 pPEZK01、pPEZR-01、pPEZK01）。但在 pPER01 上有意外突变出现，采用分子剪接技术组装无意外突变的目的 DNA 片段（该质粒命名为 pPEZR01）。

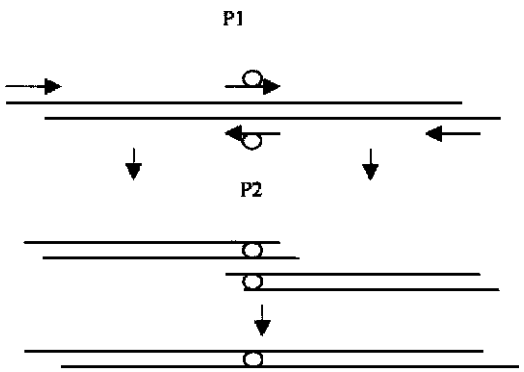


图 1 PCR 重叠延伸法原理示意图

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

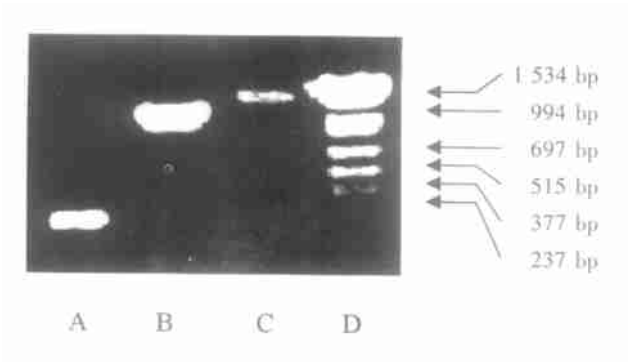


图 2　t-PA K10Q 突变体的构建

A：PCR 产物 170 bp；B：PCR 产物 1 268 bp；
C：PCR 产物 1 400 bp；D：PCR Marker

2.3　t-PA K10Q/R30I/S165W 突变体的构建

以 pPEZK01 为模板，采用 R30I 突变引物 P1 与 B10013 进行扩增，获取含有 K10Q 和 R30I 的 DNA 序列，回收纯化 270 bp 的 PCR 产物；以 pPEZS01 为模板，采用 R30I 突变引物 P2 与 B10011 进行 PCR 扩增，回收纯化 1 180 bp 的 PCR 产物。将 PCR 产物进行再延伸扩增得 1 400 bp。该片段纯化后采用 *Hind* Ⅲ和 *Sac* Ⅰ双酶切，将纯化的酶切大片段与 pUC19/*Hind* Ⅲ+Sac Ⅰ　酶切后载体相连，连接产物转化 JM109，挑选白斑克隆进行 PCR 鉴定，PCR 扩增阳性克隆的质粒命名为 pPEZT01。

2.4　信号肽 ATG 前 ATG 的去除

2.4.1　含 K10Q/R30I/S165W 3 突变点并去除多余 ATG 的质粒(pPEZT02)的构建由于将 t-PA 的 cDNA 装入真核表达载体需要利用 pUC19 的 *Hind* Ⅲ位点，而在 *Hind* Ⅲ位点与信号肽 ATG 之间还有一 *sph* Ⅰ位点，该位点含有 ATG，该 ATG 的存在使得 t-PA 的 cDNA 在装入真核表达载体后有 2 个 ATG，影响 t-PA 的表达，故采用 PCR 的方法去除第一个 ATG。

以 pPEZT01 为模板，采用去除 ATG 引物 (5′ GATTACCCAAGCTTTATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTC 3′)，与 B10011 进行 PCR 扩增，将扩增产物与 pGEM-T 载体相连，进行测序鉴定，发生目的突变的质粒命名为 pPEZT02。

测序结果表明第一个 ATG 被去除，欲突变 3 点均发生；但同构建 pPEZR01 突变体一样，在引物的位置有一额外突变出现，该突变导致所编码的氨基酸突变为终止密码子。采用分子剪接技术构建含突变点的正确的序列，含有 3 个目的突变点且去除多余 ATG 的质粒命名为 pPEZT04。

