

聚丙烯酰胺凝胶电泳方法的一些改进

潘 苏 华

(华南热带作物产品加工设计研究所, 湛江)

聚丙烯酰胺凝胶电泳测定蛋白质时所使用的“高 pH 系统”的电极缓冲液, 通常是 Glycine-Tris 缓冲液。这两种试剂比较贵, 虽然可以重复使用, 但消耗量大, 不利于普及。此外凝胶的常规染色和脱色需要较长的时间。作者在研究天然橡胶蛋白质的分离分析时, 对这些方法作了一些改进: 使用“改进高 pH 系统”的电极缓冲液——硼酸、NaOH 缓冲液、改进分离凝胶的制备, 并采用了快速染色和脱色, 缩短了试验的时间。本法应用于人血清蛋白的测定, 亦得到满意的结果。

材料与 方法

1. 天然橡胶的蛋白质 新鲜天然胶乳用 2% 醋酸凝固 (5:1V/V), 用压榨的方法取出天然橡胶乳清 (乳清相当于人血清), 可溶性蛋白质存在于乳清中。

2. 正常人血清 湛江医学院附属医院提供。

3. 仪器与药品:

盘状电泳, 玻管内径 ϕ 4—5 毫米; 长 10 厘米。

丙烯酰胺 (L. R.); 亚甲基双丙烯酰胺 (98% Belgium 制造); TEMED (进口试剂); Glycine (C. P.); Tris (C. P.); 考马斯亮蓝, R-250 (L. R.); 其余为 A. R.

4. 试验方法:

(1) 不连续电泳凝胶系统:

“改进高 pH 系统”:

分离凝胶(中性 pH 系统)的制备: (pH 7.5 T = 8.8%) 将溶液 A (100 毫升溶液中含 1 N HCl 24 毫升; Tris 3.5 克; TEMED 0.3 毫升); 溶液 B (100 毫升溶液中含丙烯酰胺 30 克; 亚甲基双丙烯酰胺 0.8 克); 溶液 C (100 毫升溶液中含过硫酸铵 0.1 克)。按 1:1:1.5 比例混合

电极缓冲溶液的制备: (pH 9.3) 将硼酸 3 克; 氢氧化钠 1.5 克配成 1000 毫升贮备液, 使用时, 取 1 份用 4 份蒸馏水稀释。

“中性 pH 系统”:

分离凝胶 (pH 7.5 T = 7.5%); 电极缓冲液 (pH 7.0), 均按文献[1]配制。

“高 pH 系统”:

分离凝胶 (pH 8.9, T = 7.5%); 电极缓冲液 (pH 8.3), 均按文献[1]配制

(2) 电泳

在室温下进行, 电流强度 3—5 毫安/管, 样品为橡胶乳清 100 微升; 人血清 5 微升。分别在不同体系中

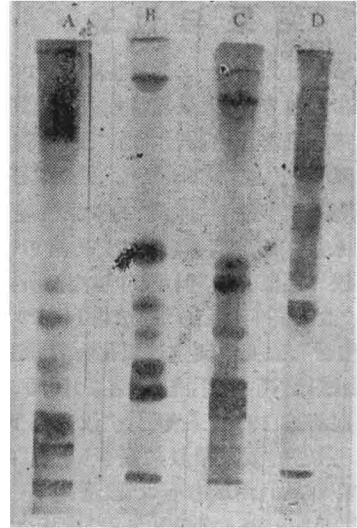


图 1 橡胶乳清蛋白质在不同盘状电泳凝胶系统的图谱 A“改进高 pH 系统”, B“高 pH 系统” C“高 pH 系统”的电泳凝胶, “改进高 pH 系统”的电极缓冲液 D“中性 pH 系统”。

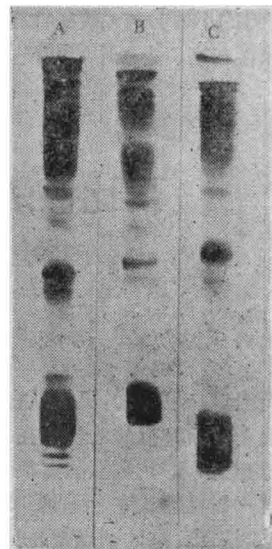


图 2 人血清蛋白质在不同盘状电泳凝胶系统的图谱 A“改进高 pH 系统” B“高 pH 系统” C“中性 pH 系统”

