

(1) PK 制剂中含有 LDH, 所以使用前可按方法 [3] 检查 LDH 活力, 并按不低于要求量加入反应体系。同一个实验也可测出 NADH 实际含量, 并可根据称出量, 计算 NADH 的百分含量。

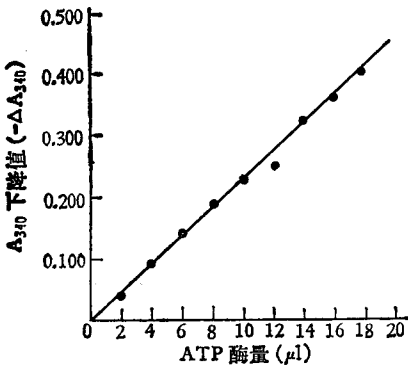


图1 不同 ATP 酶量与水解活力的关系
条件见正文, ATP 酶浓度是0.2mg 蛋白/ml

(2) 如果遇到问题, 可按如下步骤鉴定反应体系是否正常, a) 按测定方法操作, 加入 ATP 和 ATP 酶之前, A_{340} 一般应在 1,000 左右。如果数值太低或连续下降则表明 NADH 含量低, 或体系中有使 NADH 氧化的杂酶等。b) 按量加入 ATP, 重测 A_{340} , 除因自然稀释浓度变化导致 A_{340} 降低外, 一般 A_{340} 应基本不变或变化不大, 且很快停留在一个固定值。如 A_{340} 迅速下降, 则说明 ATP 不纯, 含有一

定量的 ADP。下降值越大, ADP 含量越高。出现此种情况不能用此法测活。c) 按量加入 ATP 酶后, 应能迅速反应, A_{340} 规律下降。如 A_{340} 不变化, 可加入 ADP 检查, 若 A_{340} 能迅速下降, 说明 ATP 酶没有活力; 如 A_{340} 仍不变化, 则应考虑 PK 或 LDH 有问题, 或活力不高, 或未加入。

(3) 欲测定的 ATP 酶样品, 应预先检查有无使 NADH 氧化的杂质。即反应体系中不加 ATP, 而加入样品后看 A_{340} 有无下降。如不降低, 则可用此法。如稍有下降, 必须扣除空白对照。如下降甚大, 则不能用此法测活。

总之, 与测无机磷方法相比, 此法快速, 简便, 经济, 使用 ATP 酶量少 (我们的实验中只使用测无机磷方法的 1/10 酶量), 适于鉴别反应速度, 高浓度 Pi 存在时仍可使用。

我们还用这个方法测定了人血红细胞膜的钠钾泵 ATP 酶, 反应过程中膜蛋白用量仅为 20 μg/ml, 远远小于测无机磷法的膜用量, 可能更适于临床上应用。

参 考 文 献

- [1] Pullman, M. E. et al.: *J. Biol. Chem.*, 235(11), 3322, 1960.
- [2] 黄芬等: 《实验生物学报》, 14, 117, 1981.
- [3] Tietg, N. W.: *Fundamental of Clinical Chemistry*, 434, 1970, W. B. Saecendess Company.

(本文于1983年3月16日收到)

聚丙烯酰胺凝胶电泳蛋白带的特异快速染色法

李成文 时华富 邵军石

(中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京)

目前在各类聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 中, 对凝胶中蛋白带的染色, 均采用考马斯亮兰 G 或 R 染液, 国内外文献报告的种类繁多的染色方法, 均可使不含蛋白的凝胶着色, 且需较长时间脱色才能观察结果。因而常常影响结果的判断。为克服上述缺点, 我们建立了一种对各种

PAGE 技术均可使用的特异、快速又灵敏的考马斯亮兰 G 的染色法, 不仅简单易行, 而且背景不染色。

一、材料与试剂

1. 狗血清、小牛血清、牛血清白蛋白 (BSA,

电泳纯)、鼠干扰素粗制液及部分纯化鼠干扰素(MIFN)系本实验室制品。

2. 0.01% 考马斯亮兰 G-250 染液^[1]

