

研究简报

鱼类同工酶和蛋白质的聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳法

朱 蓝 菲

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS ON POLYACRYLAMIDE OF ISOZYMES AND PROTEINS OF FISHES

Zhu Lanfei

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan 430072)

关键词 梯度凝胶电泳, 同工酶, 蛋白质

Key words Gradient gel electrophoresis, Isozyme, Protein

同工酶分析一般常用淀粉凝胶电泳进行, 但它常受淀粉质量的制约, 在淀粉的水解和制胶过程较难标准化, 因而不易掌握, 其机械强度不够也不易操作。而聚丙烯酰胺凝胶电泳具有优于淀粉凝胶电泳的一些特性, 如有较高的分辨率、机械强度高、可采用高纯度制品重复性好。当用一般的聚丙烯酰胺凝胶电泳分析同工酶和蛋白时, 常出现区带不集中, 或区带很少, 不能达到分离的目的。我们吸取了聚丙烯酰胺凝胶可以在较广的范围内控制凝胶孔径的优点^[1], 及淀粉凝胶电泳常用的一些缓冲液和显色系统的基础上^[2], 对凝胶不同的浓度梯度, 凝胶中缓冲液的种类与浓度, 电极缓冲液的种类和浓度等方面, 进行了系统的比较和选择, 并得到了较好的分离效果(图版 1:1—4), 个体间同工酶的多态现象可充分显示出来(图版 1:2, 4), 同时还与 7% 聚丙烯酰胺盘状电泳的分析结果进行了比较(图版 1:1, 5), 表明本文介绍的方法具有较高的分辨率。

梯度胶的制备

制凝胶板的模具 电泳槽是用夹芯式垂直电

泳槽(北京“六一”仪器厂生产), 将制凝胶板的模具装配好后, 用溶化的 1% 琼脂糖(用电极缓冲液配)封底, 稍等片刻即可灌胶。

试剂 ① C_{30} 液(用于配 30% 的胶液)——称取丙烯酰胺 57.6g, 双丙烯酰胺 2.4g, 用蒸馏水配成 100ml; ② C_{15} 液(用于配 15% 的胶液)——用 C_{30} 液稀释一倍; ③ D 液(用于配 4% 的胶液)——称取丙烯酰胺 7.68g, 双丙烯酰胺 0.32g, 用蒸馏水配成 100ml; ④ P 液——0.3% 过硫酸铵; ⑤ TVB 缓冲液——称取三羟甲基氨基甲烷(tris) 21.55g, 乙二胺四乙酸二钠 1.85g, 硼酸 11.0g, 用蒸馏水配成 1000ml (pH 8.4); ⑥ TC 缓冲液——称取 tris 16.35g, 柠檬酸 9.04g, 用蒸馏水配成 1000ml (pH 7.0); ⑦ T_{TVB} 液——100ml 的 TVB 缓冲液中加入 0.3ml TEMED (N, N, N', N'-四甲基乙二胺); ⑧ T_{TC} 液——25ml 的 TC 缓冲液中加入 0.3ml 的 TEMED 和 75ml 的蒸馏水。

浓度梯度混合器 由两支内径相同的平底玻

1991年3月1日收到。

璃管 A 和 B 组成(内径 3.5cm、高 9cm)。A 管底部有一侧管, B 管底部直径的两端则伸出两个侧管, 其中一个侧管通过细的乳胶管与 A 管底部的管相连, 在乳胶管上用一鳄鱼夹来代替 A、B 管之间的开关。B 管的另一侧管与穿刺针(外径 16mm, 长 130mm) 相连。当打开磁力搅拌器的开关时, B 管液面降低, A 管中的稀胶液不断进入 B 管, 通过 B 管中的磁力棒使两种不同浓度的胶液均匀混合, 形成不同的浓度梯度。

制胶 不同的同工酶和蛋白质所选用的凝胶浓度和缓冲液见表 1。量出制凝胶板的模具所需胶液的总体积, 以 1/8 总体积为 1 份, 按下列比例分别配置两种胶液: 浓胶液(15% 或 30%)——2 份 C 液 + 1 份 T 液 + 1 份 P 液; 稀胶液(4%)——2 份 D 液 + 1 份 T 液 + 1 份 P 液。先将 4% 的胶液倒入 A 管, 松开鳄鱼夹使稀胶液充满乳胶管(赶出气泡), 再将鳄鱼夹夹紧。当浓胶液倒入 B 管时将穿刺针往上翘以免溶液漏出。排除穿刺针与侧

