

小时,小孔孔径仅增加 2nm,说明辐射损伤是很小的。而常规观察条件是 0.1 安培/平方厘米,曝光 10 秒钟,辐射损伤极微。观察含有汞原子的有机化合物六苯汞,每个苯环与六个汞原子结合,汞原子呈六角型分布,相邻汞原子距离是 0.36 nm。在超导电镜中观察到一些六角型的象点,点距约 0.36nm,反映了汞原子的距离。照相的光学衍射分析也显示了 0.36nm 周期的衍射环。对生物样品的图象观察还有一些困难,但相信经过努力对非规则样品的分辨力由目前的 2—3nm 提高到 1nm 是完全可能的。

超导低温电镜对生物大分子的电镜三维重构技术也将起重要作用^[6]。三维重构技术要求对生物样品进行不同方位的多次照相,长时间的电子光束照射会造成生物样品辐射损伤。因

此要求电镜具有稳定性好,辐射损伤小,高分辨率等性能,只有超导低温电镜可以满足这些要求。

总之,超低温含水生物样品电镜技术是一项正在发展中的有希望的新技术。

参 考 文 献

- [1] Unwin, P. N. et al., *J. mol. Biol.*, **99**, 425, 1975.
- [2] Lake, J. A.: *J. Mol. Biol.*, **93**, 159, 1976.
- [3] Beer, M. et al.: *Q. Rev. Biophys.*, **7**, 211, 1975.
- [4] Knapek, E.: *J. Mol. Biol.*, **141**, 147, 1980.
- [5] Lsolde Dietrich: *Electron Micro Scopy*, Vol III, 173, 1978.
- [6] Hoppe, W.: *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **10**, 563, 1981.
- [7] Dubochet, J. et al.: *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **10**, 133, 1981.

[本文于 1982 年 10 月 7 日收到]

聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳分离血红蛋白的研究

南国华 黄文长 熊丽萍

(江西医学院, 南昌)

本文采用聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳,借助圆盘电泳仪的简易装置,对正常血红蛋白及异常血红蛋白(Hb)等进行了分析,获得满意效果。

一、方 法

1. 凝胶制备 40%聚丙烯酰胺液(丙烯酰胺 38.4 克及甲叉双丙烯酰胺 1.6 克溶于蒸馏水至 100 毫升)1 份,20%两性载体(Ampholine, 国产、pH4—10)0.5 份,蒸馏水 3 份,0.25%过硫酸铵液(临用前配制)2 份,混匀,立即分装于内径 4 毫米,长 9 厘米的玻璃管中,胶长 6 厘米,日光灯下聚胶(约 2 小时),待胶聚合后,加样品,进行电泳。

2. 血红蛋白溶血液制备 耳垂采血数滴,用生理盐水 5 毫升洗涤三次,最后一次离心 20 分钟(3,000 转/分),压积红细胞,弃去上层生理

盐水,加入压积红细胞 2 倍体积的蒸馏水,使充分溶血,再加 0.5 倍体积的四氯化碳,振荡 2 分钟,离心沉淀(3000 转/分)15 分钟,取出红色透明上清液(即为 Hb 溶血液)。此液含 Hb 量为 5%。电泳前此液以蒸馏水稀释 10 倍使用。

3. 等电聚焦电泳 于凝胶柱上加稀释溶血液 10 微升(相当于 Hb50 微克),电泳上槽(阴极)缓冲液为 0.02MNaOH 液,下槽(阳极)缓冲液为 0.01MH₃PO₄ 液,电压 300 伏,电流 4 毫安,温度 6℃ 左右,电泳时间 2—3 小时。

4. 固定及染色 电泳毕,取出管内凝胶,以 10% 三氯醋酸固定过夜,可直接观察结果或以 Coomassie brilliant blue R250 染色约 1 小时后,再用脱色液(冰醋酸:95% 酒精:蒸馏水 = 10:25:65)脱色,至底胶色褪观察结果。如密封于 3% 醋酸的试管中可长期保存。

