

一次淀粉凝胶电泳同时测定猪六种血清蛋白质多态性的简便方法

陶 钧

(长沙水电师范学院,长沙 410007)

关键词 淀粉,血清蛋白质,电泳,多态性

自从 Smithies^[1] 1955 年发明淀粉凝胶电泳分离技术以来,国外已广泛应用此技术研究血清蛋白、乳蛋白、卵清蛋白和同功酶的多态性。而且在方法上不断改进,一次淀粉凝胶电泳所能测定的蛋白质种数也不断增加,由最初的一两种蛋白质增加到现在的五种蛋白质^[2,3]。我国在这方面的研究起步较晚。一些学者发现国产马铃薯淀粉用作凝胶电泳支持物效果不好,而进口水解淀粉价格昂贵,大量使用受到限制。为了解决这个问题,作者参考有关文献资料,结合自己的实验体会加以改进,建立了用国产马铃薯淀粉,一次淀粉凝胶电泳同时测定猪转铁蛋白(Tf)、血液结合素(Hpx)、前白蛋白(Pa)、后白蛋白(Po)、铜蓝蛋白(Cp)、淀粉酶(Am)、多态性的简便方法。

一、材料与方 法

(一) 淀粉部分水解^[4-6]

采用浙江菱湖化工厂生产的马铃薯淀粉(生化试剂)。取淀粉水解液 402ml(丙酮与浓盐酸之比为 100:0.5),淀粉 200g,分别盛于 1000ml 锥形瓶中,置 38℃ 水浴中预热 1h 后混合,摇匀,再于 38℃ 水浴中水解 60min,其间每隔 5min,摇匀一次。按每 ml 浓盐酸加 3g 醋酸钠(溶于 50ml 去离子水)终止水解。然后倒入布氏漏斗抽滤,用去离子水冲洗四次,最后用少量丙酮脱水一次。抽干后,将淀粉铺开在滤纸上,放在约 45℃ 的恒温干燥箱中烘干过夜,研细过筛制成水解淀粉。

(二) 凝胶板制备^[7,8]

按淀粉浓度 15% 计算,称取上述水解马铃薯淀粉 39g,置于抽滤瓶中;取凝胶缓冲液(Tris 0.014 mol/L,柠檬酸 0.004 mol/L, pH7.5) 260ml 分成两份:60ml 缓冲液加热至 30℃,用来制作淀粉悬浮液,200ml 缓冲液加热至 100℃ 后,迅速倒入淀粉悬浮液中,剧烈旋摇 15s,抽气 1min,立即倒入内径为 18×14×0.8cm 的有机玻璃模框中(框底事先垫好厚 2mm,长宽相当的玻璃托板)。稍冷后,用蜡纸覆盖,2h 后点样电泳。

(三) 点样^[9]

用宽度为 8mm 刀片在距离凝胶阴极端 4cm 处,以相等间隔切开 8 条细缝,然后用平头镊夹取 8×8mm 的 Whatman 3 号滤纸片,浸透猪血清样品(4份血清加 1 份约 5% 的贮存鸡血红蛋白)^[3],慢慢插入凝胶细缝中。用滤纸吸去多余血清。

(四) 电泳

在电泳槽两端的电极槽内加电极缓冲液^[3](H₃BO₃ 0.3mol/L, NaOH 0.09mol/L, pH8.7);将点好样品的凝胶板放置电泳槽内。在两端 2cm 处各搭上与凝胶板等宽的四层滤纸作盐桥。在胶板模框两边涂上一层凡士林,用一张蜡纸覆盖凝胶暴露面,并与模框两缘粘牢,防止水分蒸发。接通电泳仪开始电泳。起始电压为 200V,半小时后将电压调至 360V,稳压电泳 2.5h 左右。待褐色带走到距点样线 10~10.5cm 处时,停止电泳。

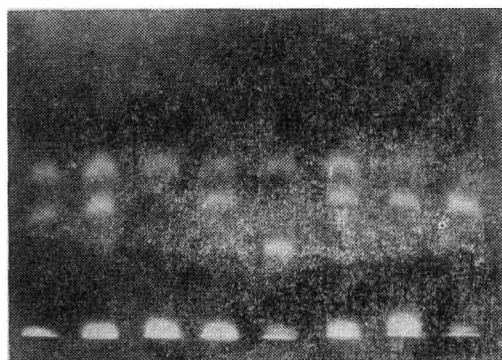
(五) 剖胶与染色^[3]

