

经验交流

一种简便经济的凝胶电泳同工酶特异染色方法*

杨 凯

尚忠林

(中国农业科学院作物品种资源研究所, 北京 100081)

(河北师范大学生物系, 石家庄 050016)

摘要 介绍一种简单、经济的同工酶染色方法: 用熔化的 0.4% 琼脂糖处理滤纸备用, 染色前将滤纸浸于同工酶染色液中, 染色时将滤纸盖在聚丙烯酰胺胶上, 然后将胶放在有盖塑料盒中保温染色, 染色时间要比普通方法略长。染色后将胶和滤纸移入固定液中用镊子除去滤纸。

关键词 凝胶电泳, 同工酶, 特异染色方法

聚丙烯酰胺凝胶电泳广泛应用于同工酶的分析研究, 具有样品需要量少, 分辨率高, 分析所用时间短等优点, 但是却需要在电泳结束后将凝胶进行特异染色, 一般的方法是将凝胶浸入特染液中保温^[1]。这对于一些底物和反应介质价格较低的同工酶如过氧化物同工酶、脂酶同工酶等的分析是十分简便有效的方法^[2], 可对于一些底物和反应介质价格昂贵的同工酶, 如甜菜碱醛脱氢酶 (BADH) 等^[3], 用这种方法成本过高。我们在进行同工酶样品分析时摸索出一种可节省特染液的方法, 具体方法如下。

先将滤纸切成比电泳梳齿宽 1 mm, 与分离胶高相等的纸条, 由于滤纸对凝胶的吸附力比较大, 所以在使用前将纸条放在熔化的 0.4% 琼脂糖中浸一下, 取出后放入一磁盘中, 于 4℃ 冰箱保存待用。使用时将滤纸条放入预先配好的特染液中 20~30 min 后, 就可用于染色。电泳结束后, 把凝胶剥下, 转移到一块比凝胶略大的干净玻璃板上, 将浸有特染液的滤纸垂直地贴在凝胶要染色的凝胶部位, 然后将载有凝胶的玻璃板转移到一个大培养皿或透明塑料盒内, 为减少水分蒸发, 可在培养皿中先加入 2~3 ml 水, 注意不能浸到玻璃板上的凝胶, 加盖后保温使培养皿或塑料盒内的水分

饱和, 由于同工酶特异染色的时间比较长, 一般需要十几分钟到数小时, 所以在染色中可打开盖子, 在滤纸上滴 1~2 滴特染液或配制特染液的缓冲溶液。染色后将载有凝胶的玻璃板转移到固定液中, 用镊子小心取下滤纸, 这时由于滤纸与聚丙烯酰胺凝胶之间有一薄层琼脂糖胶, 所以很容易取下来, 而不损伤聚丙烯酰胺凝胶。

几点说明:

1. 本方法因为使用特染液较少, 因此染色时间要适当延长一些, 而且同工酶染色后的颜色要浅一些, 但不影响观察效果。

2. 使用的滤纸要考虑到同工酶是否有特殊离子的要求, 如无特殊要求, 国产杭州新华滤纸 (化学分析纸) 就可满足要求。

3. 配制浸泡滤纸条的特异染色液时, 要尽可能考虑到滤纸和琼脂糖胶中有一定的水分, 配制的特染液比原要求略浓一些。

参 考 文 献

- 1 Harris H, Hopkinson D A. Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. New York: American Elsevier, 1974: 7~24

* 国家自然科学基金资助项目。

收稿日期: 1995-04-20, 修回日期: 1995-08-14

- 2 Market C L. Isozymes. New York: Academic Press, 1975: 1~4
- 3 Pierre W, Elizabeth A W, Andrew D H. Plant Physiol, 1986; 82: 753

A Simple, Economical and Specific Staining Method for Isozymes in PAGE. Yang Kai (Institute of Crop Germplasm Resources, Chinese Academy of Agriculture Science, Beijing 100081, China); Shang Zhonglin (Department of Biology, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China).

Abstract A simple and economical staining method for isozyme is described. Filter paper (treated with 0.4% agarose) was soaked in isozyme staining solution for half an hour and was used to stain the isozymes after PAGE, then move the gel and filter paper to a covered plastic box. The staining time would be longer than normal. After staining, put the gel and filter paper into fixing solution and remove the filter paper with tweezers carefully.

Key words isozyme, PAGE, specific staining method

比色法测定 Fenton 反应产生的羟自由基

贾之慎 邬建敏 唐孟成

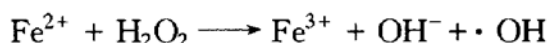
(浙江农业大学无机及分析化学教研室, 杭州 310029)

摘要 Fenton 反应产生的羟自由基能与水杨酸生成羟基化产物 2, 3-二羟基苯甲酸, 用比色法测定其含量能间接测定羟自由基的生成量。通过对测定条件的研究, 得到最佳的测定方案。可作为一种简便的筛选羟自由基清除剂的方法。

关键词 羟自由基, Fenton 反应, 比色法, 水杨酸

在生物体内, 需氧代谢的氧化还原反应所产生的羟自由基, 可以引发不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应, 并损伤膜结构及功能^[1]。羟自由基的检测对于自由基的生物作用研究有重要意义。

在研究自由基时, 反应体系可通过水的辐解、光解以及化学反应来产生羟自由基, Fenton 反应是最常见的化学反应^[2], 总反应可用下式表示:



Fenton 反应产生的羟自由基通常通过气相色谱法和电子自旋共振捕集技术测定^[3], 但因仪器昂贵、操作也较复杂, 一般实验室难以进行。

羟自由基易攻击芳环化合物产生羟基化合物, Halliwell^[4]提出了在羟自由基体系中加入

水杨酸, 用比色法测定其羟基化产物——2, 3-二羟基苯甲酸。此法已应用于测定次黄嘌呤-黄嘌呤体系^[5]、还原型谷胱甘肽-过氧化氢体系^[6]、烟酰胺嘌呤磷酸二核苷酸-过氧化氢体系^[7]、抗坏血酸-过氧化氢体系^[8]以及水的辐射体系^[9]产生的羟自由基。

本文研究了通过比色法测定水杨酸羟基化产物来测定 Fenton 反应产生的羟自由基的实验条件。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器

芦丁 (生化试剂, 上海试剂二厂出品), 槲皮素 (色谱纯, Fluka Chemie AG 公司出