称取考马斯亮兰 G-250 100 mg, 溶于 50 ml 95% 乙醇, 再加入 100 ml 85% (W/V) 磷酸, 用蒸馏水稀释至 1000 ml, 过滤备用。

配制好的试剂应呈淡棕红色, 各成份的最后浓度分别为 0.01(W/V) 考马斯亮兰 G-250, 4.7% 乙醇, 8.5% 磷酸。

3. SDS 洗脱液: 甲醇 (V): 乙酸 (V): 水 (V) = 3:3:4, 混合后备用。此液含甲醇 (30%), 乙酸 (10%)。

4. 两性电解质 (Ampholine) 洗脱液: 10% 三氯乙酸。

二、方 法

1. 普通 PAGE 圆盘电泳^[2]凝胶条蛋白带的染色 电泳后将胶条放于小试管中, 加入染色液浸没胶柱, 室温 (20℃ 左右) 染色 40 分钟以上, 胶条上便出现鲜艳的蓝色蛋白带, 无蛋白带的胶柱不着色。如染色过久, 胶条背景稍带淡红色, 不影响观察结果。如要照象, 可将胶条浸于试剂 3 过夜背景颜色即消失。染好的胶条泡于 7% 乙酸中可长期保存。

2. 不连续系统 SDS-PAGE^[3] 胶条蛋白带染色 因 SDS 可吸附考马斯亮兰染料, 染色前需用试剂 3 浸泡胶条洗脱 SDS, 于室温 24 小时以上, 再用方法 1 染色。

3. 等电点聚焦电泳^[4] 胶条蛋白带染色 因两性电解质可吸附考马斯亮兰染料, 染色前需用试剂 4 浸泡洗脱 24 小时以上, 再染色, 方法同上。

2 和 3 两种胶条染色时, 如 SDS 和两性电解质洗脱不彻底, 胶条背景呈淡蓝色, 倒出染色液浸于试剂 3 过夜即可。

三、结 果

1. 染色时间的观察 取同一次实验的含相同蛋白量 (每根胶柱加 10 μl 含 BSA 20 微克) 的胶条染色, 每 10 分钟取出一根观察, 40 分钟

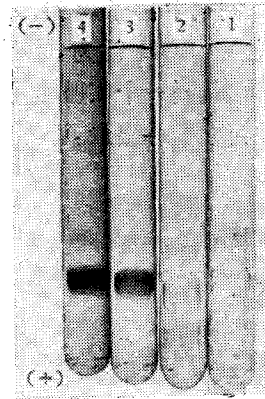


图 1 聚丙烯酰胺凝胶电泳不同时间染色结果
T = 6%, 3mA/胶柱, 不连续系统电泳 45 分钟, 1—4 号胶柱分别为染色时间 10'、20'、30' 及 40' 分钟

