

- [18] 嵯峨井胜:《生化学》, 50(12), 1290, 1981。
 [19] 魏奉群等:《辽宁省医学科学院基础医学研究所年报》, p. 120, 1982。
 [20] Albercht Wendel, et al.: *Methods in Enzymology*, 77, 10, 1981。
 [21] Alberto, A, et al.: *Laboratory Investigation*, 47 (4), 346, 1982。
 [22] Kivits, G. A. A. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 719(2), 329, 1982。
 [23] 嵯峨井胜, 奥那霸政宪, 松尾光芳:《变异原と毒性》,

5, 212, 1982。

- [24] 木村修一等:《ビタミン》53, 543, 1979。
 [25] Dillard, C. J., et al.: *J. Appl. Physiol.*, 45, 927, 1978。
 [26] 任宏造等:《中国地方病学杂志》, 1 (3)172, 1982。
 [27] 八本國夫:《过酸化脂质と疾患》, 医学书院, 东京, 1981。

【本文于1983年8月19日收到】

非离子去污剂对红细胞膜薄层等电点聚焦电泳的影响

许彩民 陈 曦* 潘华珍

(中国医学科学院基础医学研究所, 北京)

在膜蛋白的研究中, 选择一种有效的溶解和分离膜蛋白的方法十分重要。Merz^[1]等人在含8M尿素的聚丙烯酰胺凝胶上分离红细胞膜获得成功。Ames^[2]等人曾用SDS溶解膜蛋白, 在透析除去SDS后, 于含有尿素及Nonidet P40的聚丙烯酰胺凝胶上进行等电点聚焦电泳, 但由于SDS及高浓度尿素可使膜蛋白变性, 失去活性, 影响电泳效果。为此我们探索了非离子去污剂对红细胞膜蛋白等电点聚焦电泳的影响, 分别比较了Triton X-100, Lubrol PX, Nonidet P40, 及Tween 20等非离子去污剂的分离效果。

一、材料和方法

1. 试剂 丙烯酰胺 (Serva), 双丙烯酰胺 (Merk) Ampholine pH 3.5—10 (上海东风试剂厂) Triton X-100 (Roth), Nonidet P40 (Fluka), Lubrol PX (Sigm), Tween 20 (Lpc), 考马斯亮兰 R250 (Fluka)。其它均为国产分析纯试剂。

2. 人红细胞膜的制备 按Dodge^[3]方法。

3. 样品处理 取红细胞膜60 μ l (膜蛋白含量6mg/ml) 分别加20 μ l 4% Triton X-100, Nonidet P40, Lubrol PX, Tween 20 及H₂O, 混匀后于15,000rpm离心10分钟, 取上清。

4. 制胶 按T=5.25%, C=3%, Am-

pholine (pH3.5—10)2%, 过硫酸铵0.075%, 非离子去污剂0.2%的配方。制成0.5mm厚胶板, 平放1—2小时后即可使用。

5. 电泳 取1cm宽滤纸条蘸1M氢氧化钠为阴极、0.04M天门冬氨酸为阳极, 分别铺在电源负极和正极端。恒压300V, 恒温4℃, 预电泳1小时。在正极加样20 μ l, 恒功率10W, 继续电泳2小时。

6. 显色与脱色 电泳后的薄层胶浸在固定液(5%三氯乙酸, 5%磷基水杨酸)中过夜。换脱色液(水:乙醇:乙酸=8:3:1)洗脱2小时。60℃染色(用脱色液配制0.11%考马斯亮兰R250)15分钟, 漂洗至区带清晰。

7. 测pH梯度 在薄层胶的两极之间, 每隔0.5厘米切下等量胶, 浸泡在2毫升蒸馏水中, 置冰箱中过夜, 测pH值。

二、结 果

凡胶中含有Triton X-100, 样品又分别经Triton X-100, Lubrol PX, Nonidet P40处理, 其分离效果相同, 电泳图谱清晰。样品虽经Tween 20处理, 但仍只能微溶, 电泳后仅呈现少数区带。样品未经任何去污剂处理, 则完全不溶, 也不见区带(图1)。样品处理同上, 但胶中

* 北京阜外医院。

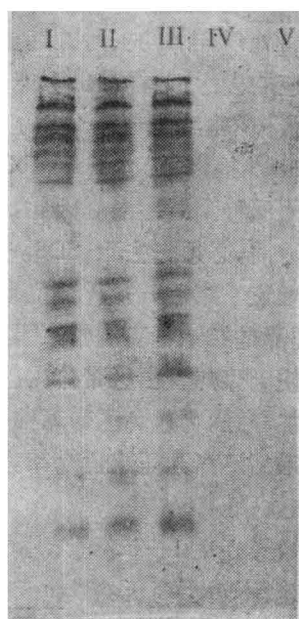


图1 胶中含 Triton X-100 红细胞膜等电点聚焦图谱

样品 I: 经 1% Triton X-100 处理
 II: 经 1% Lubrol PX 处理
 III: 经 1% Nonidet P40 处理
 IV: 经 1% Tween 20 处理
 V: 不经去污剂处理

