

经验交流

酶联免疫检测仪-考马斯亮蓝法测定蛋白质含量

蒋作君 冯笑川 沈一平

(南京医学院)

蛋白质定量方法虽然较多,但有些方法操作费时,如凯氏定氮法^[1]和 Lowry 氏法^[2];有些方法需要的样品量较大,如用 751 型分光光度计进行紫外线吸收法测定;有些方法灵敏度不高,如双缩脲法^[3]。为弥补上述不足,我们试用酶联免疫检测仪-考马斯亮蓝法测定蛋白质含量,现将实验报告如下。

材料与 方法

1. 酶标反应板 系四川分析仪器厂产品。
2. 酶联免疫检测仪 DG-I 型,系南京国营华东电子管厂产品。
3. 考马斯亮蓝 G-250 (简称 G-250) 液 G-250 100mg 溶于 50 ml 95% 乙醇,加 100ml 85% (W/V) 磷酸,稀释至 1,000ml。在此溶液中, G-250 终浓度为 0.01%(W/V),乙醇为 4.7%,磷酸为 8.5%。
4. 冻干犬血清 本实验室自制。
5. 酶联免疫检测仪-考马斯亮蓝法 用光电天平称取 100mg 冻干犬血清粉末,用生理盐水配成浓度为 100mg/ml 犬血清母液。在酶标反应板上,第一孔加犬血清母液。然后犬血清母液经系列倍比稀释,按序

加入以后各孔。每孔均为 50 μ l。各孔再加 50 μ l G-250 液。对照孔加 50 μ l 生理盐水和 50 μ l G-250 液,并以对照孔作为调零孔。两分钟后,用酶联免疫检测仪读取各孔光密度 (OD) 值。本实验重复 20 次,以平均 OD ($\overline{OD}$) 值为横坐标,蛋白质含量为纵坐标作图。

结果与 讨论

本实验结果如图1和附表所示。由图1可见,犬血清蛋白质含量在 1.0—100mg/ml 之间与 $\overline{OD}$ 值成线

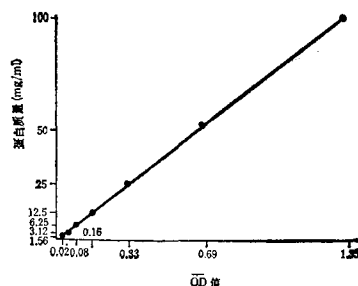


图1 犬血清蛋白质含量与 $\overline{OD}$ 值的线性关系

附表 不同稀释度犬血清蛋白质含量和 $\overline{OD}$ 值

稀释度	母液	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
蛋白质量(mg/ml)	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.563	0.781	0.391
OD 值 ($\bar{x} \pm SD$)	1.35 $\pm$ 0.03	0.69 $\pm$ 0.03	0.33 $\pm$ 0.01	0.16 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0	0.01 $\pm$ 0

性关系^[4],表明该法可测定少至 1.0 mg/ml 的蛋白质含量,这可满足许多生物样品蛋白质含量测定的需要。棕褐色 G-250 液遇蛋白质液后变为蓝褐色,其光谱在 595nm 处有最大吸收峰,在 492nm (一般酶联免疫检测仪只能在 492nm 处测定)处可大部被吸收。若用全波长酶联免疫检测仪选择最适波长测定,则可获最大吸收峰,从而使该法的灵敏度提高到微克水平。G-250 与蛋白质反应快,约两分钟内完成^[3],其复合物在溶液中的分散状态,据我们观察至少能维持 72 小

时,故测定时间不象双缩脲法那样严格,而测定结果可在 5 分钟内得到。酶联免疫检测仪操作简便,且一次可测多个样品。若配上微机系统,则蛋白质浓度可直接打印出来。该法充分发挥了仪器的效能。另外,该法所需的样品量少,每孔只需 50 μ l。在本实验中,被测样品犬血清内蛋白质种类较多,因而所测结果具有一定代表性。

