

# 琼脂电泳技术的改进及人、豚鼠、地鼠血清蛋白电泳的正常值\*

金 律 王鳳連

(中国医学科学院阜外医院, 北京)

近年来, 琼脂电泳在研究工作与临床实验工作中得到了较广泛的应用。适用于分离血清蛋白<sup>[1-3]</sup>, 血红蛋白<sup>[4]</sup>, 脂蛋白<sup>[5-7]</sup>, 乳酸脱氢酶<sup>[8,9]</sup>, 组织浸出液蛋白<sup>[10,11]</sup>等。尤其在免疫电泳方面<sup>[12,13]</sup>应用更加广泛。在琼脂电泳操作方法方面, 有各种不同的改进, 包括微量琼脂电泳<sup>[14,15]</sup>, 适用于脂肪、碳水化合物、核蛋白、核酸与矿物盐离子等微量化学分析。为了进行组织移植免疫的研究, 需要建立免疫电泳, 首先要建立琼脂电泳方法, 同时作组织移植时免疫排异, 体液因素起很主要的作用, 因此对常用的实验动物测定了血清蛋白琼脂电泳的正常值。为适应国内条件, 便于推广应用, 本实验在方法方面进行了一些探索, 简化了步骤, 缩短了操作时间。用此方法测定了正常人30例, 豚鼠、野地鼠、金黄色地鼠各10只及家养地鼠7只的血清蛋白琼脂电泳的正常值。

## 设备与试剂

(一) 设备: 自制琼脂电泳仪器(图1): 整流稳压器, 电泳缸: 长17厘米, 宽10.5厘米, 高11厘米; 玻璃缸2个, 高14.5厘米玻璃支架1个, 白金电极; 木框: 内径长22厘米, 宽4.3厘米, 厚0.3厘米; 玻璃板: 长27厘米, 宽8.5厘米; 废X光底片: 长25厘米, 宽6厘米; 透明塑料布: 长25厘米, 宽6厘米; Whatman 1号滤纸; 铁夹子; 橡皮垫; 小镊子; 解剖刀; 血色素吸管等。

### (二) 试剂

(1) 巴比妥缓冲液: pH 8.6, 离子强度0.05。(2) 双倍浓度巴比妥缓冲液。(3) 固定液: 5%醋酸甲醇液。(4) 染色液: 溴酚蓝0.1克, 硫酸锌50克, 冰醋酸50毫升, 蒸馏水加至1000毫升。(5) 脱色液: 2%醋酸。(6) 显色液: 10%醋酸与醋酸钠溶液。

## 方 法

**净化琼脂**<sup>[16]</sup> 将60克质量较好的琼脂(Difco牌或国产)粉末加水至1000毫升, 加热溶解后加入适量氯化钙起沉淀使琼脂净化, 趁热经纱布与棉花过滤, 将滤液倒入瓷盘内待凝固后切成小立方块, 在流动自来水下冲洗3昼夜, 再以蒸馏水泡洗3天, 每天换水4—5次, 最后使其pH接近于7.0。将净化琼脂(按干重计算)加入热蒸馏水内, 加热溶解使成2%浓度, 再加入柳硫汞防腐剂使最后成为0.02%浓度, 将琼脂分装于三角瓶内, 置冰箱可保存很长时间。亦可将2%琼脂内加入等量双倍浓度巴比妥缓冲液, 使成1%琼脂缓冲液, 分装于试管内, 每管分装12.5毫升, 保存于冰箱内备用。

\* 本实验承谢少文教授指导, 吴晏大夫供给地鼠, 谨致谢意。  
本文1964年7月16日收到。

**琼脂板制备** 将无色透明塑料布贴在以蒸馏水沾湿的废X光底片上,再放在玻璃板上,将木框压在塑料布上,四周用铁夹夹紧,使成长方形槽,然后放置在水平橡皮垫上(图2)。取数支含 12.5 毫升 1% 琼脂缓冲液的试管放在沸水浴内溶化,琼脂溶化后待冷至

