

图7 不同ADP量对ATP-荧光酶系统发光的影响

(1) ATP:ADP = 1:50; (2) ATP:ADP = 1:25;
(3) ATP:ADP = 1:10; (4) ATP系统(测定液
同前, ATP量为 1×10^{-10} moles)。

表1 不同ATP/ADP时不同时间的发光高度比较

ADP/ATP	相对对照5秒时闪光高度%	
	5秒	20秒
对 照	100	54.5
10	109	63.6
25	100	86.3
50	104	12.7

四 不同提取方法对菠菜叶子中ATP测定结果的影响:

在温室培养的菠菜, 分别进行三小时光或暗处理后, 摘取叶子测定ATP, 结果见表2。可以看出, 用过

表2 用不同提取方法对ATP测定的影响

提取方法	照 光	遮 光
过氯酸法	28.3	13
水加热法	26.5	16

表中数值为相对发光值

氯酸法提取的样品, 光暗差异比水加热法大。而水加热法提取样品中的ATP, 对于照光的叶子来说, 要比过氯酸法提取样品中的ATP少, 而在遮光叶子中却相反, 这是因为叶子中肌酸激酶的耐热性高, 在照光叶子中ATP占优势时, 趋向使ATP分解, 而在遮光叶子中, ADP相对增加时, 肌酸激酶又使ADP转化为ATP, 而过氯酸提取时, 叶子中肌酸激酶立即失活, 不影响ATP的变化, 由此可以认为用过氯酸法提取叶子样品较水加热法为优越。

参 考 文 献

- [1] McElroy, W. D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **33**, 342, 1947.
- [2] Strechler, B. L. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **40**, 28, 1952.
- [3] Del Valle-Tason, S. et al.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **504**, 26, 1978.
- [4] Strechler, B. L.: *Methods of Enzymatic Analysis*. (Ed Bergmeyer, H. U.) p. 559, 1963.
- [5] Lencesters, J. J.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **55**, 1262, 1973.
- [6] Picciolo, G. L.: *Yale Sci.*, **48**, 2, 1973.
- [7] Seitz, W. R. et al.: *Anal. Chem.*, **46**, 188A, 1974.

[本文于1979年9月20日收到]

一种简易分离高纯度血清白蛋白的方法

陈建文 静国忠

(中国科学院生物物理研究所)

血清白蛋白是动物肝脏细胞分泌的一种蛋白质, 在血液循环、解毒、脂类代谢等方面执行着多种重要的生物功能。在生物化学与免疫学研究中广泛用作生物大分子(酶、抗原)的稳定剂、模型抗原以及半抗原的载体。近年来, 人们又把肝白蛋白作为研究 mRNA 的调控和蛋白质的生物合成的重要材料, 并取得了重要进展。

最早, 普遍应用硫酸铵重结晶法从血清中分离白蛋白, 但此法的选择性极差。也有人用一定的 pH 和

有机溶剂从血清中沉淀各种不同的蛋白质, 此法的专一性也较差, 而且在整个实验过程中要严格控制温度和 pH, 否则蛋白质极易变性。A. Polson^[1]等人报道聚乙二醇(PEG6000)在室温下能高度选择性地沉淀蛋白质, 采用此法从血清中沉淀白蛋白不引起变性^[2,3]但是它的选择性受 pH 和 PEG 浓度的影响, 故实际上很难使纯化的白蛋白不污染少量的球蛋白。有人采用辛酸钠保护白蛋白, 得到较好的效果^[4]。我们综合以上方法, 用辛酸钠-聚乙二醇法, 简单有效地从豚鼠血

猪血清中分离出高纯度的白蛋白。

实验步骤

一、白蛋白的分离纯化

豚鼠血从心脏抽取,新鲜猪血取自屠宰场。室温下放置过夜,次日吸取血清,4000×g 10 分钟离心,除去少量血球。100 毫升的血清加等体积的 0.02M 辛酸钠(实验试剂,北京化工厂)生理盐溶液,滴加乙醇达 5% 浓度,用 0.5N 盐酸调 pH 至 6.0—6.5,70℃ 加热 30 分钟后用自来水(或放冰浴中)降至室温。用 0.5N 盐酸调 pH 至 4.2 左右,室温放置三小时以后,20,000×g 离心 15 分钟,得上清液 15% 毫升。搅拌加入研磨成粉末的 PEG6000(上海合成洗涤剂二厂)达 22% 浓度。加完以后继续搅拌 30 分钟,放冰箱过夜。次日,10000×g 离心 15 分钟,取白色沉淀,用 20 毫升重蒸水溶解,再用 0.2N NaOH 调 pH 到 6.7;少量的不溶物放置几小时以后离心除去。