2.4.2　含 t-PA R30I 突变并去除多余 ATG 的质粒 pPEZR02 的构建采用 *Hind* Ⅲ和 *Ssp* Ⅰ酶双切 pPEZR01 后，回收 222 bp 片段，并将其与 *Hind* Ⅲ+*Sac* Ⅰ酶切 pPEZT04 后大片段及 *Ssp* Ⅰ+*Sac* Ⅰ酶切 pPEZ02 后 1 135 bp 连接构成 pPEZ04Z。

2.4.3　pPEZK02 和 pPEZS02 的构建　利用 *Bg* Ⅱ和 *Sac* Ⅰ位点切下 pPEZT04 中含 3 突变点的 t-PA 部分，代之以 pPEZK01 或 pPEZS01 含单一突变点的 t-PA 部分。

3　讨论

虽然 t-PA 已被美日等国开发成高效特异性溶栓药物，在治疗心血管栓塞性疾病中得到了成功的应用[1]，但由于野生型 t-PA 在血液中的半衰期太短(<5 min)，生物活性易被抑制剂特别是 PAI-I 所抑制。因此在实际治疗过程中，t-PA 必须大剂量静脉滴注以维持其有效浓度，治疗费用相当昂贵，同时高剂量还易引发系统性纤溶，有导致出血的副作用。因此针对天然 t-PA 进行改构研究十分必要。

采用先进的分子设计技术，进行 t-PA 的蛋白质的结构与功能关系的研究，是当前分子生物学的活跃领域和新的发展趋势。我室利用计算机分子设计的方法提出以下 4 种改构方案：t-PAS165W 的改构目的是获得对纤维蛋白亲和力提高的突变体，t-PAK10Q、t-PAR30I 的改构方案获得半衰期延长的 t-PA 突变体，而 t-PAK10Q/R30I/S165W 则是获得一个具有综合作用的突变体。

传统的体外突变技术需要合成一种与目的基因单链互补的突变寡核苷酸，并由此拷贝完整的基因与载体，且这种突变仅限于 5′ 端。PCR 技术的发明及应用，使体外突变方法更简单、更省时，而且可在 DNA 片段的任何位置进行定点突变。

由于在各目的突变点附近无可利用的限制性酶切位点，故本研究中采用重叠延伸 PCR 法进行突变[1]。从我们的实验结果来看该方法的优点是原理较简单，3 次 PCR 扩增可完成突变，突变率高达 100%，因此突变的可靠性得到保证；每步实验结果均可检测，实验周期较短；可得到较大的 PCR 扩增片段。其缺点为步骤较多较繁琐，完成一个位点的突变需合成 4 个引物(2 个互补的突变引物，2 个扩增引物)，PCR 扩增有一定的错误掺入率。但如果引物合成正确，PCR 条件得到优化，则出现额外突变的机率可降低。在 S165W 的突变过程中，除引物合成不正确引起的突变外，在突变引物外也出现一突变，为同义突变，即氨基酸并未改变。而 R30I 出现额外突变的原因可能是引物中个别碱基的合成错误，因为突变部位在引物上，而且两次均出现同一碱基突变。

利用 PCR 引物 3′ 端必须完全与模板配对的原理进行点突变的检测，只要 PCR 反应条件控制合适，结

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

果可靠且方法简单。从实验结果看设计 PCR 检测引物时应注意:引物的 3' 端尽可能的不为碱基 T,引物的长度不应太短（应大于 16～17 mer）以保证退火温度较高,这样可大大减少假阳性结果的出现率。

关键词:t-PA;突变体;PCR 重叠延伸法
中图法分类号:R394.3　　文献标识码:B

参考文献:

[1] 萨姆布鲁克. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京:科学出版社, 1996. 50—55, 282—283, 915.

[2] 林万明. PCR 技术和应用指南[M]. 北京:人民卫生出版社, 1995. 25—59.