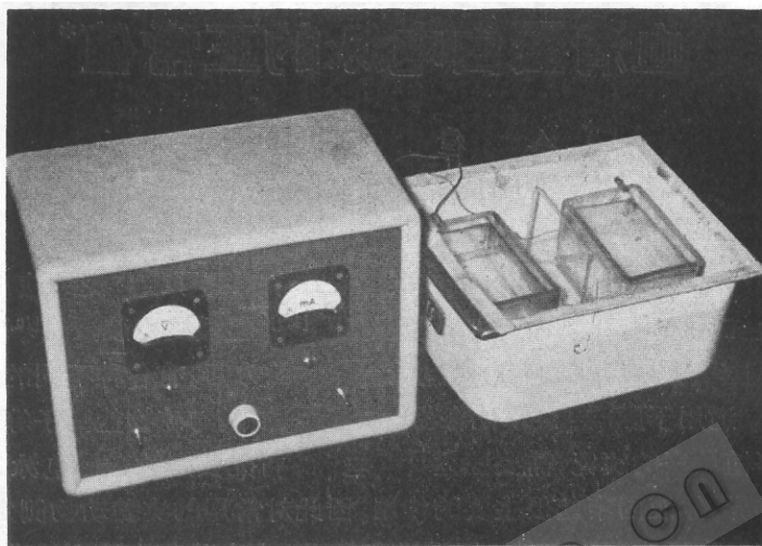


图1 自制琼脂电泳装置。

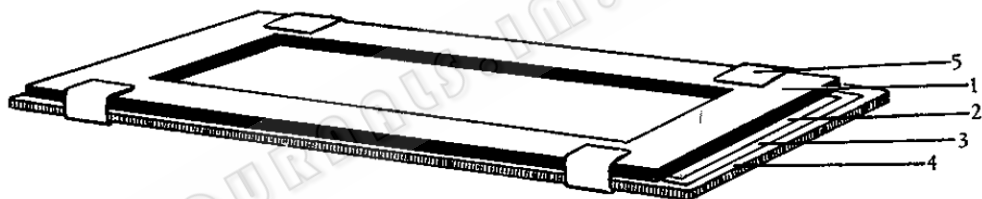


图2 琼脂板制备模型。

1.木框; 2.透明塑料布; 3.废X光底片; 4.玻璃板; 5.铁夹子。

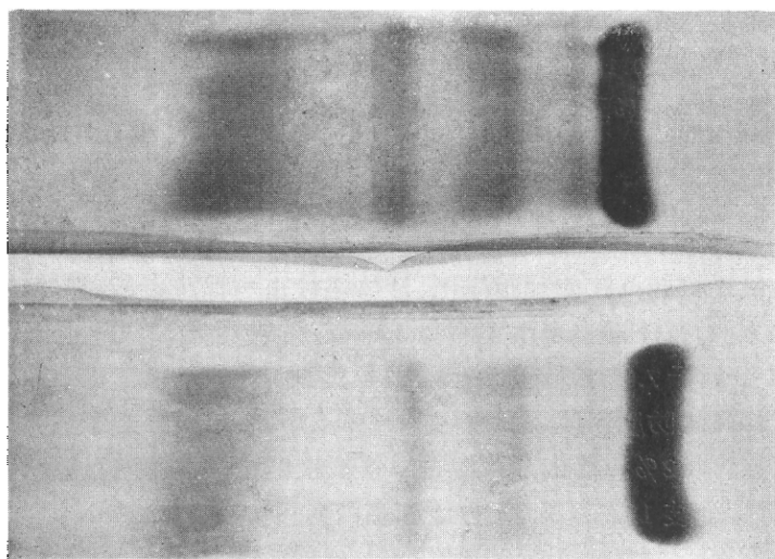


图3 人血清琼脂电泳图谱。

45—50℃, 取少量琼脂封闭木框与塑料布间的接触缝, 然后将 12.5 毫升 1% 琼脂缓冲液倒入木框槽内, 待琼脂凝固后, 用解剖刀沿木框边缘划开琼脂与木框粘连部分, 然后细心地拆除木框。