极少量的球蛋白和 PEG 可以用 Sephadex G-75 柱除去,收集白蛋白部分,冰冻干燥后放冰箱中保存。

二、蛋白的纯度以及分子量的测定

1. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 在 0.1M pH7.2 的磷酸缓冲液中配制 7.5% 的凝胶溶液:

1M 磷酸缓冲液	2 毫升
30% 丙烯酰胺	5 毫升
10% SDS	0.2 毫升
6.4% TEMED	0.2 毫升
10% 过硫酸铵	0.1 毫升
水	12.5 毫升

凝胶管内径 0.6 厘米,长 10 厘米。电泳电压:每根胶 6 伏。电泳时间:6 小时。蛋白染色液:0.25% 考马士兰的甲醇-冰醋酸溶液(227:23),脱色液:甲醇-冰醋酸-水溶液(10:3:27)。

2. 抗血清的制备 白公兔(重 2—2.5 公斤)第一次用含 1.2 毫克白蛋白的完全 Freund's 佐剂从皮内注射后,每相隔二周用含 0.6 毫克白蛋白的不完全 Freund's 佐剂进行加强免疫;第二次加强免疫以后二星期取兔血清进行免疫扩散和电泳试验。

Ouchterlong 免疫双扩散试验 1% 的 Agar PBS 溶液(每升含 NaCl 8.0 克, KCl 0.2 克, CaCl₂ 0.1 克, MgCl₂·6H₂O 0.1 克, Na₂HPO₄·2H₂O 1.15 克, KH₂PO₄ 0.2 克),在载玻片上铺成约 1 毫米厚的胶,20 分钟以后打孔,加样后在密封箱中室温过夜,次日见沉淀线。Agar 玻片放在生理盐水中浸泡二天去除杂蛋白分子,然后用上述考马士兰染色。

免疫电泳 1% 的 Agar 巴比妥缓冲液(0.025M pH8.6),在载玻片上铺成 1 毫米厚的胶,凝固后打成孔穴,小孔中加抗血清。电泳液:0.05M 巴比妥缓冲液, pH8.6, 电压 60 伏,时间:90 分钟。中间槽中加

白蛋白溶液,在密封箱中室温过夜,次日见沉淀线,染色方法同上。

实验结果和讨论

用辛酸钠-PEG 法从血清中提纯的白蛋白经过 Sephadex G-75 的进一步纯化并去 PEG,再冰冻干燥可得到白色的蛋白粉末。用 SDS-7.5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定仅有一条染色带(图 1)。

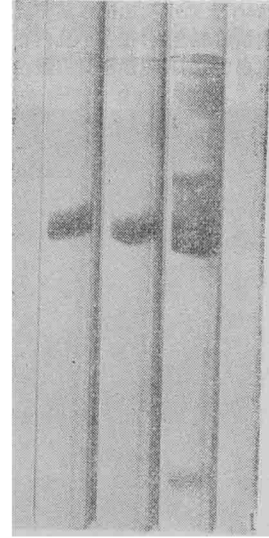


图 1 SDS-7.5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳

左: 80 微克豚鼠白蛋白
中: 80 微克猪白蛋白
右: 3 微升豚鼠血清

从免疫双扩散试验(图 2),可以看到豚鼠白蛋白与抗豚鼠白蛋白血清形成单一的沉淀线。把抗豚鼠和抗猪血清混合做免疫扩散(图 4),可以清楚地看到它们反应的专一性,即豚鼠白蛋白只能与抗豚鼠白蛋白血清形成沉淀线,猪白蛋白亦然。免疫扩散图呈×形。用 FITC 标记的球蛋白对这两种亲缘关系较远的动物作免疫沉淀试验,同样看到这种反应专一性。(数据另发表)

