

一种改良的醋酸纤维素膜血清蛋白等电聚焦电泳方法

李明举 汪洛*

(南京铁道医学院科研所,*生化教研室,南京 210009)

关键词 等电聚焦电泳,醋酸纤维素膜,电渗

目前在等电聚焦电泳技术中,应用最多的是聚丙烯酰胺凝胶平板薄层等电聚焦.该法具有分辨率高的优点,但需采用高纯度试剂,价格昂贵,而且超薄层制板($\leq 0.5\text{mm}$)技术要求也较高,这些条件限制了它的推广应用.利用醋酸纤维素膜进行等电聚焦,则可弥补上述缺点^[1].但众所周知,醋酸纤维素膜存在较强的电渗作用^[1-3].1978年,Ambler等^[2]利用甲基化处理来消除此电渗作用对等电聚焦的影响,但操作较繁杂费时.COCCO等^[4]采用日本产醋酸纤维素膜不经甲基化处理,也成功进行了碱性磷酸酶的等电聚焦.我们参考该方法,试用国产材料摸索了血清蛋白等电聚焦电泳的适宜条件,获得较满意的结果.

材料和方法

醋酸纤维素膜(浙江黄岩四清生化材料厂),用时根据需要剪裁.载体两性电解质(Ampholine, LKB, Sweden).将 Ampholine pH 4.0—6.5, pH 5.0—8.0, pH 3.5—10 以 1:1:3 的比例,混入 10% 蔗糖溶液,使成 8% Ampholine 溶液.浸泡醋酸纤维素膜使之浸透,置 4℃ 存放备用(10ml 溶液可浸泡 8×12cm 醋酸纤维素膜 8 张).使用时以滚筒手法使之紧贴于电泳冷凝板上.

电极缓冲液组成如下: 阳极液——85% 磷酸加入 30% 蔗糖溶液使成 1% 磷酸蔗糖溶液.阴极液——1% 乙二胺溶液.将电极条适量浸透电极缓冲液分别置于醋酸纤维素膜的两端.

采用 LKB2297 型电泳仪,以 250V, 500V 和 800V 的电压进行预电泳各 5min,于距阳极 3 cm 处点样.电泳条件为: 200V 30min, 400V 30min, 600V 30min 和 800V 25min,不需控制电流及功率,整个电泳过程温度控制在 4℃—8℃ 之间.

电泳结束后,用表面电极每隔 0.5cm 测定醋酸纤维素膜的 pH 值,绘制 pH 梯度曲线.10% 三氯醋酸固定.考马斯亮蓝 R-250 染色后 8% 醋酸乙醇溶液脱色,摄影或置 80℃ 干燥透明后保存.

结果与讨论

1. 醋酸纤维素膜等电聚焦的可行性

采用醋酸纤维素膜进行等电聚焦电泳,具有经济、方便的特点.我们进行醋酸纤维素膜等电聚焦后,检测了其 pH 梯度情况以及进口 Ampholine 聚丙烯酰胺凝胶薄层板(Ampholine PAG Plate, pH 3.5—9.5, LKB, Sweden)等电聚焦后的 pH 梯度情况,结果见图 1.诚然,前者的 pH 梯度虽较后者为差,但其趋向仍呈线性梯度,尤其 pH 4—8 范围线性良好.因此,我们认为该等电聚焦方法是可行的.

