

讲 座

区 带 电 泳 技 术 (三)

兰州生物制品研究所生化组

三、淀粉凝胶电泳

淀粉凝胶电泳,是将大分子淀粉,经过适度水解,制成凝胶作为介质,进行区带电泳,常用于血浆蛋白质、酶、或经过酶解的分子较小的蛋白质等的离析。这种方法免去了琼脂电泳和淀粉电泳的电渗强、分辨率低等缺点。目前对 Smithies 淀粉凝胶电泳法已有不少修改,我们参照有关资料进行试用的方法如下:

1、设备和材料

电泳仪 国产不同型号均可通用。我们常用国产 DY-1 型电泳仪,系上海医用电子仪器厂出品,输出电压 0—600 伏,电流 0—400 毫安。电泳室系利用国产 DY-9 型电泳仪配件,亦可用有机玻璃自行粘制。自制电泳槽为两个长方形有机玻璃槽,各槽容积为 $24 \times 6 \times 6$ 厘米,槽中具一隔离板,板上具有一个直径 4 毫米的小圆孔,外槽装置电极。两内槽相距 20 厘米,以有机玻璃板粘联,供放置凝胶电泳板之用。附有电泳槽盖。电泳装置见图 5。

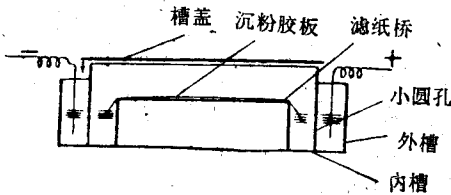


图 5 淀粉凝胶电泳装置示意图

淀粉胶制备 取马铃薯淀粉(生物试剂或实验试剂) 100 克;水解液(丙酮 200 毫升及浓盐酸 1 毫升的混合液) 200 毫升,分别置 37°C 平衡 1 小时后,混合摇匀,置 $37-38^\circ\text{C}$ 水浴中水解 1.5—2.5 小时,每隔 15 分钟摇匀一次。到时间后,立即加入 1M 醋酸钠 50 毫升,停止水解,倒入布氏漏斗抽滤,并用过量无离子水洗滤,至无醋酸钠及盐酸为止,最后用少量丙酮冲洗脱水,放置 $37-45^\circ\text{C}$ 干燥后备用。

缓冲液制备 根据样品,采用不同的缓冲系统。电泳槽及胶层所用者亦往往不同,控制不连续系统。

(1) 甘氨酸-硼酸缓冲液 常用于血浆白蛋白、球蛋白、纤维蛋白原等较大分子物质的分离。

槽内用: 0.3M 硼酸-0.6M 氢氧化钠, pH 8.8, 离

子强度 0.3

硼酸 18.5 克
1N 氢氧化钠 约 60 毫升(调至最终 pH 8.8)
无离子水 加至 1,000 毫升
胶层用: 0.035M 甘氨酸缓冲液, pH 8.8。
甘氨酸 2.6 克
1N 氢氧化钠 适量(调至最终 pH 8.8)
无离子水 加至 1,000 毫升

(2) 甲酸缓冲液 常用于较小分子的蛋白类样品的分离。

槽内用: 0.4M 甲酸缓冲液, pH 3.2—3.4。
85% 甲酸 21.6 毫升
1N 氢氧化钠 约 160 毫升
无离子水 加至 1,000 毫升
胶层用: 0.05M 甲酸缓冲液, pH 2.3—3.0。
85% 甲酸 2.7 毫升
1N 氢氧化钠 约 10 毫升
无离子水 1,000 毫升

染色液
氨基黑 10B 0.5 克
1M 醋酸 250 毫升
0.1M 醋酸钠 250 毫升
漂洗液
冰醋酸 2—5 毫升
无离子水 加至 100 毫升

制胶膜及托胶板 制胶膜框系用 2.5 毫米厚的有机玻璃粘制。常用大小两种规格,长方形,内径分别为 $17 \times 9.5 \times 1$ 厘米及 $10 \times 4.5 \times 1$ 厘米,在框底对称位置挖两个直径为 1.5 厘米的圆洞,以备顶出胶板、切平胶片之用。托胶板按上述模框内径大小裁制长方形玻璃板若干块。

2、实验方法

胶板制备 取干燥水解淀粉 14—16 克,尿素 10—15 克,胶层用缓冲液 100 毫升,混合放入三角烧瓶中加热,边加热边旋摇升温至 90°C 后,淀粉溶解呈粘性透明稀液,并出现有小气泡,再用力旋摇,继续加热稍许后,抽气减压,消除气泡。将此凝胶溶液立即倾入上述的制胶模框中(框底预先垫好一块托胶板),使与

模框的边界水平(如加过量,可在冷凝后以金属丝锯平),冷凝后使用。胶层厚0.6—0.7厘米。

加样 用30×4毫米的薄金属片(铝片或剃刀片),在胶板偏左边,沿一垂直线上插割加样缝4—8个,各缝相距6—8毫米,再取4×12毫米的滤纸片对折,蘸上样品(5%蛋白浓度),用镊子插入加样缝内,轻轻压平缝口,以滤纸吸干过多的样品。