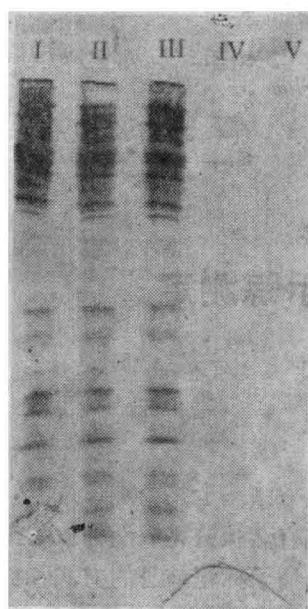


图2 胶中含 Lubrol PX 红细胞膜等电点聚焦图谱

样品 I—V 处理同图 1

分别含 Lubrol PX 或 Nonidet P40 电泳结果同图 1。(图 2、图 3)样品处理同上,胶中含 Tween

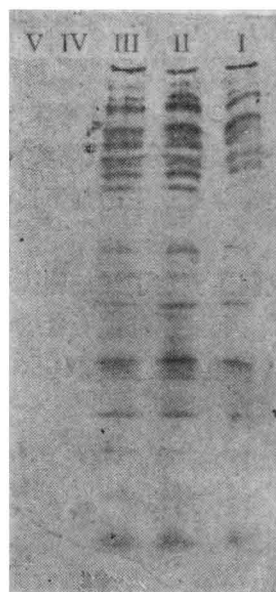


图3 胶中含 Nonidet P40 红细胞等电点聚焦图谱

样品 I—V 处理同图 1

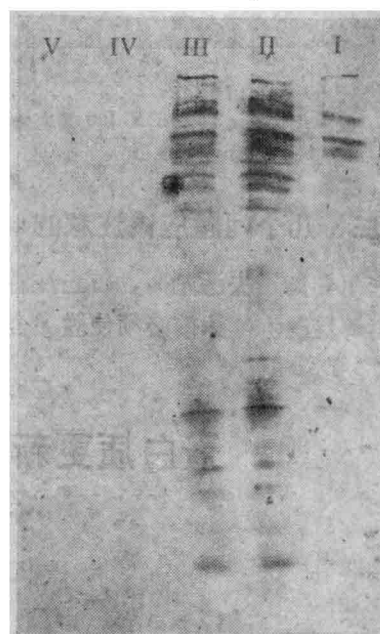


图4 胶中含 Tween 20 红细胞膜等电点聚焦图谱

样品 I—V 处理同图 1

20, 结果虽出现区带,但清晰程度、分辨率较差。(图 4) 样品虽经非离子去污剂处理但胶中不含任何去污剂,结果蛋白不能分离,仍停留在加样部位。

从以上结果可见,如胶中分别含 Triton X-100, Ludrol PX 和 Nonidet P40, 而样品又分

别经上述非离子去污剂处理,则电泳结果完全相同。这是与去污剂的化学结构相近有关^[4]。如胶中含 Tween 20,由于其特殊化学结构,致使样品不能溶解,电泳分离效果极差,因此我们认为 Tween 类的非离子去污剂不适用于红细胞膜电泳分析。

此外,我们还测定了红细胞膜等电点聚焦的 pH 梯度,发现虽然胶中所含的非离子去污剂不同,但 pH 梯度不改变。仅以 Triton X-100 为例作图(图 5)。

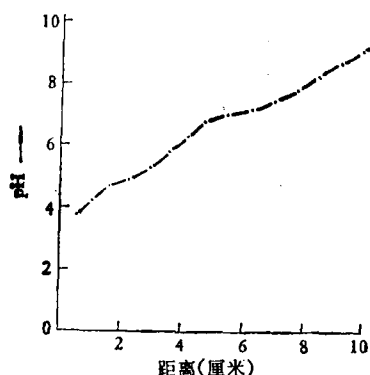


图 5 胶中含 0.2% Triton X-100 等电点聚焦 pH 梯度图

三、几个问题应该注意的

1. 选用非离子去污剂时,首先注意它对膜的溶解情况。电泳前必须使膜完全溶解。

2. 胶中含适量的非离子去污剂是很重要的。如果只将处理样品的去污剂选得合适,而胶中不含相应的去污剂,样品仍不能分离。

3. 有些蛋白不溶于非离子去污剂而溶于 SDS。据 Ames^[2] 报道,Nonidet P40 可与 SDS 结合形成微团而移到酸性端。因此,在进行等电点聚焦电泳前,必须先去除 SDS。

4. 在电聚焦结束后,加样部位有微量的沉积物,我们推测是红细胞膜的骨架蛋白^[5]。

5. 为了使电聚焦蛋白区带分得整齐,阳极加样比阴极加样好,可避免区带弯曲。

6. 电泳采用逐渐升压或恒功率,可避免产热,影响分离效果。

7. 聚胶板最好用 1—1.5 毫米厚的玻璃板,太厚导热性差,不适于高压。

参 考 文 献

- [1] Merz, O. C. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 49, 84, 1972.
- [2] Ames, G. F.: *Biochemistry*, 15, 616, 1976.
- [3] Dodge, J. T.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 100, 119, 1963.
- [4] Ari Helenius et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 415, 29, 1975.
- [5] Liu, S. C. et al.: *Erythrocyte Mechanics and Blood Flow*, 15, 1980.

[本文于1983年9月19日收到]

蛋白质更新速率的同位素示踪测定

贺 新 军

(中国医学科学院首都医院,北京)

哺乳动物细胞内蛋白质各以其特征速率不断更新。蛋白质更新包括合成与降解两个方面,测定蛋白质更新速率就是测定蛋白质的合成和降解速率,同位素示踪技术是主要测定方法。

一、蛋白质合成速率的测定

蛋白质合成速率示踪测定法大致上可分为

两类:一类方法基于整个翻译过程,即从氨基酸进入肽链直至肽链完成而释放的测定,称掺入法。又因给予标记前身的方式和数量不同而分为单次注射、恒速输注和大量前身掺入法。另一类方法根据肽链延伸速率的测定,叫做肽链延伸速率法。

1. 单次注射掺入法 从理论上讲最严密的掺入法应该是,一次注射标记前身(通常是氨基