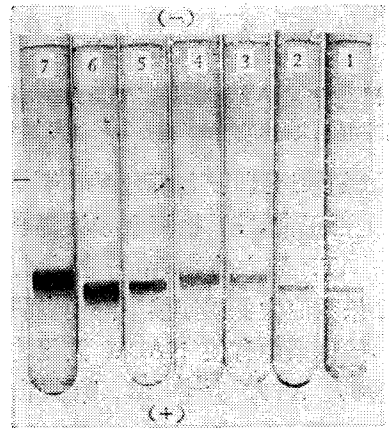


图 2 聚丙烯酰胺凝胶电泳染色灵敏度观察
电泳条件同图 1, 图中 1—7 胶条中分别为 0.5、1、2、5、10、20、40 微克 BSA。

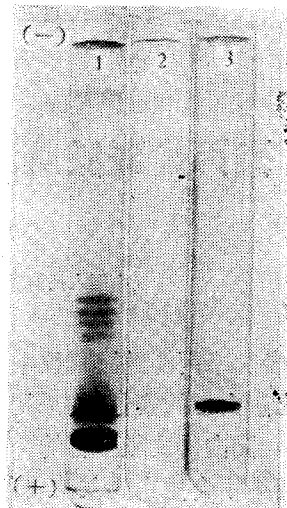


图 3 粗制鼠干扰素纯化前后的 PAGE 分析
1. 粗制 MIFN, 2. 上清, 3. 纯化 MIFN

可见样品蛋白染色完全,结果见图 1。

2. 染色灵敏度的观察 同其它考马斯亮兰 G、R 的染色法^[3]相比,本法较灵敏。以 BSA 染色为例,0.5 微克的 BSA 仍可染出清晰的蛋白色带,结果见图 2。

3. 各种蛋白样品不同电泳方法的染色结果 采用这一染色方法,分别对鼠干扰素粗制液及纯化后样品进行 PAGE、SDS-PAGE 胶条蛋白带染色,(见图 3—4),对狗血清和小牛血清的等电点聚焦电泳蛋白带染色(图 5),效果都较满意。染色后胶条蛋白浸于 7% 乙酸中可长期保存。

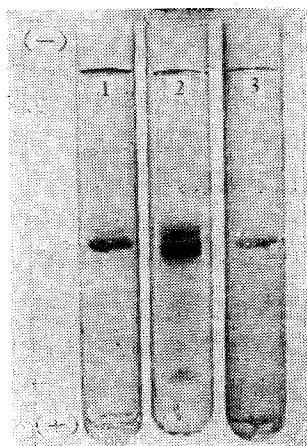


图4 粗制鼠干扰素纯化前后的 SDS-PAGE 分析

T = 7%。2mA/管胶,不连续系统

1. 粗制 MIFN, 2. 超滤浓缩粗 MIFN, 3. 纯化 MIFN

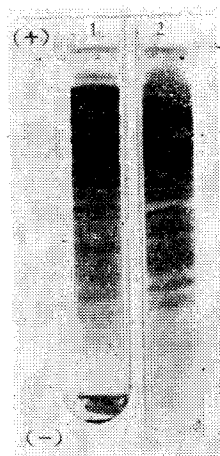


图5 狗血清(1),小牛血清(2)的等电点聚焦电泳的分析

T = 7.9% DAG, Ampholine: 2%, pH3.5—10, 150

V, 电泳 4 小时

实验结果表明,这一染色方法特异、灵敏、快速。建立此方法的过程中,我们还观察到提高酸浓度染液灵敏度降低;增加染料浓度则可使无蛋白的胶条着色。因此本方法所用染液浓度较低,最多重复使用三次,即需重新配制。

参 考 文 献

- [1] Marion, M.: *Analytical Biochemistry*, 72, 248, 1976.
- [2] 李成文: 军事医学科学《免疫学实验技术汇编》(内部) 1982, 10, 108.
- [3] 李成文等: 同上第 112 页.
- [4] 李成文等: 同上第 105 页.

[本文于 1983 年 2 月 18 日收到]

人胃粘膜细胞核的制备

程寿宜 周炳森 张纪宁* 万福生 温博贵 郭菊美

(江西医学院生化教研室, 南昌)

真核细胞的遗传信息存留在细胞核中,欲深入研究细胞核的免疫学和基因调控等,必须首先分离出纯净度好,产率较高的细胞核。关于人胃粘膜细胞核的研究报道甚少。为了寻找适合人胃粘膜细胞核制备的较好方法,本文采用三种不同的蔗糖密度梯度方法平行制备人胃

粘膜细胞核。结果发现稍加改良的 Chauveau 法^[1]及 Chiu 法^[2]均可得到纯度较好,产率较高的细胞核,尤其是前者,既有操作简便,又有节约试剂的优点。

* 江西医学院组织胚胎教研室。