

一种简单、快速、微量聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳方法

潘 苏 华 梁 舜 薇

(中山医科大学中山眼科中心眼科研究所, 广州 510060)

关键词 等电聚焦, 电泳装置, 加样模板

Bio-Rad 公司的微量聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳(Mode III Mini IEF Cell), 不需要使用电极缓冲液, 聚焦电泳时间仅用 1.5 小时, 效果甚佳, 但要使用该公司专有的凝胶支持薄膜, 难于推广应用, 我们经过试验, 建立了一种简单、快速的微量凝胶等电聚焦电泳方法, 40min 完成等电聚焦过程, 采用快速染色、脱色和干燥, 将电泳图谱制成透明的薄膜, 整个过程可以在 3 小时内完成, 电泳图谱清晰, 重复性好。用料省, 制备一块可分析 8~9 个样品的凝胶板, 只需用 50 μ l 两性电解质。设备简单, 全部使用国产试剂和材料, 可以手工自制。

材 料 与 方 法

一、电泳装置

本实验不需要电泳槽及电极缓冲液, 电泳凝胶直接与炭棒电极接触, 在一块有机玻璃(或塑料)板上固定两条电极即可作电泳装置。电极可以使用普通铅笔芯或大电池的炭棒, 接上导电线就可使用, 木工用的扁平状铅笔芯更好。两电极间的距离视实际而定, 我们使用 50mm 的距离。

二、等电聚焦凝胶的制备

1. 贮液的配制: 全部贮液用双蒸去离子水配制。

(1) 贮液 1: 取 10ml 30% 丙烯酰胺和 0.8% N, N'-甲叉双丙烯酰胺溶液(W/V, 重结晶品, 浙江黄岩人民化工厂), 加 5ml 甘油(医药用), 21g 尿素(C.P.), 最后用蒸馏水加至 45ml, 充分溶解, 室温贮存备用(一个月内使用)。

(2) 贮液 2: 1% 四甲基乙二胺(TEMED)溶液(B.R.), 浙江黄岩人民化工厂。

(3) 贮液 3: 1% 过硫酸铵(A.R.)溶液(室温贮存, 一个月内使用)。

(4) 40% 两性电解质(中科院上海生化所; 北京军事医学科学院)。

2. 制备凝胶的模板

取有机玻璃板(50 $\times$ 70 $\times$ 2mm)和同样大小的普通玻璃板各一块, 用厚度约为 0.5mm、宽度为 5mm 的有机玻璃条, 将有机玻璃板沿三条边(留空 50mm 一边)围起来, 用氯仿粘牢。制备凝胶时将普通玻璃与有

机玻璃板沿有边的一面对合, 用铁夹(日本制造)按两边夹紧, 底端(密封部分)用胶纸封紧, 竖立放好, 缺口向上。如铁夹强力不够而漏胶时, 可在三条边上涂上少量浆糊。

3. 等电聚焦凝胶板的制备

取贮液 1 1.8 ml, 加两性电解质 50 μ l, 1% TEMED 100 μ l, 1% 过硫酸铵 100 μ l, 在小烧杯内混合均匀后, 用注射器吸取并加入上述备好的模板内。10min 左右凝固, 除去铁夹及胶纸, 移去有机玻璃模板, 凝胶附着在普通玻璃板上。凝固后要及时取走有机玻璃模板, 时间过长, 凝胶会附着在有机玻璃板上。

三、加样

1. 加样模板: 涤纶薄胶片一块(50 $\times$ 60mm), 用锐利刀锋刻出 2 $\times$ 20mm 的加样槽, 槽的宽、长和距离可按具体情况而定。

2. 加样方法: 聚合好的凝胶(玻璃板)平放数分钟, 使表面水分稍为蒸发, 将加样模板平放在凝胶面上, 避免产生气泡。用微量注射器加样, 加入量视样品浓度而定, 通常 1~5 μ l, 加样后停放 5~10min, 最后小心用滤纸吸去多余样品(加样量合适时, 可免此操作), 取去加样模板(小心, 不要掀起凝胶), 即可进行电泳。

四、电泳操作

用蒸馏水将石墨电极湿润, 把加好样品的凝胶面向下, 直接与电极接触, 接通电源进行电泳(在冰箱内 0 $^{\circ}$ ~4 $^{\circ}$ C), 电泳时间: 100V 稳压 10min; 200V 稳压 10min; 460V 稳压 20min。

五、染色、脱色及干燥

电泳完毕, 取出凝胶放入 5% 三氯乙酸溶液中固定 10min, 用蒸馏水漂洗 10min, 再用热的(80 $^{\circ}$ C~90 $^{\circ}$ C)0.01% 考马斯蓝 G-250 染色液^[1]染色 15min。如有必要, 可适当延长染色时间。染色后用清水漂洗 20min 左右, 将凝胶用两张湿润的玻璃纸平铺夹紧在清洁的玻璃板上, 可以直接用热风吹干或自然干燥, 亦可用 5% 醋酸溶液浸泡保存。染色可在室温进行, 时间稍长。

结 果 与 讨 论

一、用国产及进口(LKB, Pharmacia 公司)两性电

(下转第 64 页)

