

醋酸纤维素膜上的蛋白质等电聚焦电泳

张普民 李茂深

(上海医科大学生物化学教研室)

等电聚焦电泳一般以聚丙烯酰胺作为支撑物。但凝胶配制麻烦,两性载体用量多,价格昂贵。利用醋酸纤维素膜进行等电聚焦电泳,则可能克服上述缺点^[1,2]。但是醋酸纤维素膜的强电渗作用,影响了等电聚焦。过去解决这一问题的方法^[2,3]条件复杂,要求高,有些试剂国内无法得到。我们试用了甲基化方法来封闭醋酸纤维素膜上的解离基团,有效地消除了电渗作用,不需转移而直接进行了大鼠血浆凝血酶原的酶联免疫染色。

一、材料与方法

1.材料 醋酸纤维素膜,浙江黄岩化工厂产品,8×12 cm,用时裁成所需大小。Ampholine, pH3.5—10 和 pH5—8, LKB 公司产品。大鼠凝血酶原及兔抗凝血酶原抗血清系本室自制。驴抗兔 IgG 抗血清购自本校红旗药厂,从中提取 IgG^[4],并标记辣根过氧化物酶^[6]。辣根过氧化物酶购自上海东风试剂厂, RZ = 2.5—3。其他为国产化学试剂。

2.醋酸纤维素膜的甲基化处理 醋酸纤维素膜(1×10 cm 20 张),依次在 30% 和 70% 甲醇中各浸泡 10 分钟,100% 甲醇中浸泡 2×10 分钟,进行预处理。将 43.7% 三氟化硼乙醚液 3 ml 用甲醇稀释至 22.2 ml,成为 6.4% BF₃ 甲醇液。将预处理过的膜置其中,于 37℃ 反应 1 小时后,用甲醇洗至中性保存备用。

3.等电聚焦电泳 将处理过的醋酸纤维素膜置于 4% pH3.5—10 Ampholine, 7.5% 甘油, 5 mol/L 尿素(pH3.5—10 电泳)或 4% pH5—8 Ampholine, 1% pH 3.5—10 Ampholine, 7.5% 甘油, 5 mol/L 尿素(pH5—8 电泳)中,冰箱过夜或室温 2 小时以上,取出后紧贴于电泳槽冷凝板上,避免膜下留有气泡。

用厚滤纸电极条分别浸透 0.20 mol/L 柠檬酸(正极)和 0.25 mol/L 乙醇胺(负极),再用两层厚的滤纸吸三次以去除过多的电极液,置于醋酸纤维素膜两端,完成等电聚焦的准备。

将样品血浆或其他样品液点于离正极 3 cm 处。在两端电极条上压好铂电极,通电开始电泳。pH 3.5—10 电泳时 1,200 V, 90 分钟; pH 5—8 时为 500 V, 90 分钟。整个电泳过程保持在 8℃,电泳结束后,进行蛋

白质检测。

4. pH 梯度的测定 每隔 0.5 cm 测定膜的 pH 值,绘制醋酸纤维素膜上的 pH 梯度曲线。

5.蛋白质的检测

(1) 非特异性染色:考马斯亮蓝 R-250 染色^[7]。

(2) 辣根过氧化物酶染色:用沉淀显色底物二氨基联苯胺染色法^[8]。

(3) 凝血酶原的酶联免疫染色:将等电聚焦电泳分离大鼠血浆的醋酸纤维素膜在 96% 乙醇/1% 乙酸中固定半小时,取出后于室温晾干,用 0.01 mol/L pH 7.4 PBS 洗两次。其后的染色过程类似于 Western-blot^[9],但在各包被液中不需加入牛血清白蛋白。

