

图3 免疫双扩散
1% Agar; 上面小孔加抗豚鼠和抗猪白蛋白血清的混合物; 在左小孔内加猪白蛋白; 右小孔内加豚鼠白蛋白

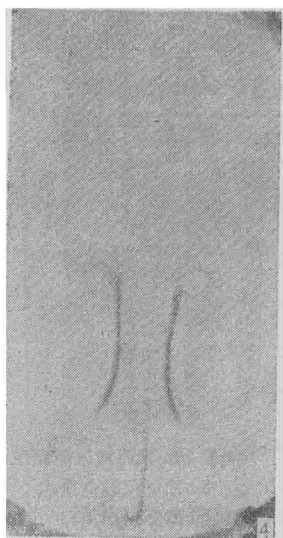


图4 免疫电泳
1% Agar; 小孔中加稀释二倍的抗豚鼠白蛋白血清; 中间槽加豚鼠白蛋白

免疫电泳被认为是鉴别抗原纯度的一种理想方法。我们的免疫电泳图上只出现单沉淀带, 可以认为用辛酸钠-PEG 法纯化的白蛋白纯度较高。

从 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳中测得的豚鼠和猪血清白蛋白的分子量和牛血清白蛋白的分子量相当, 为 65,000 左右。

用辛酸钠-聚乙二醇法从 100 毫升血清中可得到 1.5 克白蛋白的纯品。

整个纯化过程的关键是去球蛋白。加入辛酸钠到 0.01M 后, 加热时溶液的 pH 要严格控制在 6.0—6.5 之间; 如果 pH 高于 7.0, 球蛋白沉淀就不完全, 或者形成透明乳状溶液, 即使放置过夜也不会有蛋白沉淀出现。遇此情况, 可以用 0.5N 盐酸把 pH 再调回到 6.0—6.5 之间, 重新加热, 仍可以达到去除球蛋白的目的。pH 过低, 也降低白蛋白的回收量。

有人报道用 9% 的乙醇^[4]在加热时有助于球蛋白的沉淀。在我们的实验条件下用 5% 乙醇, 即可以较完全地沉淀球蛋白。

为了分开白蛋白和球蛋白, 采用聚乙二醇选择性沉淀法, 需严格控制 pH 和 PEG 浓度。在本实验中, 由于球蛋白已在辛酸钠-加热一步除去, 所以只要加足 PEG 的量, 使白蛋白完全沉淀下来即可。我们选择 22% 的 PEG 是足量的。在 PEG 沉淀白蛋白的时候把 pH 保持在 4—5 之间是可取的。

辛酸钠-聚乙二醇法的操作简单, 效果较好, 尤其适用于实验室少量制备。

参 考 文 献

- [1] Polson, A. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **82**, 463, 1964.
- [2] Chesebore, B. et al.: *Clin. Chim. Acta*, **20**, 527, 1968.
- [3] Gambal, D.: *Biochim. Biophys. Acta*, **251**, 54, 1971.
- [4] Waldemar Schneider, et al., *Blut, Band*, **30**, Seite 121, 1975.

[本文于 1979 年 11 月 26 日收到]

一种无桥的水平板型凝胶电泳

曲善乐 劳为德 陈受宜

(中国科学院生物物理研究所)

凝胶电泳是研究核酸、蛋白质等生物大分子的一项重要技术, 也是 DNA 的限制性核酸内切酶切割片段的分析、分离、纯化的一种不可缺少的方法。虽然垂直(管柱型及板型)凝胶电泳早已被广泛应用, 但它不能用低浓度琼脂糖凝胶分离大分子 DNA。水平板型凝胶

则可弥补这个缺点。

早期的水平板型凝胶电泳, 凝胶两端是通过纸桥与两边槽中的电泳缓冲液相连接^[1, 2]。近年有人以胶桥代替纸桥, 即在电泳胶的两端各接一段垂直凝胶(胶桥)与电泳缓冲液相接^[3]。胶桥水平板型凝胶电泳采