表1 Anip₁₂₁₁ 和 AGZY_{83-a} 相同细胞数及每毫克蛋白质中 [³H]PI 的含量

保温时间 (h)	[³ H]PI nmol/5 × 10 ⁶ 细胞		[³ H]PI nmol/mg 蛋白质		P
	Anip ₁₂₁₁	AGZY _{83-a}	Anip ₁₂₁₁	AGZY _{83-a}	
1	0.07±0.011	0.01±0.0004	0.13±0.012	0.017±0.0009	<0.01
3	0.22±0.01	0.03±0.0056	0.39±0.012	0.057±0.0042	<0.01
5	0.37±0.015	0.04±0.006	0.67±0.00017	0.068±0.003	<0.01
7	0.49±0.031	0.07±0.0026	0.88±0.0047	0.117±0.003	<0.01

均数±标准误 (SE)

(n = 3)

切相关。转移性癌细胞的形成也需信息分子作用,但信息分子、PI 代谢和转移之间的关系还是一个谜。因此,对转移性癌细胞中 PI 代谢的研究,不仅有利于不同转移表型癌细胞的鉴别,更有助于转移机理的探讨。

实验表明, Anip₁₂₁₁ 和 AGZY_{83-a} PI 中 [³H] 肌醇的参入有明显差异。按相同细胞数 (5 × 10⁶) [³H] PI 含量计算,保温 1h,前者为后者的 7 倍。3h,前者为后者的 7.3 倍。5h,7h 分别为 9.25 倍、6.3 倍。按每毫克蛋白质 [³H] PI 含量计算,保温 1h,前者为后者的 7.6 倍。3h 为 6.8 倍。5h,7h 分别为 9.8 倍、8 倍。以上结果证实 Anip₁₂₁₁ 中 [³H] 肌醇的参入明显多于 AGZY_{83-a}。这可能是由于前者 PI 标记效应比后者表现突出,或/和前者 PI 合成酶 [CDP-1, 2-二酰基-sn-甘油: myo-肌醇 3-磷酸转移酶 (EC2. 7. 8. 11)] 活性较高所致。PI 作为 PI 代谢库^[2]中磷脂酰

肌醇 4, 5-二磷酸 (PIP₂)^[3] 的前身,两者含量保持一定平衡。因此, Anip₁₂₁₁ 为 PIP₂ 的生成提供了更丰富的资源,可以推测,高转移性癌细胞可能需要更多的 PIP₂。

综上所述,两种细胞 PI 的合成有明显的差异。此差异是两种不同转移表型肺癌细胞所具有的和信息传递密切相关的特征之一。

参 考 文 献

- 1 Nicolson G L. *Biochim Biophys Acta*, 1982; 695: 113
- 2 Whitman M. *Biochim Biophys Acta*, 1988; 948: 327
- 3 彭愈生. 细胞生物学杂志(增刊), 1988; 11

[本文于 1989 年 12 月 4 日收到,

1990 年 3 月 19 日修回]

(上接第 76 页)

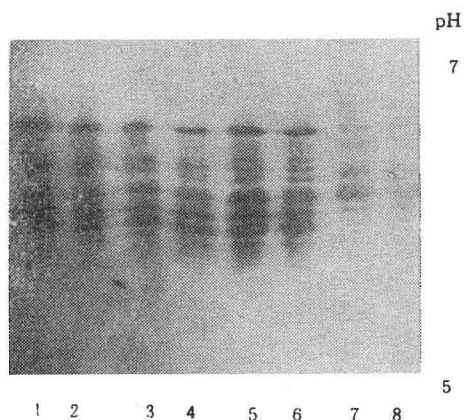


图1 人眼晶状体可溶性蛋白质等电聚焦电泳图谱

1—6 是不同处理时间的样品, 7, 8 是对照(未处理)样品

解质制成等电聚焦凝胶,测定人眼晶状体可溶性蛋白质,实验结果表明电泳图谱清晰(图1),重复性好,国产与进口试剂效果相同,不同批次的两性电解质,其电泳谱带稍有不同,但不影响结果分析。

二、配制凝胶,有些学者加入表面活性剂(Triton X-100)^[2],我们的实验结果表明,加入表面活性剂,对试验结果没有影响,但使制胶溶液很易产生气泡,所以不加表面活性剂为好。

三、染色液的微粒,一定要用滤纸滤去,否则微粒附在凝胶表面,不易洗脱。

四、凝胶等电点的测定,可用等电聚焦电泳的标准蛋白质对照,或用表面电极测定,限于条件,我们未进行此两项实验。我们将精密 pH 试纸剪成小条,电泳完毕后,将其插入凝胶的边上,按所显示的颜色记下所在位置 pH 值后,将凝胶固定染色,这样可以大概知道蛋白质的等电点。

参 考 文 献

- 1 邹辉琼,陈章林,邓水生. 生物化学与生物物理进展, 1989;16(5): 401
- 2 殷勤伟,薛社普. 细胞生物学杂志, 1989;11(2): 85

[本文于 1989 年 10 月 24 日收到,

1990 年 1 月 9 日修回]