二、结 果

1.大鼠血浆蛋白的分离:经 pH 3.5—10 和 pH 5—8 等电聚焦后,考马斯亮蓝染色,得到大鼠血浆蛋白等电聚焦图谱(图 1)。pH 5—8 分辨率较高。

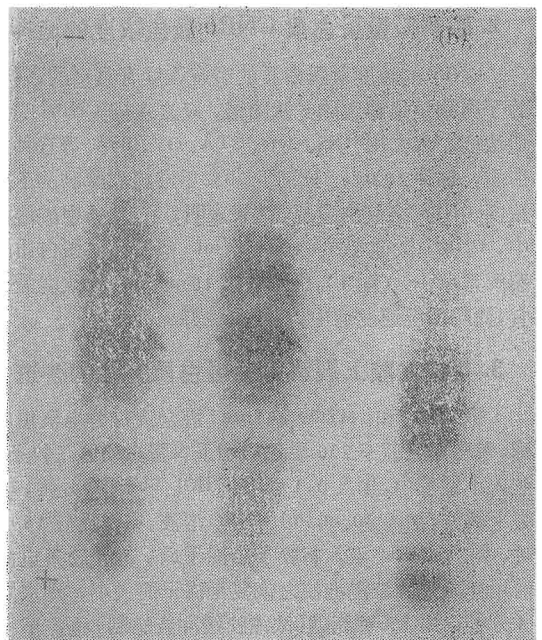


图 1 大鼠血浆(1μl)在醋酸纤维素膜上的等电聚焦电泳
a, pH 3.5—10; b, pH 5—8

分析两种 pH 范围电泳时的 pH 梯度曲线,证明在经甲基化处理的醋酸纤维素膜上,可以得到较好的线性 pH 梯度(图 2,3)。

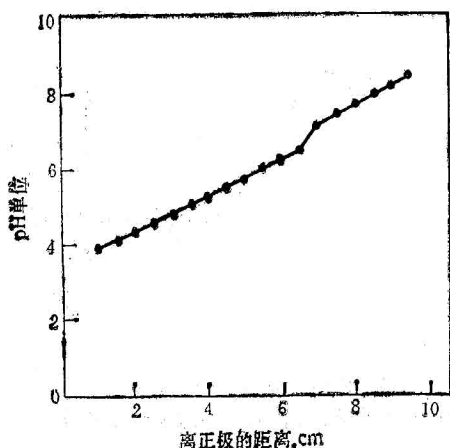


图 2 pH 3.5—10 等电聚焦电泳时的 pH 梯度曲线

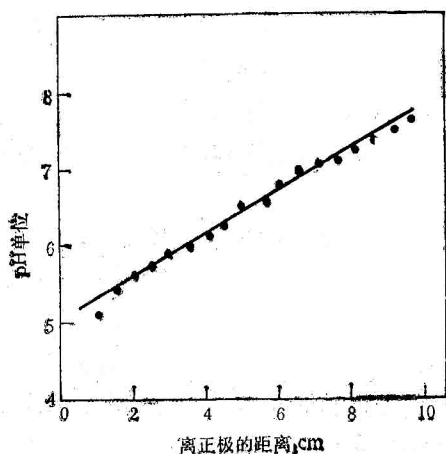


图 3 pH 5—8 等电聚焦电泳时的 pH 梯度曲线

2. 辣根过氧化物酶的等电聚焦分析 1 μ l 400 μ g/ml 辣根过氧化物酶 pH 3.5—10 等电聚焦电泳后,显色出十多条条带,等电点偏碱(图 4)。

3. 大鼠凝血酶原的酶联免疫染色 0.2 μ l 大鼠血浆 pH 3.5—10 等电聚焦电泳后,酶联免疫染色显示在离正极 3.5 cm 处有一条带, pH 为 5.0。

三、讨 论

醋酸纤维素膜上引起电渗的主要基团是硫酸基和羧基^[7]。早期解决电渗的方法效果不好^[1,2], 后来 Ambler^[3,4] 发展了甲基化方法, 有效地消除了电渗作用。我们试用了多种甲基化试剂, 用国产的三氯化硼乙醚经甲醇稀释来进行甲基化反应, 取得了良好的效果。

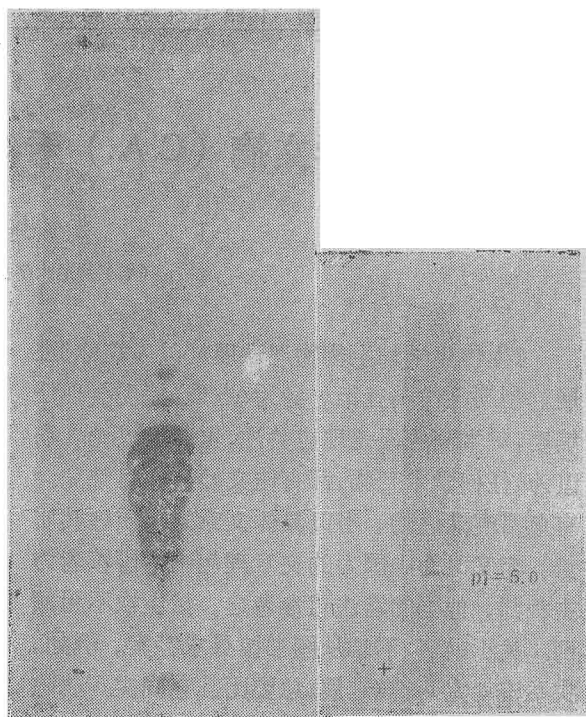


图 4 辣根过氧化物酶在醋酸纤维素膜上的等电聚焦电泳, pH 3.5—10

图 5 大鼠血浆等电聚焦电泳 (pH 3.5—10) 后, 酶联免疫检测凝血酶原

Ambler^[7] 采用的电极液是 pH 2—3 和 pH 9—11 Servalyte 两性载体。我们改用柠檬酸和乙醇胺得到了同样的效果。

经处理的醋酸纤维素膜极性很小, 对蛋白质的吸附能力很差。因此在进行抗体包被时, 不需加入大量牛血清白蛋白来封闭。为了不使抗原丢失, 采用 96% 乙醇/1% 乙酸来固定^[10], 获得了满意的效果。

参 考 文 献

- [1] Harada, S.: *Clin. Chim. Acta*, 1975, **63**, 275.
- [2] Boussios, T. et al.: *Electrophoresis* '78, Elsevier North Holland Inc., New York, 1978, 137.
- [3] Ambler, J., et al.: *Clin. Chem.* 1979, **25**, 1320.
- [4] Ambler, J.: *Clin. Chim. Acta*, 1978, **88**, 63.
- [5] Levy, H. B., et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1960, **103**, 250.
- [6] 郭春祥等: 《上海免疫学杂志》, 1983, **3**, 97.
- [7] Ambler, J.: *Electrophoretic Techniques*, Acad. Press, New York, 1983, 81.
- [8] 蒋成淦: 《酶联免疫测定法》, 人民卫生出版社, 1984, 123.
- [9] Towbin, H., et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1979, **76**, 4350.
- [10] Jacobsen, M., et al.: *Immunochemical Techniques*, Elsevier Science Publishers B. V., New York, 1983, 17.

[本文于 1988 年 2 月 12 日收到]