二、结果与讨论

1. 分辨力 Hb 系有色蛋白质,于透明凝胶电泳中,如不染色亦能清晰观察区带的分离。我们用 50 微克 Hb 的样品,对正常者的分析中,未染色可见第一种成人 Hb (HbA 或 HbA₁),第二种成人 Hb(HbA₂),胎儿 Hb(HbF) 及糖化 Hb(HbA_{1c}) 等四种明显的区带;若用 Coomassie brilliant blue R250 染色,则呈现更多的区带(图 1),因为 HbF、HbA_{1c} 及一些微量成分,可与 HbA 分离,显著地提高了测定的分辨力。此与文献[1, 2, 3]报道基本一致。

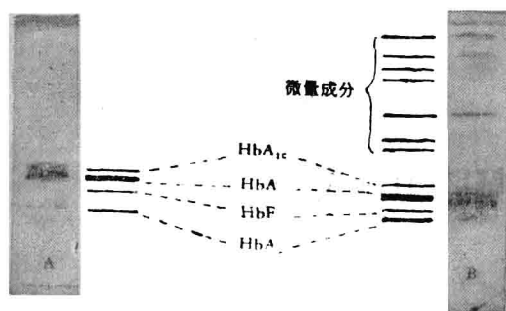


图 1 正常成人血红蛋白等电聚焦电泳图
A——未染色, B——Coomassie brilliant blue R250 染色

目前,国内对 Hb 的分离测定,多采用醋酸纤维薄膜,琼脂及淀粉胶等电泳法,这些方法对正常成人的 Hb 一般仅能分出 HbA 及 HbA₂ 二条区带,与本法比较大为逊色。

电泳后的凝胶,置 CNT-200 分光光密度扫描仪中,于 650 nm 波长下自动扫描,还可见各种 Hb 的吸收峰(图 2)。

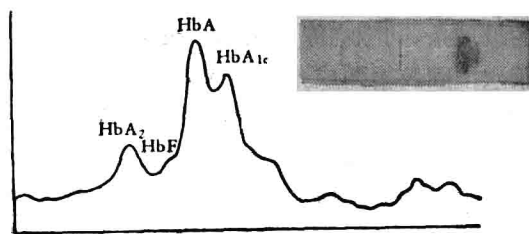


图 2 正常成人血红蛋白等电聚焦电泳扫描峰

2. 等电点测定 样品于等电聚焦电泳毕,仔细取出凝胶,用蒸馏水洗涤数次(水呈中性),立即准确按 1 厘米切断,分装于贮有 0.5 毫升重蒸水(新煮沸冷却)的试管中,密封,放冰箱中过夜,借助 Astrup 微量装置,测定每管 pH 值,以胶长(厘米)为横座标, pH 为纵座标,绘制曲线,按各 Hb 泳动距离,分别获得等电点值约为 HbA₂6.80, HbF6.60, HbA6.50 (图 3),结果与文献^[4]接近。

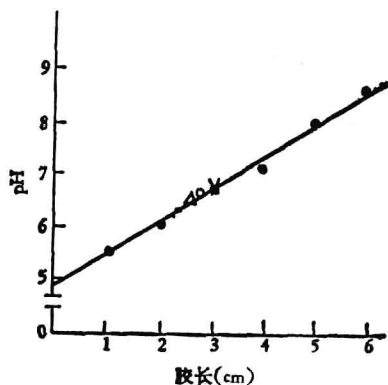


图 3 正常成人血红蛋白等电点测定
×—HbA₂, ○—HbF, Δ—HbA

3. 异常血红蛋白的分离 本文还对脐血、三个月的婴儿血以及异常 Hb 进行了观察。结果所见,脐血及婴儿血中的 HbF 可明显分离(图 4-A 中 1,2),所测的几种异常 Hb 也均可清晰地见到额外异常区带(图 4-A 中 3, B 中 5、6、7)。特别是异常 Hb 945 (筛选号码),在醋酸纤维薄膜中分离困难(图 4-C 中 9),但在本法中能明显分离(图 4-B 中 7)。国外曾报道等电