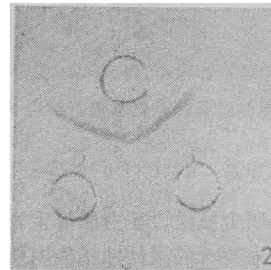


图 2 免疫双扩散

1% Agar: 上面小孔加稀释二倍的抗豚鼠白蛋白血清;下面两个孔加豚鼠白蛋白

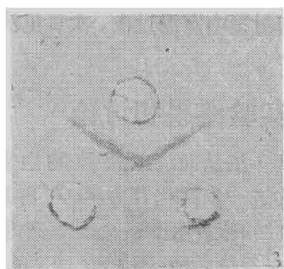


图3 免疫双扩散
1% Agar; 上面小孔加抗豚鼠和抗猪白蛋白血清的混合物; 在左小孔内加猪白蛋白; 右小孔内加豚鼠白蛋白

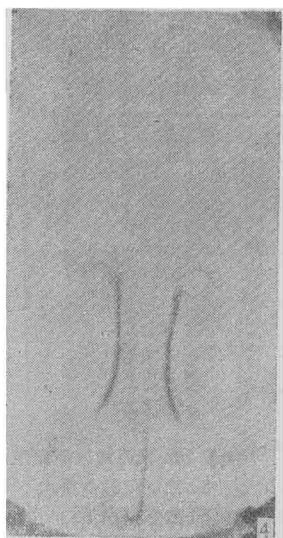


图4 免疫电泳
1% Agar; 小孔中加稀释二倍的抗豚鼠白蛋白血清; 中间槽加豚鼠白蛋白

免疫电泳被认为是鉴别抗原纯度的一种理想方法。我们的免疫电泳图上只出现单沉淀带, 可以认为用辛酸钠-PEG 法纯化的白蛋白纯度较高。

从 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳中测得的豚鼠和猪血清白蛋白的分子量和牛血清白蛋白的分子量相当, 为 65,000 左右。

用辛酸钠-聚乙二醇法从 100 毫升血清中可得到 1.5 克白蛋白的纯品。

整个纯化过程的关键是去球蛋白。加入辛酸钠到 0.01M 后, 加热时溶液的 pH 要严格控制在 6.0—6.5 之间; 如果 pH 高于 7.0, 球蛋白沉淀就不完全, 或者形成透明乳状溶液, 即使放置过夜也不会有蛋白沉淀出现。遇此情况, 可以用 0.5N 盐酸把 pH 再调回到 6.0—6.5 之间, 重新加热, 仍可以达到去除球蛋白的目的。pH 过低, 也降低白蛋白的回收量。

有人报道用 9% 的乙醇^[4]在加热时有助于球蛋白的沉淀。在我们的实验条件下用 5% 乙醇, 即可以较完全地沉淀球蛋白。

为了分开白蛋白和球蛋白, 采用聚乙二醇选择性沉淀法, 需严格控制 pH 和 PEG 浓度。在本实验中, 由于球蛋白已在辛酸钠-加热一步除去, 所以只要加足 PEG 的量, 使白蛋白完全沉淀下来即可。我们选择 22% 的 PEG 是足量的。在 PEG 沉淀白蛋白的时候把 pH 保持在 4—5 之间是可取的。

辛酸钠-聚乙二醇法的操作简单, 效果较好, 尤其适用于实验室少量制备。

参 考 文 献

- [1] Polson, A. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **82**, 463, 1964.
- [2] Chesebore, B. et al.: *Clin. Chim. Acta*, **20**, 527, 1968.
- [3] Gambal, D.: *Biochim. Biophys. Acta*, **251**, 54, 1971.
- [4] Waldemar Schneider, et al., *Blut, Band*, **30**, Seite 121, 1975.

[本文于 1979 年 11 月 26 日收到]

一种无桥的水平板型凝胶电泳

曲善乐 劳为德 陈受宜

(中国科学院生物物理研究所)

凝胶电泳是研究核酸、蛋白质等生物大分子的一项重要技术, 也是 DNA 的限制性核酸内切酶切割片段的分析、分离、纯化的一种不可缺少的方法。虽然垂直(管柱型及板型)凝胶电泳早已被广泛应用, 但它不能用低浓度琼脂糖凝胶分离大分子 DNA。水平板型凝胶

则可弥补这个缺点。

早期的水平板型凝胶电泳, 凝胶两端是通过纸桥与两边槽中的电泳缓冲液相连接^[1, 2]。近年有人以胶桥代替纸桥, 即在电泳胶的两端各接一段垂直凝胶(胶桥)与电泳缓冲液相接^[3]。胶桥水平板型凝胶电泳采