用低浓度琼脂糖凝胶, 不仅可分离大分子 DNA, 还可用以测定分子量^[4,5]。

我们在研究 DNA 的限制性核酸内切酶切割片段的过程中, 对水平板型凝胶电泳作了一改进, 建立了一种简便的无桥水平板型凝胶电泳方法。

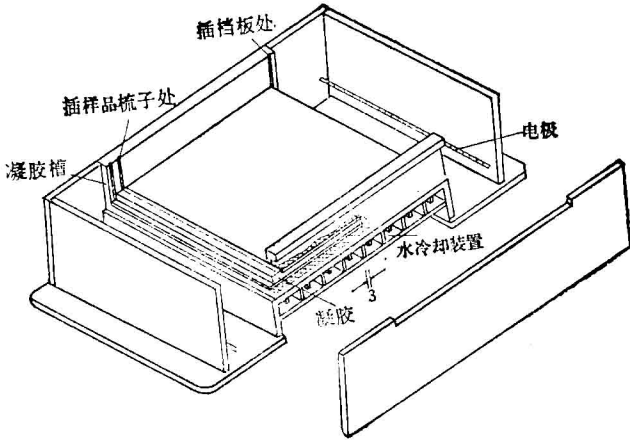


图1 无桥水平板型凝胶电泳装置
除标明者外, 所用有机玻璃厚度均为 6 毫米

方 法

这种简便的无桥水平板型凝胶电泳仪, 构造比较简单, 易于制作。其构造如图 1。全部装置用有机玻璃板粘合而成, 分基部(包括电泳缓冲液槽及水冷却装置)和凝胶槽两部分。整个仪器底部有调水平用的旋钮。水冷却装置采用回形管道式, 由若干塑料板条粘合于两块塑料板间而成。

制胶时, 先将玻璃板放于凝胶槽底板上, 在玻璃板上紧靠槽两边各放一根直径为所需凝胶厚度的玻璃棒(作分析电泳时, 凝胶厚度约 3 毫米), 再放上顶部玻璃板, 然后将制胶档板插在凝胶槽两端, 这样便构成了凝胶模子。为了防止铺胶时漏胶, 可先用吸管取少量电泳胶封严, 电泳胶从插放梳子处灌入凝胶模子中。如果电泳胶与顶部玻璃板间有气泡, 可将玻璃板一端掀起, 再徐徐放下, 即可将气泡赶出。加胶后, 插上样品梳子打开水冷却装置, 冷却半小时, 加样。

凝胶模子底部玻璃板也可用凝胶槽底板代替。但采用底部玻璃板, (电泳胶铺于玻璃板上) 取出观察, 照相方便, 而且一俟电泳完毕, 将载有凝胶的玻璃板取出, 电泳槽即可进行下次电泳。此外, 琼脂糖胶是在 65℃ 铺胶, 若直接加到电泳槽底部有机

玻璃板上, 易使有机玻璃板变形。

加样时先将样品梳子轻轻取出, 用微量进样器将样品注入样品池中。边缘样品池中加溴酚兰作为电泳标志。加样后, 于两端缓冲液槽中加电泳缓冲液至适当高度, 然后轻轻取出制胶档板, 盖上电泳仪盖板(图中未绘出)开始电泳。冷却装置的水温保持在 5—20℃。电泳完毕, 取出凝胶槽, 揭去顶部玻璃板, 将承载凝胶的玻璃板推出。如果铺胶前胶中已加溴乙啶(0.5 微克/毫升), 即可于长波紫外光下进行观察及照相; 否则, 须先于溴乙啶溶液(0.5 微克/毫升)中浸染半小时。照相时加橙色滤光片(GG11)。