**电泳** 用血色素吸管吸取 10 微升待检样品, 滴加在 2.5 厘米长, 0.1 厘米宽的滤纸条上, 立即将滤纸条平稳地贴在琼脂板中线的表面上, 将琼脂板连同塑料布与 X 光底片放在支架上, 两端直接浸入电泳缸的缓冲液内约 2 厘米, 形似弓形桥样, 随即通电 75 分钟, 电压 200 伏特, 电流强度 4—5 毫安/厘米宽。

**染色** 电泳終了将琼脂板两端切去 3—4 厘米, 拆去 X 光底片, 将琼脂板连同塑料布一起置入 5% 醋酸甲醇液内固定两次, 每次 30 分钟。以后置 37℃ 孵箱 3—4 小时使干燥, 再浸入溴酚蓝染液内染色 16 小时后, 以 2% 醋酸液洗涤 2—3 次, 每次 10—15 分钟, 然后在显色剂内显色 2 分钟, 此时可看出各蛋白部分区带分离明显, 琼脂背底是无色透明(图3), 取出后用滤纸将琼脂板上多余的显色剂吸去, 置室温使干后, 将琼脂板薄膜从塑料布上轻轻剥离, 剪下各条蛋白部分放入试管内, 加 0.1 N 氢氧化钠 5 毫升洗脱 30 分钟, 用光电比色计比色(用绿色滤光板)。

## 结 果

在 30 例正常人(献血员)中, 男性与女性各 15 例, 年龄 21—45 岁, 自静脉采血, 结果见表 1。并测定了此方法的重复性, 其中 1 份标本重复测定 6 次, 结果见表 2。由表 2 可看出此方法的重复性比较满意。

表 1 30 例正常人血清蛋白琼脂电泳的正常值

标本来源	清蛋白(%)	球 蛋 白 (%)			
		$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\beta$	$\gamma$
献 血 员	65.8±3.8*	3.4±0.8	7.7±1.8	8.6±1.6	14.5±2.4

\* 标准差。

表 2 琼脂电泳重复性的测定

标本来源	重复次数	清蛋白(%)	球 蛋 白 %			
			$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\beta$	$\gamma$
人血清	6	64.5±1.7	4.0±0.3	7.8±0.9	7.4±0.6	16.1±0.8

在 10 只豚鼠与金黄色地鼠中, 雌雄各 5 只, 体重分别为 300—500 克与 93—136 克。10 只野地鼠中, 雌 9 只, 雄 1 只, 体重为 19—34 克。豚鼠未麻醉, 地鼠均用乙醚麻醉后取心血进行电泳测定。结果见表 3。3 种地鼠  $\gamma$  球蛋白含量都比较少, 在经染色后的琼脂板薄膜上, 有的地鼠  $\gamma$  球蛋白带较不明显。野地鼠全部能分离出清前蛋白。金黄色地鼠  $\alpha_1$  球蛋白含量最高, 和野地鼠、家养地鼠之间具有明显差异 ( $P < 0.01$ ), 野地鼠  $\beta_2$  球蛋白含量最高, 和家养地鼠、金黄色地鼠之间有显著差异 ( $P < 0.01$ )。其他蛋白成分没有显著差

表 3 豚鼠、地鼠血清蛋白琼脂电泳的正常值

动物种类	例 数	清前蛋白(%) (P)	清蛋白(%)	球 蛋 白 %				
				$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\beta_1$	$\beta_2$	$\gamma$
豚鼠	10	—	56.2±2.9	9.1±0.9	16.6±1.1	8.2±1.0		9.9±2.1
野地鼠	10	3.2±0.9	63.2±6.8	2.6±0.6	5.6±1.9	7.0±1.3	12.8±2.6	5.7±2.5
家养地鼠	7	—	64.5±6.2	5.1±1.9	7.6±3.5	6.5±3.3	8.0±2.1	8.1±3.1
金黄色地鼠	10	—	62.4±3.9	10.4±1.6	7.6±1.9	5.3±1.0	8.5±1.9	5.8±2.1

