

区 带 电 泳 技 术 (二)

兰州生物制品研究所生化组

二、醋酸纤维素膜电泳

醋酸纤维素是纤维素的醋酸酯,系纤维素的羟基经乙酰化而得。溶于丙酮等有机溶媒,可涂抹成均一的薄膜,即成醋酸纤维素膜。早期曾用作细菌滤膜,后用为区带电泳的介质。国内外应用醋纤膜电泳测定血浆蛋白、脂蛋白、糖蛋白、甲胎蛋白、脱氢酶等成份方面,已有很广泛的发展。电泳操作具体方法很多,大同小异,下述系我们常用的试行方法。

1. 设备和材料

电泳仪 主要由整流器及电泳室两部分组成,国产已有多种型号出售,皆可通用。我们现用 631 型整流器,系上海医药公司修配厂出品,输出电压 0—500 伏,电流 0—100 毫安。电泳室系利用内径 32 厘米的硫酸干燥器改装,缓冲液槽为 $22 \times 4 \times 5.5$ 厘米的长方形有机玻璃槽。电泳装置见图 2。

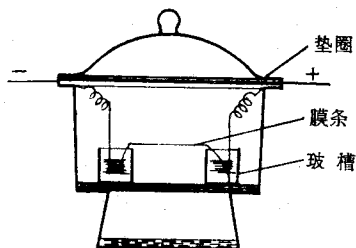


图 2 醋纤膜电泳装置示意图

光电比色计或分光光度计 常用的有国产 581-G 型光电比色计,国产 72 型分光光度计或英国 Unicam SP 500 型分光光度计。

醋酸纤维素膜制备 国内外已有商品出售。我们参照有关资料自制,方法为先将二醋酸纤维素(常用上海红旗塑料厂出品)置 100°C 烘干,称取 16 克,放入优质 500 毫升血浆瓶中,加入丙酮-水混合液(丙酮 74 毫升,无离子水 26 毫升) 200 毫升,密塞后混匀,置水浴中加热使充分溶解(一般并无爆炸危险,如为安全起见,亦可放置 56°C 水浴加热直至完全溶解),室温静置 24—48 小时以上,使杂质沉底,气泡消失后,倒在水平玻璃板上,用平直的玻璃棒,两端卷垫 3—4 层滤纸,匀速向一个水平方向涂抹,待丙酮挥发后(可装一电风扇吹膜,

促进丙酮挥发),揭取白色薄膜,以刀片切成需要规格(常用 11×2.5 厘米),夹入平滑干净的纸内压平备用。薄膜干后,厚度以 100—130 微米为宜,吸水性应在水或缓冲液中 10—15 分钟左右能全部浸透,而无白点,膜条吸水量应重于原膜条的 2—3 倍左右。

缓冲液 应根据样品,选用适宜配方。常用巴比妥-巴比妥钠缓冲液, $\text{pH} 8.6$, 离子强度 0.09, 配方如下:

巴比妥	2.76 克
巴比妥钠	15.45 克
无离子水加至	1,000 毫升

染色液、漂洗液及透明液 常选用如下配方。

染色液: 氨基黑 10B	0.25—0.5 克
甲醇	50 毫升
无离子水	40 毫升
漂洗液: 甲醇或乙醇	45 毫升
冰醋酸	5 毫升
无离子水	50 毫升

(此液用后,可加少量活性炭脱色,重复使用)

透明液: 液体石蜡	4 份
溴素	1 份

(或无水乙醇 7 份、冰醋酸 3 份)

样品 正常人血清、病人血清、体液(尿、唾液、眼房液)、脊髓液、乳、多肽、核酸或其他生物高分子物质等,均可用以进行醋纤膜电泳分析。

2. 实验方法

电泳 将膜条先置缓冲液中浸泡过夜,用前取出以滤纸吸干,在无光泽面上偏离中线左侧约 20 毫米处,用刻度毛细管(可用 0.1 或 0.2 毫升刻度吸管烧制)点样(画成约为 15 毫米长的细窄垂直样品线),一般 5—7% 蛋白浓度点样 4—6 微升,平悬于两缓冲液槽之间,两槽内壁相距约 70 毫米,膜端可用 4 层滤纸衬垫,密盖电泳室,平衡 10 分钟后通电。电泳时,采用铂金丝电极,控制电流强度 0.7—0.8 毫安/厘米膜宽,电泳 1.5—2.0 小时,使全血清区带展开约为 35—45 厘米。

比色 电泳后,取出膜条置染色液中染色 30—60 分钟(注意染色后白蛋白区带不应有色淡空心现象),移置漂洗液中漂洗数次至无蛋白区的底色脱净为止,即呈色带清晰的电泳图谱。定量时,取出膜条,以滤纸压平