当用较厚凝胶作制备电泳或用更高电压电泳时, 可在凝胶顶部玻璃板上再放一个水冷却装置, 这样会大大提高冷却效率。

一般水平板型凝胶电泳仪也同样可采用上述无桥电泳方法。

结果与讨论

应用上述无桥水平板型凝胶电泳, 分析 λ 噬菌体及动物线粒体 DNA 的限制性内切酶片

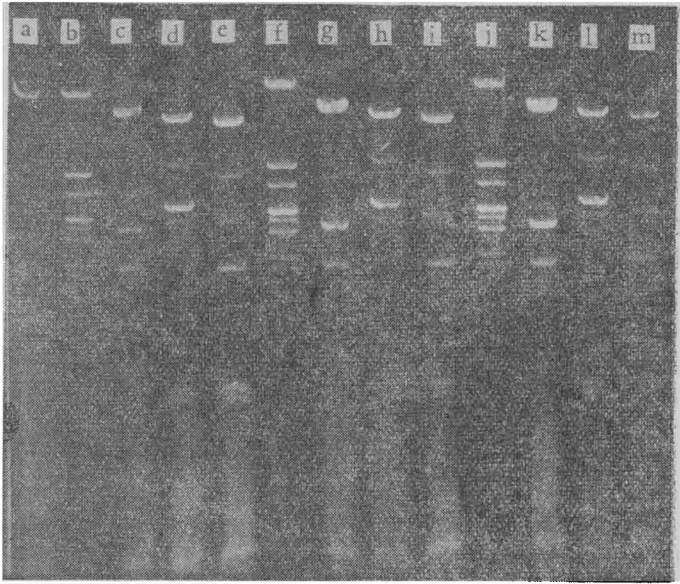


图2 羊肝线粒体 DNA 限制性内切酶水解片段的电泳分析
分子量: 10⁶—10⁷ 道尔顿
电泳条件: 0.7% 琼脂糖凝胶 (160×140×3 毫米) Tris-硼酸缓冲液 pH8.3、140V、40mA、3.5 小时
a: 羊肝线粒体环状 DNA。
b, f, j: λ DNA 的 Eco RI 和 Bam HI 双酶水解片段。
c, g, k: 羊肝线粒体 DNA 的 Eco RI 水解片段。
d, h, l: 羊肝线粒体 DNA 的 Bam HI 部分水解片段。
e, i, m: 羊肝线粒体 DNA 的 Eco RI 和 Bam HI 的部分水解片段。

段,用厚度为3毫米的0.5—0.7%琼脂糖凝胶无论于较低电压或于10伏/厘米的较高电压均得到较好结果(图2)。

胶桥水平板型凝胶电泳,一般于较低电压(5伏/厘米)进行电泳,用较高电压结果往往欠佳。这主要是由于暴露的凝胶表面水分蒸发所致。无桥水平凝胶电泳(是在两个平板之间成胶并进行电泳)解决了凝胶表面水分蒸发问题,此外它缩短了凝胶长度,简化了电泳装置的构造及实际操作。

参 考 文 献

- [1] Bartlett, R. C.: *Clin Chem.*, 9, 317, 1963.
- [2] Hoppe H. H. et al.: *Humangenetik*, 14, 224, 1972.
- [3] Kaplan, D. et al.: *Anal. Biochem.*, 78, 235, 1977.
- [4] Kaplan, D. et al.: *ICN-UCLN Symposium on Molecular and Cellular Biology*, Vol. 8, (Eds. Wilcox, G. et al.), Academic Press, p. 103, 1977.

[本文于1979年10月19日收到]

茶叶中咖啡碱的快速测定法

聂洪勇 僮稚新 董健纯

(长沙药品检验局)

咖啡碱是茶叶中主要成分之一,测定方法较多,但各有不足之处。我们通过反复比较、试验,提出一种简便快速的氧化镁浸提-紫外分光光度法,现将测定方法介绍如下:

(1) 咖啡碱标准液: 无水咖啡碱(卫生部药检所),熔点 237℃,配制成20微克/毫升水液,在岛津LLV-200型双光束分光光度计上测定273nm处吸收值— A_0 。

(2) 茶叶中咖啡碱测定: 茶叶0.5000克(过20目)加入氧化镁(分析纯)5克,蒸馏水40毫升,搅匀;微热20分钟,冷却后转入100毫升容量瓶中,加水至刻度后,再加蒸馏水20毫升;摇匀;过滤,取滤液5毫升于50毫升容量瓶中,加入硫酸:水(1:3)1滴,加水

至刻度以蒸馏水为参比测273nm处的吸收值— A ,茶叶中咖啡碱含量计算如下:

$$\text{咖啡碱} = \frac{(A - 0.050) \times C_0}{0.952 \times C \times A_0} \times 100\%$$

C : 测试液浓度;

C_0 : 标准液浓度;0.952,0.050为校正值

(3) 测定结果 用此法测定红茶、绿茶、乌龙茶中咖啡碱的含量并与AOAC-紫外法比较,其结果基本一致,标准偏差为0.055,平均回收率达95.2%。

此法操作简便、快速,消耗试剂少,测定结果准确,重现性好,实为一种简便可行的测定咖啡碱方法。

[本文于1980年5月15日收到]

光学衍射技术分析生物样品的电镜照片

管汀鹭 惠虎雄

(中国科学院生物物理研究所)

光学衍射技术在当前已成为生物电子显微术中一个重要的组成部分,它不仅是高分辨率电镜工作所不可缺少的手段,而且还可以用来帮助处理电镜照片,分析样品的结构。

我们利用自己改装的光学衍射仪^[1]观察分析了一些生物样品,充分显示了这种技术的优点。下面举例说明:

一、测量间距简便而准确

牛肝过氧化氢酶是一种含血红素的蛋白,分子量为250,000,它催化过氧化氢分解成水和氧。由于它的辐射抗性较强,较易长成大晶体。已对它进行了较彻底的研究,现在已成为一种标准样品。已知晶格间距为84.4埃,晶格线上点间距为33.9埃($\text{\AA}$)^[2]或