（编辑　陈聪连）

文章编号:1000-5404(2000)04-0398-02

技术方法

一种利用傅立叶描绘子匹配大脑切片的方法

Matching of brain sections based on fourier descriptors

吴宝明[1],廖维宏[2]　(第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所:[1]第五研究室;[2]第三研究室;重庆　400042)

提　要:目的　研究匹配脑部切片的方法,汇聚组合来自不同动物的生理数据。方法　首先,将大鼠中脑组织切片数字化,用 3 条封闭特征轮廓表示,一组大鼠中脑 38 张的连续切片被作为与其它任何切片匹配的标准模板。然后,将每一切片的轮廓作傅立叶展开,通过计算两切片对应轮廓的尤拉距离,结合 3 轮廓的权重,定义两切片间的"相似函数"。最后,根据实验组切片与标准模板切片之间相似函数的大小实现两者的匹配。结果　本算法成功地实现了实验脑切片与标准脑切片的区配。结论　本方法可望广泛应用于脑组织功能的研究。

大脑功能组织研究对于理解神经环路功能起着十分重要的作用[1]。常规的方法是将微电极插入动物大脑的特定结构记录特定刺激引起的神经电活动,由测微计记录下响应神经元在大脑中的位置,再将动物处死进行大脑切片,利用组织学方法识别出电极的轨迹。然而,大量动物实验后所有这些神经元位置的组合显示常常是一件十分枯燥乏味的工作,也缺乏精度。鉴于目前尚缺乏这方面的自动算法,本文提出一种基于傅立叶描绘子的匹配算法,实现脑切片的自动配准。

1　材料与方法

我们选择大鼠中脑听觉区作为实验模型验证方法的有效性。

1.1　脑切片数字化

用冰冻切片机沿冠状面将大鼠（300 g）中脑切成 60 μm 厚的切片,用甲酚紫罗兰染色显示细胞体。然后将他们固定在载玻片上用解剖显微镜观测(放大倍数为×17)。在每一切片上,可以正确地辨别出大脑的内外边界,每一个边界代表不同于周围的液体组织的一个神经组织表面。在中脑解剖水平接近导水管地方另有一群细胞体浓度堆积形成的灰质神经结构,它的轮廓被作为第 3 条(或中间)边界。上述 3 条边界一起构成了我们所研究脑切片的特征曲线。利用图像输入设备将切片图像输入计算机,上述 3 边界的坐标由点输入设备读取和三者标志一起存档。对于实验组我们同时记录存储微电极轨迹与记录到的神经元位置。而另一只大鼠沿着脑干长度为 2.3 mm 的片段被连续切成 38 片,作为匹配实验切片的模板(标准组)。图 1 给出标准组大鼠第 13 片中脑切片数字化后边界曲线（A）与连续 38 片边界曲线的 3D 显示（B）。十字标记代表标准脑切片的中心轴位置。从图 1 可以观察到各切片轮廓的变化,注意左侧有些切片仅有一个边界。

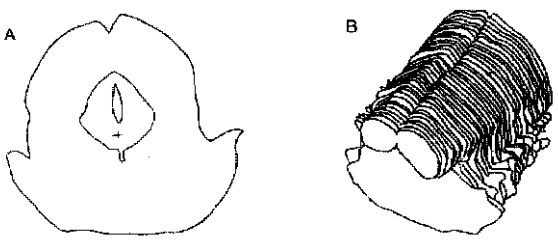


图 1　**A**:标准组大鼠中脑第 **13** 片切片数字化后边界曲线。**B**:连续 **38** 片中脑标准切片的 **3D** 显示轮廓变化

1.2　脑切片描述

考虑我们的情形,匹配问题属于封闭曲线的描述与识别。有人已研究出不同的方法[2,3]描述封闭曲线,这里我们采用 Zahn

作者简介:吴宝明(1962—),男,江苏省吴县人,博士,副研究员,主要从事生物信号与图像处理方面的研究,发表论文 20 余篇。电话:(023)68757455

收稿日期:1999-10-05;修回日期:2000-01-24

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