异 ( $P > 0.05$ )。豚鼠、金黄色地鼠雌雄之間血清蛋白电泳成份的比較結果见表 4。豚鼠雌雄之間血清蛋白电泳成分沒有明显差异。豚鼠血清在作紙上电泳时,  $\alpha_1$  球蛋白部分不易分离, 但用琼脂电泳則可較清楚地分离出。金黄色地鼠雌雄之間, 除清蛋白有显著差异外, 其他成分都沒有显著差异。

表 4 豚鼠、金黄色地鼠雌雄之間血清蛋白电泳成分的比較

动物种类	性 别	例 数	清蛋白(%)	球 蛋 白 (%)				
				$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\beta_1$	$\beta_2$	$\gamma$
豚 鼠	雄	5	55.8	9.7	16.8	8.5		9.2
	雌	5	56.5	8.6	16.4	7.9		10.7
	P		>0.05	>0.05	>0.05	>0.05		>0.05
金黄色地鼠	雄	5	66.6	9.2	7.4	4.9	7.4	4.6
	雌	5	58.3	11.4	7.7	5.8	9.6	7.0
	P		<0.01	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

討 論

**琼脂电泳具有很多优点** (1)琼脂板內含水量高, 接近于自由电泳。(2)琼脂板結構一致, 因此蛋白部分区带整齐, 分辨力高。(3)可分离大量材料, 为进行研究与比較提供較大量的产品。(4)电泳時間短, 能保持酶的活性, 适用于一些酶的分离。(5)透明度好, 可以直接进行光密度測定。(6)有时在紙上电泳分离不出的蛋白部分, 在琼脂电泳上能被分离。(7)适用于組織浸出物蛋白电泳等。本实验方法除具有以上优点外, 設備簡單, 全部設備可以自制。操作簡單, 洗脫方便。另外, 用滤紙条将血清渗入琼脂內比在琼脂上挖沟加血清要容易作。

**在琼脂电泳裝置方面的改进** 主要可分为四类: (1)帶有冷却裝置<sup>[11]</sup>, 以免电泳时因热使琼脂变形而发生裂痕。(2)开放式<sup>[12]</sup>, 使緩冲液不断流入、流出电泳缸, 而其液面始終保持一定水平。(3)密閉式<sup>[2, 3]</sup>, 可防止水分蒸发, 以免影响緩冲液与琼脂的浓度。(4)微量电泳裝置<sup>[14, 15]</sup>, 特別适用于免疫电泳的研究。本实验采用了密閉裝置, 将透明塑料布上琼脂板两端直接浸入电泳缸緩冲液內, 倘若用滤紙接連琼脂板及緩冲液, 則电泳時間延长, 热效应大, 使琼脂板破裂而不易作成功。至于琼脂的浓度, 大多数作者采用 1%, 有的用

0.3—1.5%。Илков<sup>[11]</sup>指出当琼脂浓度较高时,可增加蛋白停滞,移速较慢,浓度过低则琼脂凝固不好,获得的蛋白区带不清晰。同时指出不同种类的琼脂没有大的差别,而以我国出产的琼脂最为满意。Cawley<sup>[2]</sup>等研究了离子强度对电泳的影响。发现离子强度递减时,蛋白移动速度较快,带的数目增加,区带不明晰。

琼脂板支持物用玻璃板时,琼脂板两端不能直接浸入缓冲液内,琼脂板干后,琼脂薄膜不易与玻璃板剥离。也有用胶卷底片作支持物的,但同样不易剥离,所以只能以光密度计测定结果。其优点为经染色后用透明塑料喷雾于琼脂薄膜上,可永久保存。我们发现洗掉胶卷底片上的胶质时底片上留有细的划痕,影响光密度的测定。本实验利用无色透明塑料布作为支持物优点是:透明度好,琼脂板两端可直接浸入电泳槽的缓冲液内,可以直接测定光密度或剥离琼脂薄膜,剪下各蛋白部分经比色后求出百分数。