管接头处的气泡, 再将磁力搅拌器和鳄鱼夹打开, 穿刺针的末端对准制胶玻板的中央, 混合后的胶液将沿着玻板徐徐流下。待 A、B 管中的胶液流尽(约需 2min) 正好距短玻板的顶端约 2cm。在胶液面上小心地加入蒸馏水约 0.5cm, 控制温度(冬季可放入温箱) 使胶液在 20min 之内聚合。聚合时间太慢对梯度胶的形成不利。聚合后将上层的水吸干, 加入样品槽胶液(按 2.5 份 D 液 + 1 份 T 液 + 1 份 P 液配成), 再将样品槽模板放入, 待聚合后将此模板拔出即可加样。

加样与电泳

样品按常规方法制备。加样前, 样品与等量的 20% 蔗糖溶液(加微量溴酚兰作指示剂) 混合后加入样品槽中, 在加电极缓冲液之前, 先小心地将样品层的上面加满缓冲液。与样品端相连的一方为负极端。电压 200V, 电泳 15h。

表 1 凝胶浓度和缓冲液的选择

Tab. 1 selection of gel concentration and buffer solution

| | 血红蛋白① | 血清蛋白② | 肌肉蛋白③ | EST④ | SOD⑤ | LDH⑥ | IDHP⑦ | MDH⑧ |
|-------------|------------------|-------|-------|------|------|-----------------|-------|------|
| 凝胶浓度%⑨ | 4—30 | | | | | 4—15 | | |
| 凝胶缓冲液(T 液)⑩ | TVB | | | | | 1 份 TC + 3 份蒸馏水 | | |
| 电极缓冲液⑪ | 1 份 TVB + 1 份蒸馏水 | | | | | 1 份 TC + 5 份蒸馏水 | | |

① Hemoglobin; ② Serum protein; ③ Muscle protein; ④ Esterase; ⑤ Superoxide dismutase; ⑥ Lactate dehydrogenase; ⑦ Isocitrate dehydrogenase; ⑧ Malate dehydrogenase; ⑨ Gel concentration; ⑩ Gel buffer solution (T solution); ⑪ Electrode buffer solution

表 2 同工酶的显色系统

Tab. 2 Staining systems of isozymes

| | 底物① | 固兰 RR 盐 mg② | NAD mg | NBT mg | PMS mg | NADP mg | MgCl ₂ mg | 缓冲液③ |
|------|----------------|----------------|-----------|-----------|-----------|------------|-------------------------|-----------------------------|
| EST | 15mg1-醋酸萘酚 | 60 | | | | | | 0.2M Tris-HCl (pH6) 10ml |
| LDH | 0.5ml 乳酸钠 | | 25 | 15 | 2 | | | 0.2M Tris-HCl (pH8) 10ml |
| IDHP | 100mgDL-异柠檬酸三钠 | | | 15 | 2 | 15 | 50 | |
| MDH | 300mgDL-苹果酸钠 | | 25 | 15 | 2 | | | |
| SOD | | | | 15 | 16 | | | 0.2M Tris-HCl (pH9) 10ml |

