

- [8] Brown, K. A. et al.: *ibid.*, P219.
 [9] Preudhomme, J. H. et al.: *Blood*, 40: 777, 1972.
 [10] Jondal, M. et al.: *J. EPT Med.*, 138. 1365, 1973.
 [11] Lavelle, K. et al.: *Clin. Immunol. and Immunopath.*, 3: 492, 1975.
 [12] Shonton, B. K. et al.: *Tissue Antigens*, 5: 246, 1975.

- [13] Friemel, H. et al.: *Allergologia Immunopathol.*, 4: 218, 1976.
 [14] Pritchard, J. A. V. et al.: *Lancet*, 2: 627, 1972.
 [15] Friemel, H. et al.: *Modern Trends in cell Electrophoresis*, P142.

[本文于1983年12月5日收到]

仪器设备

介绍一种制备管状梯度凝胶的装置

周德义

(广西医学院生化教研室, 南宁)

梯度凝胶电泳分离生物大分子具有分辨力高、区带清晰的特点, 特别适于分离 γ -谷氨酰转肽酶一类膜结合蛋白。此外还可利用浓度梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳测定分子量。目前这种方法多是用垂直平板凝胶。本文介绍一套自制管状梯度凝胶的装置和制备凝胶的方法。用这种方法, 既节省试剂, 又可以装入任何立式盘电泳槽中, 使用也极方便。

一、梯度发生器和梯度凝胶制备装置

1. 管状梯度发生器与一般梯度发生器相同, 可用有机玻璃制作(见图1)

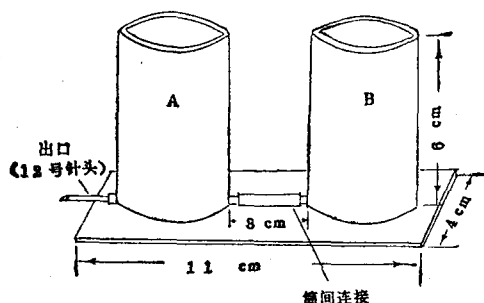


图1 管状梯度发生器

2. 梯度凝胶制备装置 由厚0.5cm的有机玻璃制成。取两块14×14cm的有机玻璃板(C板及D板), 用圆规按图2标明的尺寸准确分格(共24格)。将旧钢锯片两段捆在一起, 在砂轮

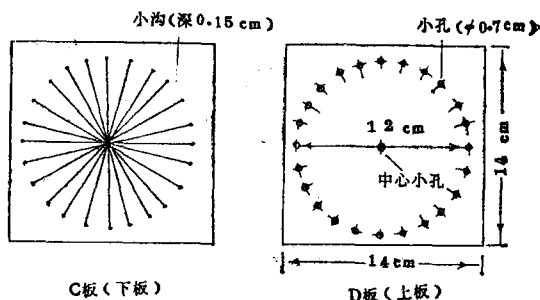


图2 制胶装置底板尺寸图

上磨出一把斜形沟刀, 用它在C板上相对两个分点之间过圆心拉出深为0.15cm的小沟。D板上用钻在24个分点和圆心上钻直径0.7cm的小孔。再将C、D两板重叠, 分点准确相对, 在四周滴加氯仿粘合。再取24个链霉素胶瓶塞, 塞

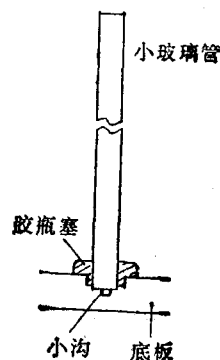


图3 小玻璃管与制胶装置连接示意图

中心穿 0.5 cm 小孔(根据玻管大小而定),将玻管插入胶瓶塞的中孔内,然后将带胶塞的玻璃管塞入制凝胶装置的小孔内,即完成装管工作(图 3)。

二、梯度凝胶的制备

按上述方法将玻管全部装入制胶装置中,取一条小塑料管,在其一端套上一个链霉素胶瓶塞,将瓶塞塞入制胶装置中心小孔。小塑料管另一端接上一支注射器,注入蒸馏水,驱赶出管道中的气泡,然后反抽蒸馏水,待水达玻璃管底部夹死塑料管再将塑料管接上梯度发生器。将已配好的 4% 和 30% 聚丙烯酰胺溶液分别加入发生器前后两圆筒中,开动电磁搅拌器混合