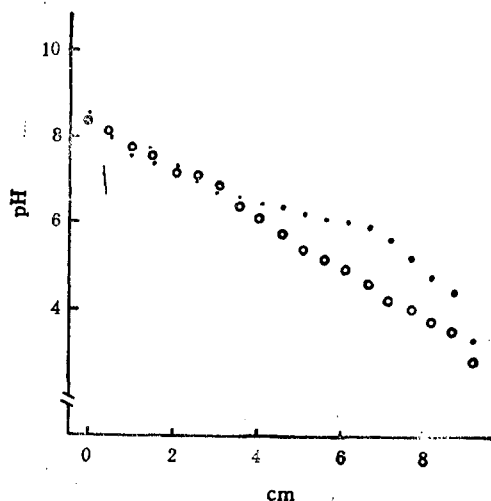


图 1 醋酸纤维素膜与进口聚丙烯酰胺凝胶薄层板等电聚焦后的 pH 梯度比较

○ ○ ○ 醋纤膜; ··· 进口薄层板

2. 关于电渗作用

醋酸纤维素膜存在着较强的电渗作用. Ambler 等采用甲基化处理的方法解决了这一问题,但处理步骤却嫌繁杂,试剂昂贵,而且甲基化的醋酸纤维素膜对蛋

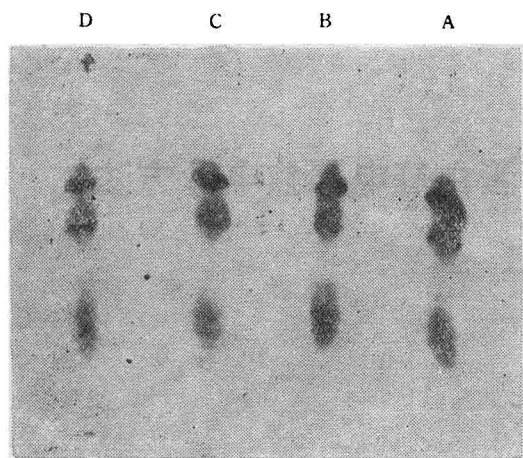


图2 改良的血清蛋白醋酸纤维膜等电聚焦

A, B, C, D 为同一样品, 其中 A, B 加样量为 1 µl;
C, D 加样量为 0.5 µl

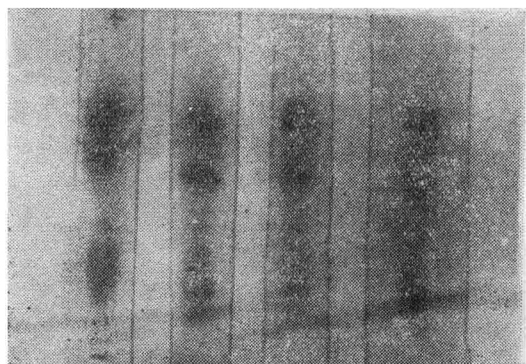


图3 延长聚焦时间($\geq 2h$)对改良的血清蛋白
醋酸纤维膜等电聚焦的影响

白质的吸附能力明显减弱而影响分离效果^[5]。Ambler 等发现未经甲基化处理的醋酸纤维素膜大多在聚焦 45min 后才出现电渗作用的影响, 增加 Ampholine 和载体混液浓度可降低电渗作用^[6]。我们对血清蛋白进行等电聚焦电泳的结果见图 2。

我们也发现电渗作用在聚焦时间较长时比较明显, 该现象一般在加样后进行聚焦接近 2h 时出现。其表现为电流持续下降接近零时, 突然开始增加。受电渗作用影响的电泳结果见图 3。我们认为这种影响可能与高电压聚焦时间较长有关。

本实验结果表明: 用醋酸纤维素膜代替聚丙烯酰胺凝胶进行等电聚焦电泳, 结果可靠, 而且具有简单、经济和快速的优点。尽管它的分辨率相对较差, 但对于基础生化和临床检验中一般蛋白质的分离分析, 以及结合特异的染色方法进行同工酶的酶谱测定等, 均能达到要求。值得在一般实验室推广应用。

参 考 文 献

- 1 Harada S. *Clin Chim Acta*, 1975; 63: 275
- 2 Ambler J. *Clin Chim Acta*, 1978; 88: 63
- 3 王同明. 生物化学及生物化学检验技术. 南京: 江苏科学技术出版社, 1981: 191—194
- 4 Cocco C, Marini M, Rizzotti P. *Clin Biochem*, 1987; 20: 399
- 5 张普民, 李茂深. 生物化学与生物物理进展, 1989; 16(3): 242
- 6 Ambler J, Walker G. *Clin Chem*, 1979; 25(7): 1320

[本文于 1989 年 12 月 30 日收到, 1990 年 3 月 19 日修回]

(上接第 141 页)

- 4 Beckman Bulletin. *Counting radioactivity using solid scintillators, the counter solution*. U S A: Beckman Instruments Inc, 1989: CS 1/004
- 5 Ronald N Hines *Ready cap application*. USA: Beckman Bulletin, 1989: 7842, T-1672-NUC-89-10
- 6 Sudhakar Welankiwa. *Ready cap application*. U S A: Beckman Bulletin, 1989: 7842, T-1678-NUC-89-14
- 7 Sandra R Smith. *Ready cap applications*. USA: Beckman Bulletin 1989: 7842, T-1673-NUC-89-11
- 8 Steven White, Velfonl Alkhass-Adeh. *Technical information*. USA: Beckman Bulletin, 1989: T-1691-NUC-89-29
- 9 Eleanor L Wright Ronald P Taylor. *Ready cap applications*. USA: Beckman Bulletin, 1989: 7842, T-1671-NUC-89-9
- 10 Robert H Keith, Tsai B S. *Technical information*. USA: Beckman Bulletin, 1989: T-1695-NUC-90-1
- 11 Holly Groelle. *Ready cap applications*. USA: Beckman Bulletin, 1989: 7842, T-1681-NUC-89-19
- 12 乐加昌, 肖京城. 核化学与放射化学, 1985; (1)

[本文于 1990 年 4 月 19 日收到, 6 月 11 日修回]