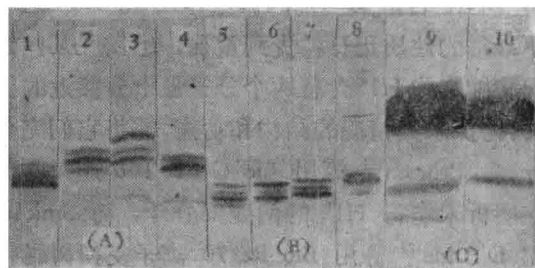


图 4 脐血, HbF 及异常血红蛋白的分离图谱

(1) 图 4-A 为等电聚焦电泳,其中 1 为脐血。2 为 HbF, 3 为异常 Hb。4 为正常 Hb, 作对照。(2) 图 4-B 为等电聚焦电泳。其中 5、6、7 为不同的异常 Hb。8 为正常对照。(3) 图 4-C 为醋酸纤维薄膜电泳,其中 9 为 Hb945, 异常 Hb 区带难以分离,与图 4-B7 比较(同一样品,分离清楚)。10 为正常 Hb, 作对照。

聚焦电泳筛选异常 Hb^W, 由于等电聚焦电泳在蛋白质的分离上具有高度分辨力, 可提高异常 Hb 的检出率, 故值得推广应用。

三、小 结

聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳分离血红蛋白具有高度分辨力, 并不染色能直接观察电泳行为, 扫描, 测定等电点等优点。

本文首次应用国产两性载体 (Ampholine) 分离血红蛋白获得满意效果。

本文异常血红蛋白样品系与南昌青云谱区妇幼保健所协作筛选中获得。江西医学院张和凯同志摄影, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Basset, P. et al.: *Blood*, 51, 4, 1978.
- [2] Jeppson, J. O.: *Detection of abnormal hemoglobin by analytical thin-layer electrofocusing in Polyacrylamide gel*, LKB: 1977. 1—5.
- [3] Brock, D. J. H. et al.: *Biochemical Genetic of Man*. 1972, 39—519, Academic Press, London, New York.
- [4] 王勉贵等编: 《临床生化检验》 湖南科学技术出版社, 185, 1981 年。

[本文于 1983 年 3 月 16 日收到]

组蛋白 H1⁰ 的制备凝胶电泳分离

张绍斌 常金珍

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

组蛋白 H1⁰ 是一种富赖组蛋白^[1,2]。它在细胞分裂不旺盛的哺乳动物组织中才含有, 在 DNA 合成活跃的胸腺及培养的肿瘤细胞中却没有或很少。传代细胞经丁酸钠等诱导药物作用后可使 H1⁰ 出现^[3]。目前多推测 H1⁰ 通过阻断 DNA 合成参与基因调控作用^[4]。H1⁰ 这一不寻常的性质正日益受到重视, 已发现某些组织和细胞的 H1⁰ 含有两个分子量十分接近的亚部, 为探求其精确的结构和功能, 需将它们完全分离。Pehrson^[5] 等用 Bio-Gel P-100 连续两次柱层析未能将 H1⁰ 的两亚部分开, 而 Smith^[6] 和 D'Anna^[7] 等用 Bio-Rex70 离子交换树脂将 H1⁰ 的两个亚部 H1₁⁰ 和 H1₂⁰ 基本分开。但从 Smith 的洗脱图看, H1₁⁰ 和 H1₂⁰ 两峰有明显的交叉。我们在丁酸钠诱导肿瘤 H1⁰ 的研究中, 建立了能将猪肝 H1⁰ 两个亚部完全分开的分辨率高的简易制备凝胶电泳方法

一、材料与方 法

1. 材料 丙烯酰胺、尿素等药物均为国产化学纯或分析纯。Bio-Gel P-100 为美国 Bio-Rad 实验室制品。猪肝富赖组蛋白 (以下称 LRH, 含 H1 和 H1⁰) 是本实验室所制。

2. 立式平板醋酸尿素聚丙烯酰胺凝胶制备电泳 电泳仪为北京科学仪器修配厂制品, 电泳槽是本所工厂制。

(1) 制胶 胶槽大小为 20×20×0.3 厘米。在两玻板间左、右, 下三边垫以 0.3cm 厚 1cm 宽的玻璃条, 间隙均涂以胶水, 夹子夹紧 4 小时, 胶水干固胶槽即成, 凝胶体系主要按 Panyim 和 Chalkey^[8] 法配制, 用前将 A、B、C 三液混合于三角瓶中 (凝胶终浓度为 12%, 尿素 2.5 M), 用水泵在充分振摇下抽气 2 分钟, 然后胶液倾入胶槽并快速将胶槽放入水深稍低于胶槽高度