吸干,分段剪开,置试管中用0.4N氢氧化钠4—8毫升(淡色带4毫升,浓色带8毫升)浸泡洗释30—60分钟(或置37℃水浴泡10—15分钟,但要注意不得褪色),同样剪取相同大小的无色带膜条,进行洗释,作为空白管,通过620毫微米波长(或绿色滤光片)、光径1厘米进行比色定量。如洗释液有混浊或沉淀,须经4,000转/分钟离心后,取上清液比色。结果按下式计算:

某种蛋白% = $\frac{\text{某种蛋白的光密度读数}}{\text{样品中各种蛋白光密度读数总和}} \times 100$

上式中浓色带蛋白的光密度读数,应乘以稀释倍数。如需要将图谱直接洗相保存,或直接以分光光度计扫描定量,可将干燥的膜电泳图谱,放入透明液中浸泡数分钟,取出贴于玻璃板上,干后即成为透明的薄膜图谱,可以直接洗相或扫描。

3. 应用实验示例

例1. 正常人血清、正常人血浆及提纯的人血清丙种球蛋白、白蛋白的醋纤膜电泳,结果见图3。

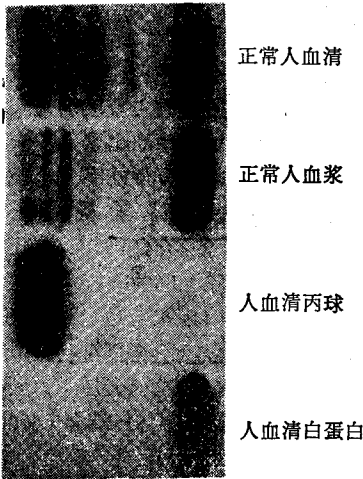


图3 正常人血清、血浆和丙球、白蛋白的醋纤膜电泳

例2. 骨髓瘤、肝癌、肝硬化、红斑狼疮等病人血清的醋纤膜电泳,结果见图4。

例3. 正常人血清(随机抽样)的醋纤膜电泳和常规的纸电泳结果比较,见表1。

4. 讨论

图3及图4结果表明,醋纤膜电泳图谱清晰、区分分明,无拖尾现象。在上述实验条件下,正常人血清(浆)分出6—7个组份,即前白蛋白(微量)、白蛋白、α₁、α₂、β(或β₁、β₂)、(F)及γ球蛋白,如果加大电场强度,还可以分出更多的组份。病人血清图谱中出现异常现象,其中骨髓瘤患者γ球蛋白明显降低,β球蛋白明显增高;肝癌(?)患者血清虽经琼脂免疫扩散试验阳性,γ球蛋白降低,但AFP(甲胎蛋白)成份未见;肝硬化及红斑狼疮患者的γ球蛋白增高,白蛋白降

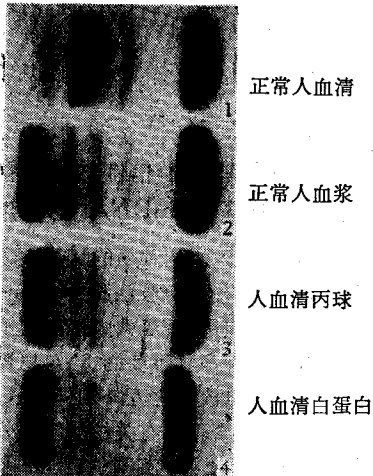


图4 几例病人血清的醋纤膜电泳

- 1. 骨髓瘤患者血清(γ球蛋白降低,β球蛋白增高)
- 2. 肝癌患者血清(免疫扩散阳性,γ球蛋白降低,AFP未见)
- 3. 肝硬化患者血清(γ球蛋白增高,白蛋白降低)
- 4. 红斑狼疮患者血清(γ球蛋白增高,白蛋白降低)

表1 正常人血清醋纤膜电泳和滤纸电泳结果比较

电泳结果 样品号	白蛋白		球 蛋 白 %							
	%		α ₁		α ₂		β		γ	
	膜	纸	膜	纸	膜	纸	膜	纸	膜	纸
01	65.8	56.1	4.1	6.2	9.5	9.7	7.6	10.8	13.0	17.2
02	72.5	62.2	2.6	3.9	5.4	7.7	8.1	11.6	11.4	14.6
03	63.7	54.5	4.2	6.0	7.6	9.0	8.6	11.4	15.9	19.1
04	72.8	60.4	2.4	4.4	5.1	8.2	7.2	10.8	12.5	16.2
05	66.1	52.3	2.9	4.4	6.9	9.4	8.0	13.9	16.1	20.0
平均	68.2	57.1	3.2	5.0	6.9	8.8	7.9	11.7	13.8	17.4

低。

由定量实验结果(表1)表明,正常人血清的膜电泳与常规的纸电泳相比,有所差异,前者白蛋白结果偏高,各种球蛋白结果都偏低,后者相反。这与有关资料报告一致。我们认为,由于醋纤膜的杂质少、纯度高,无纤维,电渗作用小,几乎无吸附现象,并具有一定的分子筛效应,所以分离图谱清晰,分辨能力较强,其结果更能反映样品的真实情况,更有利于临床诊断分析。