电泳 将已加样的凝胶板,放置电泳槽之间,两端搭上3—5层滤纸作为电桥,胶面盖上一层蜡纸保持水份,槽内分别加入等量缓冲液300—400毫升,插入铂金丝电极,联接整流器,即可通电。控制电势梯度5—6伏/厘米板长,电流强度2.0—2.2毫安/厘米板宽,电

泳时间3—5小时。

显色 电泳完毕后,取出胶板,用刀片沿模框四边内壁切开,通过框底圆洞顶出胶板,另垫入一块托胶板,再放入电泳胶板,用细金属丝(可制成弓形小锯)沿框边水平切去最上胶层,同法切取中间胶层,放置染色液中浸染15—30分钟后,移入漂洗液中多次漂洗,直至无蛋白区的底色脱净为止,即呈色带清晰的电泳图谱。此图谱可泡在5%醋酸中保存,或摄影洗相保存。

3、应用实验示例

正常人血清、正常人血浆、红斑狼疮患者血清、肝硬化患者血清以及提纯的人血清丙种球蛋白和白蛋白的淀粉胶电泳,结果见图6。

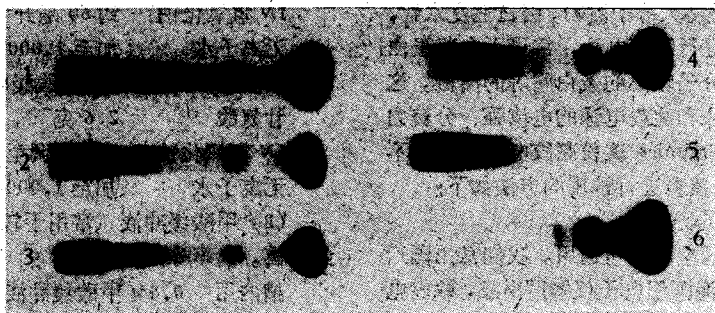


图6 几种血清蛋白的淀粉胶电泳

1. 正常人血清 2. 红斑狼疮病人血清 3. 肝硬化病人血清 4. 正常人血清 5. 人血清丙种球蛋白 6. 人血清白蛋白

4、讨论

实验结果(图6)表明,淀粉胶电泳图谱清晰,区带分明,电渗作用小,几乎无拖尾现象。在上述实验条件下,正常人血清及人血浆可分出11—12个组份,可见有较高的分辨力。除前白蛋白(微量)、白蛋白及丙种球蛋白区带较易辨认外,其余各区带如何明确划分及命名,尚需进一步研讨。和正常人血清图谱相比,红斑狼疮及肝硬化患者血清中出现丙种增高、白蛋白减

少的异常现象。白蛋白纯品在图谱中出现有多个区带,可能代表分子大小不同的单体和聚集体或其他杂质;丙种图谱中的几个区带,可能代表IgG, IgA, IgM等不同的免疫球蛋白成份以及残存的其他蛋白成份。

一般认为,淀粉胶电泳有分子筛效应,有利于分析较小分子的蛋白类物质,而对于某些较大分子蛋白类物质的离析,则不够理想。(待续)

科技消息

病毒侵染细胞的转化过程

正常细胞怎样转变成癌细胞是当前最重要的研究课题之一。最近从路氏肉瘤病毒侵染鸡胚成纤维细胞转化过程中得到一些启示。路氏肉瘤病毒含有一种可以引起鸡肉瘤的病毒基因。扫描电镜的观察表明,被侵染的细胞在移到许可温度下以后,细胞表面的变化可以分为三个阶段:①1至3小时。这时在该区可以看到游离的细胞膜直接向上突起,形成独特的花状卷边。细胞形状一般仍保持正常。②3至12小时。在此期间,细胞的长突向核区牵缩,细胞周围留下许多牵缩丝,核区隆起,细胞表面出现许多微绒毛。细胞边缘的牵缩往往导致长突的脱落或消失,最终失去正常成

纤维细胞外形原有的不对称性,而变成纺锤状,并在表面上出现许多微刺和牵缩丝。③12至24小时。在此期间,细胞逐渐变成圆球状,表面覆盖着小泡,第二个阶段所见的牵缩丝和微绒毛显著减少。在高倍放大下,可以看到成熟的病毒从细胞表面以及微绒毛和牵缩丝表面上芽生出来。在细胞表面上显然找不到病毒优先成熟的部位。偶然还可看到细胞膜有类似于第一阶段看到的卷边现象。

变化的确切原因和意义尚不清楚。据认为或许是由于转化细胞中某些病毒基因产物的影响,尤其可能是基因合成的某些蛋白质直接或间接作用于膜下肌动蛋白微丝束,造成微丝束组成和构型的紊乱,从而改变了细胞的外形。而一旦外形改变,就不再能进行正常的分裂或与邻近的细胞相互作用了。