从电泳槽中取出胶板,用刀片沿模框四周内壁将凝胶剥离。通过框底圆孔顶出凝胶板,在框内垫入一块 1mm 厚的有机玻璃板,重新放回凝胶,在胶面上压一块 3mm 厚的玻璃板,用细钢丝沿水平方向将凝胶剖开。将顶部 1mm 厚的凝胶层弃去不要。然后用 2mm 厚的玻璃板作垫板,以同样方法,将凝胶剖成厚度均匀的三块。上层凝胶用 0.1% 的氨基黑 10B 染色液(按 0.1% 的比例将氨基黑 10B 溶于去离子水:甲醇:冰醋酸=5:5:1 的脱色液)染色 20min,立即用上述脱色液脱色 20h,再放入 5% 醋酸脱色液中浸泡 1 天,从而检出 Tf、Pa 和 Po 型。或继续浸泡保存,或摄影保存。用中层凝胶检出 Hpx 型:将 0.3ml 过氧化氢添加在 0.2% 联苯胺液(1ml 冰醋酸加于 200ml 去离子水,加热溶解 0.4g 联苯胺)中,立即将凝胶浸泡在此染液中,从而检出之。1h 后定型并摄影保存。底层凝胶用 0.1% 对苯二胺盐酸盐溶液(0.1g 对苯二胺盐酸盐溶于 100ml 0.3 mol/L 醋酸钠溶液)在 37℃ 的温箱中染色 40min,检出 Cp 型,并立即摄影保存。然后倒掉对苯二胺盐酸盐溶液,加入 pH5.6 醋酸盐缓冲液(0.2mol/L 醋酸 0.9ml 加 0.2

mol/L 醋酸钠 9.1ml), 再置 37℃ 温箱中孵育约 20 h 后将凝胶移至 20% 甲醇中, 置 4℃ 冰箱中脱色 1 h, 再移入无离子水中漂洗 1 天, 从而检出 Am 型。透光摄影保存。

二、结果与讨论

本实验室采用上述方法研究了湖南、江西两省 17 个地方猪种群共 800 多个样品的六种血清蛋白质多态性, 分离效果良好, 区带分明, 图谱清晰, 见图 1—4。

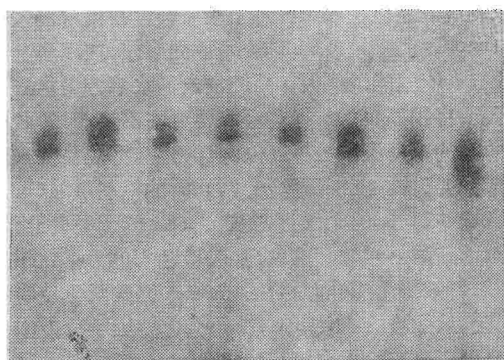


AB AB AA AB AC AB AB BB

图1 淀粉酶型电泳图

淀粉酶 (图 1): 由于淀粉被水解, 在凝胶上呈现透明带。

铜蓝蛋白 (图 2): 具有氧化酶活性, 能将对苯二胺氧化成红色化合物。因此在凝胶上呈现红色带。每个纯合体表现型具有三条带, 中带浓而粗, 前带次之,



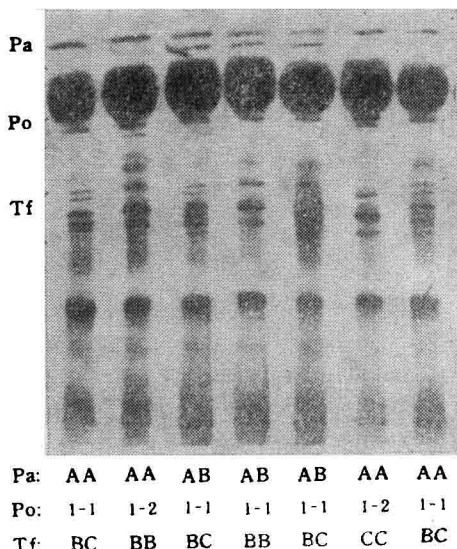
BB BB BB BB BB BC BB BC

图2 铜蓝蛋白型电泳图

后带淡而细, 有时几乎看不出来。

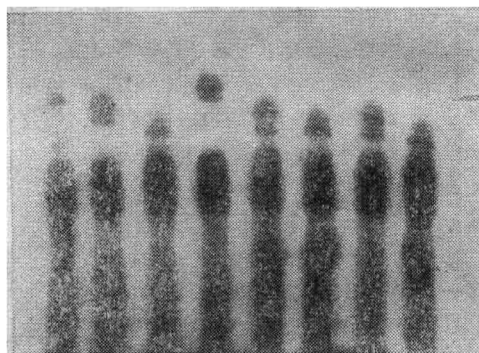
转铁蛋白、前白蛋白、后白蛋白 (图 3), 转铁蛋白每个等位基因表现为三条带, 杂合子表现为五至六条带, 因为有时发生重叠。