关于正常人血清蛋白琼脂电泳的正常值,以前也有人作过,见表5。本实验的结果,清蛋白较高,球蛋白较低,可能由电泳条件及测定方法不同所致。在实验中发现琼脂薄膜连同塑料布直接进行光密度测定,与薄膜剥离后进行比色的结果有差别。此点与 Ван Хэ-бинь<sup>[17]</sup>的结果,即用光电比色计测定清蛋白,比用光密度计测定高,而球蛋白较低是一致的。

表5 人血清蛋白琼脂电泳正常值的比较

作 者	年 份	例 数	清蛋白 (%)	球 蛋 白 (%)				
				$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\beta_1$	$\beta_2$	$\gamma$
Узюмов, П. В. <sup>[13]</sup>	1961	21	55.0	5.4	11.0	7.4	4.2	17.0
Cawley, P. L. <sup>[2]</sup>	1962	26	58.0	4.7	11.4	10.6		15.2
本 实 验	1964	30	65.8	3.4	7.7	8.6		14.5

## 总 结

本文介绍了一种简单、迅速的血清蛋白琼脂电泳技术。使用无色透明塑料布作为支持物,电泳装置可以全部自己制备,电泳时间仅需75分钟。并用此方法测定正常人30例,豚鼠、野地鼠、金黄色地鼠各10只及家养地鼠7只的血清蛋白琼脂电泳的正常值。

## 参 考 文 献

- [1] Zak, B. et al.: *Amer. J. Clin. Path.*, **29**:69, 1958.
- [2] Cawley, P. L. et al.: *Amer. J. Clin. Path.*, **38**:539, 1962.
- [3] Узюмов, Л. В.: *Лаб. Дело*, **8**:11, 1961.
- [4] Robinson, A. R. et al.: *J. Lab. & Clin. Med.*, **50**:752, 1957.
- [5] Zak, B. et al.: *Amer. J. Clin. Path.*, **31**:559, 1959.
- [6] Делямуре, Л. Л.: *Вопр. Мед. Хим.*, **2**:200, 1963.
- [7] Делямуре, Л. Л.: *Лаб. Дело*, **3**:141, 1964.
- [8] Blanchaer, M. C.: *Clin. Chem. Acta.*, **6**:272, 1961.
- [9] Ressler, N. et al.: *J. Lab. & Clin. Med.*, **60**:349, 1962.
- [10] Портокал, Р.: *Биохимия*, **3**:404, 1959.
- [11] Илков, Г. А.: *Вопр. Мед. Хим.*, **5**:388, 1959.
- [12] Грабар, П.: *Биохимия*, **22**:49, 1957.

- [13] Татаринов, Ю. С.: *Лаб. Дело.*, (6):15, 1963.
- [14] Scheidegger, F. J.: *Int. Arch. Allergy*, 7:103, 1955.
- [15] Портокал, Р.: *Вопр. Мед. Хим.*, 4:310, 1959.
- [16] Ouchterlony, O.: *Progress in Allergy*, 5:1, 1953.
- [17] Ван Хэ-бинь: *Лаб. Дело.*, (2):8, 1959.

## IMPROVED AGAR-GEL ELECTROPHORESIS AND THE DETERMINATION OF SOME NORMAL SERUM PROTEIN VALUES

CHIN LU AND WANG FENG-LIEN

(Fu-wai Hospital, Chinese Academy of Medicine, Peking)

In order to simplify electrophoresis, the following agar-gel method has been introduced. The sera were examined in an 1% agar gel set on a piece of plastic cloth placed on used X ray film measuring 22 by 4.3 Cm. The following conditions were used for electrophoresis: voltage, 200 v., current, 4—5 ma/cm, time, 75 minutes; and the buffer employed was veronal buffer solution pH 8.6. After the completion of the run, the agar strip was fixed, dried at 37°C, and stained with bromphenol blue. The results were then read by means of an electrophotometer.

By this method, the normal values of serum protein of the humans, guinea pigs, Chinese hamsters, and golden hamsters have been obtained, and the results compared with those obtained by the conventional methods. The method has proven to be simple and time saving, and the separation of the various fractions of the plasma protein, uniform and clear-cut. Detailed instructions for construction of such an apparatus in the laboratory were given.