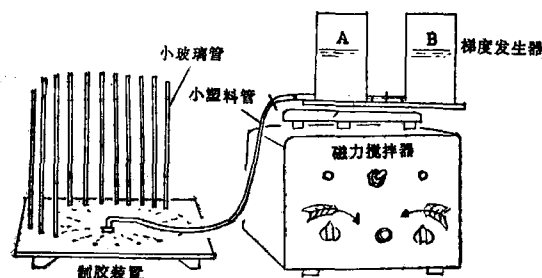


图 4 梯度凝胶制备装置(总图)

1. 为了清楚,图中只画出部分玻璃管。2. 为使剥胶容易,可在梯度凝胶中加入约 1% Triton X-100, (Triton X-100 是分离膜结合蛋白必须加的一种非离子去垢剂)。即使不加 Triton X-100,只要小心操作梯度凝胶也较其它高浓度凝胶容易剥出,可得到满意的结果。

前面圆筒中溶液,打开两圆筒之间和流出口前的夹子,由于发生器与制胶装置高度不同,混合好的凝胶可缓缓地流入各个小玻璃管中。如果用电子微动泵控制流速更为理想。当凝胶溶液一流完(约 10 分钟),立即用注射器注入含溴酚兰的 40% 蔗糖溶液(注意防止带入气泡),当紫色液达小玻管底部后夹死塑料管。待凝胶聚合后就可用来进行电泳。图 4 是梯度凝胶制备装置全貌。

三、实际应用举例

我们曾对人胎肝、肾、胰等组织和胆汁的 γ -谷氨酰转肽酶分子量进行测定,其方法是将制好的 4—30% 浓度梯度凝胶管装入立式电泳槽中,电泳槽加入 pH8.9 Tris-HCl 凝胶缓冲液, 10℃, 70 伏电压预电泳 20—30 分钟。除去凝胶缓冲液再换上 pH8.3 的 Tris-甘氨酸电极缓冲液,分别在小管顶部加 γ -谷氨酰转肽酶样品和高分子量标准蛋白质(pharmacia 出品),样品中含 20% 蔗糖,以 5 μ l 溴酚兰指示。先 70 伏电泳 15 分钟,再升高电压至 220 伏, 10℃ 恒压电泳 3—4 小时。电泳后用一般方法剥胶,酶样品凝胶进行酶定位染色,标准蛋白凝胶进行蛋白染色。将标准蛋白质的分子量对数值对其相应的 Rf 值作图得一曲线,再由曲线求酶的分子量。由曲线求得人胎肝和胆汁小分子 γ -谷氨酰转肽酶分子量是 86,000 (见本期第 55 页图 2)。

[上接第 35 页]

向扩散系数大约为 $D_{\parallel} \approx 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{sec}$ 。这是自旋标记技术一个非常重要的贡献。后来用光致漂白和荧光技术测得的结果与此基本一致。

5. 两个单层膜之间的翻转运动

测量这一运动的方法也很著名。使用一个双层脂质体泡,在内外两层的自旋标记浓度开始是一样的,然后用抗坏血酸将外层的自旋标记还原,这时自旋标记都集中在内层。根据 ESR

波谱确定有多少自旋标记。等一段时间,再看两边自旋标记的数量,直至自旋标记在膜双层两边平均分布。由此就可以知道磷脂在膜双层之间的翻转运动速率,测得的半衰期为

$$t_{1/2} = 11 \text{ 小时}$$

这个运动比侧向扩散慢得多。这种现象在生物学上是很有意义的。

[赵保路整理]