血液结合素 (图 4): 在凝胶上呈现蓝色条纹——



Pa: AA AA AB AB AB AA AA
Po: 1-1 1-2 1-1 1-1 1-1 1-2 1-1
Tf: BC BB BC BB BC CC BC

图3 Tf 型、Pa 型、Po 型电泳图



1F-3 1-2 3-3 1F-1 2-3 3-3 2-3 3-3

图4 血液结合素型电泳图

过氧化物酶活性带。

此方法与其他方法相比有以下特点: 制胶省时省力, 制一块凝胶整个过程只需十几分钟。此方法制成的凝胶比将淀粉悬浮液放在明火上直接加热制得的凝胶能给出更一致的电泳结果^[6]。凝胶的硬度和韧性良好, 8mm 厚的胶板剖成四块, 染色、摄影时不需托板, 可直接用手拿起来操作。其韧性可同聚丙烯酰胺凝胶媲美。一次电泳所能测定的蛋白质种数多 (据报道, 国内外其他同类方法最多只能测定五种蛋白质)。操作简便, 经济快速, 测定 300 个样品的六个位点, 只需十天左右即可完成。对实验条件和设备要求不高, 一般实验室均可采用, 是研究猪血清蛋白质和酶多态性的简便有效方法。

值得注意的是: 不同批号的淀粉所需水解时间可能不同, 应根据成胶速度、精确地选择水解时间。一般

以能做成理想的胶板为标准。

用国产马铃薯淀粉作电泳支持物,淀粉来源广,价格低廉。其不足之处是:由于产品质量不稳定,有时不能检出少部分样品的后白蛋白(Po)。据日本学者大石孝雄报道^[3],加拿大 Connaught 公司制造的水解淀粉也存在类似现象,有时不能同时检出五种血清蛋白质(Tf、Pa、Cp、Hpx、Am)。采用国产淀粉,除Po检出率和重复性稍差以外,其他五种蛋白质的检出率和重复性都相当好。

工作过程中,得到了导师邹峰教授的指导,同室研究生周英忠的协助以及中科院遗传研究所周德旺先生的热情帮助,

谨致谢意。

参 考 文 献

- 1 Smithies O. *Biochem J*, 1955; **61**: 629
- 2 Baker L N. *Vox Sang*, 1968; **15**: 154
- 3 大石孝雄. 畜产の研究, 1980; **34**(10): 1263
- 4 邹峰等. 畜牧兽医学报, 1982; **13**(3): 195
- 5 黄路生, 邹峰. 江西农大学学报, 1988; (4): 26
- 6 Poulik M D, Smithies O. *Biochem J*, 1958; **68**(4): 634
- 7 Kristjansson F K. *Genetics*, 1963; **49**: 1059
- 8 Kristjansson F. K. *Genetics*, 1966; **53**: 675
- 9 吴译夫. 上海畜牧兽医通讯, 1988; (1): 8

本文于 1989 年 10 月 14 日收到

(上接第 480 页)

讨 论

发光蚯蚓的发光机制虽然还不很清楚,但在化学上至少有几种物质参与反应。其中包括荧光酶,荧光素,过氧化物(如 H_2O_2 , O_2^-)。我们的实验结果也证明了这一点。在实验体系中必须加入 H_2O_2 才能使该体系发光(图 1)。当加入过氧化氢酶时又使发光大大减弱(图 2)。当在反应体系中用黄嘌呤和黄嘌呤氧化酶代替 H_2O_2 时,同样能刺激发光(图 3)。由此可见, O_2^- 可能作为蚯蚓发光反应中的一个活泼中间产物而参与发光反应。

蚯蚓发光反应需有荧光素参与。这种荧光素已被纯化,鉴定和人工合成^[4]。它是一种简单的脂肪醛, N-异戊基-3-氨基丙醛。而在我们实验中发现癸醛、正辛醛和十二醛都可以充当荧光素的作用,其中癸醛刺激作用最强(图 4)。

由于蚯蚓的发光反应对 H_2O_2 等过氧化物特别敏感,因而可以利用这一发光体系测定出极低浓度的过

氧化物。也可以测定与 H_2O_2 反应相偶联的其它物质如过氧化氢酶活性等。特别令人感兴趣的是有人认为超氧阴离子 O_2^- 是蚯蚓发光反应中一个活泼的中间产物。因而推测发光蚯蚓的荧光素酶如同超氧化物歧化酶一样能清除 O_2^- , 从而阻断 O_2^- 产生对生物的毒害作用。

古小文, 张盛强同志参加部份工作; 虞乃而同志帮助测定发光光谱, 在此表示感谢。

参 考 文 献

- 1 Deluca MA, McElroy WD. *Bioluminescence and Chemiluminescence*. New York: Academic Press, 1981: 249—256
- 2 Wampler J M. *Comp Biochem Physiol*, 1980; **66**B: 43—50
- 3 Mulkerrin MG et al. *Methods in Enzymology*, 1978; **57**: 375—381
- 4 Ohtsuka H et al. *Biochemistry*, 1976; **15**: 1001

【本文于 1989 年 10 月 14 日收到】