关于醋纤膜电泳的实验条件,有关资料已有论述,据我们实践体会,初步认为:

(1) 制膜要求 制膜原料纯净,膜条质地均匀,厚薄适宜,吸水性良好。采用国产原料,进行手工制膜,尚为简便,使用结果也很满意。

(2) 点样量 点样过多,分离图谱不够清晰,染色比较费时;点样过少,分离量微少的成份,比色读数偏低,可能引起误差偏高。(下转第45页)

膜和网状型滤膜之间在收集效率上的差别。

酶活性测定

凡与大分子合成有关的酶都可以用标记底物来测定酶活性,即测量其渗入后在酸或有机溶剂中呈不溶性物质中的放射性。这些反应可以加入沉淀剂停止反应,在滤膜上收集沉淀,洗去未渗入的底物后滤膜用去计数。

降解大分子的酶也可以用膜滤技术。例如核酸内切酶用一般的酸沉淀法是不满意的,因为较大分子的寡核苷酸也会随着不溶性底物一起沉淀出来,为了精确测定内切酶活性,停止了酸反应的样品用 S. S 厂生产的硝酸纤维滤膜 A 型过滤,大分子滞留在滤膜上,而寡核苷酸不滞留在滤膜上。

在原则上,凡能把一种放射性前体转移或渗入到一种能选择性沉淀形式的酶的,就都能用膜滤技术测定活性。

转移研究

由大体积培养液中迅速分离细胞和细胞器的方法,使人们能够对小分子的摄取进行精确的动力学研究。Winkler 等人在线粒体内的核苷酸转移研究中比较了微孔滤膜过滤法和经典的离心法。他们发现最初的摄取非常快,在 6 秒钟内已达 50%,这一结果和以前用离心法研究的结果不同。作者认为:以前的工作者得出较大半衰期的结论是由于离心法研究这类快速反应不够精确所引起的。

另一些应用膜滤技术研究小分子转移到细胞器上,包括 ^{45}Ca 转移到线粒体, ^3H -葡萄糖由大白鼠脂肪组织进入血浆膜囊,大肠杆菌的琥珀酸转移和枯草杆菌的丙氨酸转移。

应用重叠过滤法(GS 滤膜放在 SM 滤膜下面)从细胞匀浆颗粒部分快速分离细胞核液,测

定细胞内 ATP 的分布。

受体结合研究

膜滤技术也能用于测量噬菌体快速吸附到细菌上去。吸附到细菌上的标记噬菌体完全被滞留,而没有附加上的噬菌体完全通过滤膜。

Cuatrecasas 研究了 ^{125}I -胰岛素结合到肝或脂肪组织的细胞受体上。用 C-型滤膜过滤,膜滤前用聚乙二醇选择性沉淀可溶性受体-胰岛素,测定了细胞中受体数目和胰岛素-受体相互反应的解离常数。

放射性示踪物的超净

放射性示踪物在贮存过程中可能产生放射自分解产物和其他放射性杂质,它们可能被滤膜滞留和吸附在沉淀上,这样会引起高空白。如果用微孔滤膜预滤,常常可以除去潜在的干扰物质。例如 RNA 聚合酶测定中用的 ^{14}C -ATP,由于存在放射性分解产物,它和 RNA 共沉淀给出空白对照计数可高达 6300 cpm,当 ^{14}C -ATP 溶液在使用前用微孔滤膜预滤,则空白下降到 200—300 cpm。对于超净目的专门有一套微量膜滤设备,即在同位素取样的注射器和针头之间有一圆盘状膜滤装置,常用的滤膜为 0.22 或 0.45 微米。

以上介绍了微孔滤膜的一些性质和讨论了在液闪测定中的一些技术性问题。在具体应用中,结合测定方面是根据滤膜的结合蛋白质和结合核酸的性质,在沉淀收集是根据滤膜的孔径大小,这二种应用中的依据是不相同的。一些滤膜的试制和生产,为我们提供了很好的条件,将促进这项技术在科研工作中发挥一定的作用。

[本文于 1977 年 6 月 8 日收到]

(上接第 47 页)

(3) 缓冲液的选择与要求 常用巴比妥缓冲液或硼酸缓冲液, pH 8.6, 离子强度 0.06—0.09。

(4) 染色液的选择 据有关资料报道和我们的实践,溴酚蓝、氨基黑 10B 和偶氮胭脂红等染色剂,对血清白蛋白的结合力都要高于球蛋白,所以有的主张将电泳结果分别乘以校正系数,但并未得到普遍采用。

在膜电泳中,一般都乐于选用氨基黑 10B,因其着色力强,亦较稳定。

此外,将醋酸纤维膜电泳与免疫扩散技术相结合,亦可进行免疫电泳,其原理与琼脂免疫电泳相同,不过是以醋酸纤维膜代替琼脂胶板,以浸入样品的膜条代替抗体扩散槽,这种方法操作比较简便。(未完待续)