① Substrate; ② Fast Blue RR Salt; ③ Buffer solution

同工酶和蛋白的显色系统

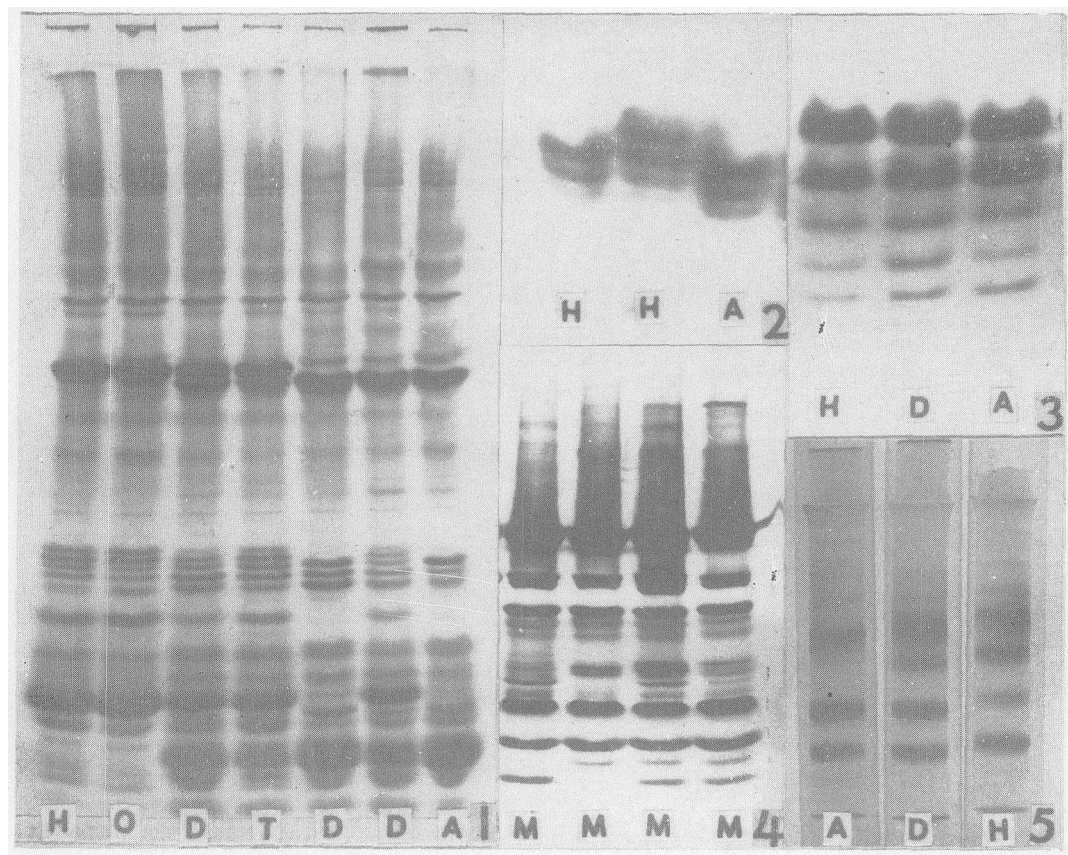
血红蛋白、血清蛋白和肌肉蛋白的染色可在大培养皿内进行,取 50ml 12% 三氯醋酸,2ml 1% 考马斯亮兰 R250 (溶解在乙醇中)配成染液,在 37℃ 温箱中染色 4h,擦去附着在凝胶表面的染料,用水漂洗两次后加入 7% 的醋酸,再放入温箱内,两天后图谱会更加清晰。

同工酶的显色系统列于表 2,其中底物、NAD (辅酶 I)、PMS (吩嗪二甲酯硫酸盐)、NADP (辅酶 II) 和 $MgCl_2$ 都可配成溶液放入冰箱中备用。酯酶的底物不溶于水,可按下列方法配成贮液: 0.3g 1-醋酸萘酯加 10ml 丙酮,待溶解后再加 10ml 蒸馏水。NBT (氯化硝基四氮唑兰)不易

溶解,可配成稀溶液 (15mg/30ml)。显色液须临用前配,其中含缓冲液 10ml, NBT 30ml,底物、辅酶、PMS 等约 10 ml,这样最终体积为 50ml 左右。显色时可将显色槽 (大培养皿) 放入温箱中 (37℃),直到区带清楚为止。酶谱用水漂洗三次后放入 1% 醋酸中固定,由于酸的作用,显色强度会逐渐变淡,应及时拍照记录。

参 考 文 献

- [1] 张龙翔、张庭芳、李令媛,1982。生化实验方法和
技术, p119—124, 人民教育出版社。
- [2] Shaw, C. R. and Prasad, R., 1970. Starch
gel electrophoresis of enzymes—a compila-
tion of recipes. *Biochem. Genet.*, 4: 297—
320.



1.肌肉蛋白电泳图谱； 2. IDHP 同工酶谱； 3. LDH 同工酶谱； 4. EST 同工酶谱； 5.肌肉蛋白电泳图谱 (7% 聚丙烯酰胺盘状电泳图谱)。H——鲢； O——同源三倍体鲢； A——鳙； M——团头鲂； D——杂交子代； T——异源三倍体鲢

1. Electrophoretic pattern of muscle protein; 2, 3, 4. shows IDHP, LDH and EST isozyme zymogram respectively; 5. Electrophoretic pattern of muscle protein (disc electrophoresis pattern of 7% polyacrylamide gel). H——silver carp; O——autotriploid of silver carp; A——big head carp; M——blunt snout bream; D—— F_1 hybrids; T——allotriploid of silver carp