进行电泳。

(3) 快速染色与脱色:

染色: 凝胶条在 10% 三氯乙酸中固定 10 分钟, 放入 1% 考马斯蓝 R-250 (9% 乙酸 + 45% 甲醇) 溶液中加热煮沸, 再在 80℃ 左右保温 20 分钟即成(染色液可重复使用)。过氧化物酶同工酶的染色可按文献[2]进行。

脱色: 染色后的凝胶条在 90℃ 左右的热水中浸泡, 经常换水, 约 2 小时, 脱色完毕。脱色后的凝胶条可保存在 7% 醋酸中。

结果与讨论

1. 测定结果见图 1—3 及其说明, 图 1 与 2 均采用快速染色和脱色方法, 效果与常规方法相同。

2. 测定橡胶乳清蛋白质时, 用“改进高 pH 系统”比用“中性 pH 系统”和“高 pH 系统”的效果好, 图谱较清晰, 谱带稍多。“中性 pH 系统”的效果最差(图 1)。使用“高 pH 系统”的分离凝胶和“改进高 pH 系统”的电极缓冲溶液(硼酸、NaOH 缓冲溶液)所得的结果(图 1C)与“改进高 pH 系统”的结果(图 1A)基本相同, 但个别谱带有改变。测定过氧化物酶同工酶, “改进高 pH 系统”比“高 pH 系统”的结果好(图 3)。

测定人血清蛋白的结果表明, “改进高 pH 系统”与“中性 pH 系统”的效果相似, “高 pH 系统”的效果最差(图 2)。在样品的用量方面, “改进高 pH 系统”为 5—7 微升, “中性 pH 系统”则为 5—15 微升。

3. 本法省去“浓缩凝胶”以及在样品中加入蔗糖溶液这两个步骤, 对试验结果没有影响。

4. 过硫酸铵是凝胶聚合的催化剂, 它的质量对凝胶的聚合有很大的影响, 为保证过硫酸铵不变质, 在开瓶后, 立即用密封的小瓶分装(最好抽真空)。配成的过硫酸铵溶液保存在磨口小瓶中, 即使是在南方夏季

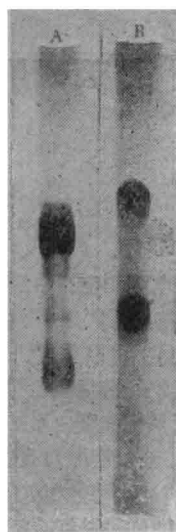


图 3 橡胶乳清过氧化物酶同工酶在不同盘状电泳凝胶系统的图谱

A“改进高 pH 系统” B“高 pH 系统”

的室温条件下, 使用一个月仍不变质。

5. 用热水脱色, 时间不能过久, 否则部分谱带消失。由于盘状(或板状)电泳条件不同, 染色及脱色时间要根据实际情况决定。

硼酸-NaOH 电极缓冲液的药品来源容易, 用量不大, 故一般不连续使用。本试验方法也适合于板状电泳。

参 考 文 献

- [1] 莽克强等: 《聚丙烯酰胺凝胶电泳》, 科学出版社, p. 32, 1975。
- [2] 阎炳宗等: 《实验生物学报》, Vol. 16 (2), p. 113, 1983。

[本文于 1984 年 5 月 7 日收到]

用比色法测定血液中抗坏血酸含量

司 世 麟

(河北省科学院生物所, 石家庄)

人不能自身合成抗坏血酸, 只能从食物中摄取, 所以测定体内或食物中抗坏血酸的含量在临床和营养学方面有很重要的意义^[1]。抗坏血酸有很强的还原性, 人们正是依据这一特性测量它。目前广泛采用的是 2, 6-二氯酚靛酚滴定法^[2], 它的缺点是易受其它还原物质的干扰; 常因色素类物质的存在, 给观察滴定终点造成困难; 无法直接测定血液中的抗坏血酸, 除非预先对

血液中的血红蛋白进行特殊处理。也有人用钼酸铵^[3]或 2, 4-二硝基苯肼作试剂^[4], 它们和抗坏血酸生成某种有色物质, 然后比色测定其含量, 但这些方法都较繁琐。

Folin 试剂是一种强氧化试剂, 还原型为蓝色, 在酸性条件下(pH 约等于 2), 其氧化活性降低^[4], 除了抗坏血酸一类的强还原剂外, 一般还原性物质几乎不和