本文承蒙本院赵慰先教授审阅,谨致谢忱。

一种蛋白质等电聚焦银染色方法

朱昌亮 叶炳辉

(南京医学院)

朱晓龙 赵学忠 张 云

(南京军区后勤部军事医学研究所)

等电聚焦是蛋白质分析的一种常用方法。在实际工作中,常因一些生物材料蛋白含量太低,常规的考马斯亮蓝染色不能显示区带,给研究工作带来困难。人们曾考虑聚焦后用超敏感的硝酸银染色法克服之,但因聚焦后凝胶上含有 Ampholine 而往往不能得到满意的结果。我们经过一段时间的摸索,染色获得成功。现简介如下。

一、固定与浸泡

等电聚焦后,将聚丙烯酰胺平板凝胶取下,置入 20% 三氯醋酸中固定、浸泡过夜(8 小时以上)。然后,取出用双蒸水浸洗三次,每次间隔 3 分钟。

二、染色

将凝胶放入染色液内,37℃ 下染色 5 分钟。

染色液配制 称取硝酸银 1 克,以 5 毫升双蒸水溶之,备用。取 0.36% 氢氧化钠 25 毫升,浓氨水 5 毫升混和。将硝酸银液滴入混和液,滴加时不断摇荡器皿。滴完后加水 85 毫升即可。

三、显影

凝胶染色后用双蒸水浸洗三次,每次间隔 3 分钟,注意不断摇荡。浸洗后放入显影液显影至凝胶区带清晰可辨为止(约 5 分钟)。

显影液配制 取 1% 柠檬酸 0.5 毫升,加 40% 甲醛 0.05 毫升,再加水 100 毫升。

四、停影

将凝胶移入 50% 甲醇内停影 10 分钟。

五、干燥与保存

凝胶停影后取出,用双蒸水清洗两次后转入保存液内浸泡 3—4 分钟,最后取出用两张薄玻璃纸蒙在玻璃板上凉干、保存。

保存液配制 取甲醇 700 毫升,加甘油 87 毫升,加水至 1000 毫升。

以上介绍的是厚度为 0.5 毫米,浓度为 7.5% 的平板凝胶,若柱状胶应每步骤适当延长时间。

采用本法与考马斯亮蓝染色法^[1]比较。结果:用本法,10ng 样品液可见明显染色带 11 条;用考马斯亮蓝染色法,100ng 不显带,1000ng 可见染色带 9 条。本法的灵敏度可达考马斯亮蓝染色法的 100 倍以上。

目前报道的银染色法,凝胶在银染过程中均需戊二醛处理^[2-3]。该试剂较昂贵。本法不用戊二醛,同样获得了满意的结果。

有人报道,银染色后,凝胶洗涤时间不宜超过 5 分钟,否则会降低灵敏度^[4]。本染色法,洗涤时间的长短似不影响结果。

本法灵敏度高,相对简便、便宜,不需特殊的试剂,且所显区带清晰,具有一定的实际应用价值。

参 考 文 献

- [1] 叶炳辉等:《寄生虫学与寄生虫病杂志》,1985,3(3),161。
- [2] Oakley, B. R. et al.: *Anal. Biochem.*, 1980, 105, 361。
- [3] Porro, M. et al.: *Anal. Biochem.*, 1982, 127, 316。
- [4] 蔡晓丹等:《生物化学与生物物理进展》,1986,(3),66。
- [5] Tait, A. et al: *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1981, 2, 311。

[本文于 1987 年 7 月 17 日收到]

参 考 文 献

- [1] 王世中主编:《免疫化学技术》,科学出版社,北京,1980,178—184。
- [2] Lowry, OH, et al.: *J. Biol. Chem.* 1951, 193, 265。

- [3] 徐宜为编:《实用免疫学技术》,科学出版社,北京,1979,199。
- [4] 李景海:《临床检验杂志》1987,5(1),17。

[本文于 1987 年 7 月 4 日收到]