维普资讯 http://www.cqvip.com

17-20

第21卷第1期　　重庆医科大学学报　　Vol.21 No.1

1996　　ACTA UNIVERSITATIS SCIENTIAE MEDICINAE CHONGQING　　1996

用 Phast System 自动电泳仪分析脑脊液蛋白质

实验室管理科　　陈思秀

生物分析化学教研室　　黄　昕

△提　要　本文介绍了在 Phast System 全自动电泳仪上用梯度 SDS－PAGE，结合银染法对正常人 CSF 的测定结果。CSF 无需浓缩即可检出 12 种组分，分辨率远较一般电泳方法为高。该法操作简单、快速、规范、易于推广。

关键词　脑脊液；十二烷基磺酸钠——聚丙烯酰胺凝胶电泳

中图分类号　R446.14　Q503

脑脊液(CSF)含有多种蛋白质成份，在某些神经疾患中，异常蛋白质成份的出现可作为特异性诊断指标[1]。因此，这些蛋白质成份的检出受到人们重视，电泳是常用的分离、检测手段。但是，由于 CSF 所含蛋白总量低，蛋白成份的分子量分布范围广，常规电泳分离方法往往难以将其完全分离。本文报告了以梯度的 SDS－PAGE 系统，在 Phast System 全自动电泳仪上对未经浓缩的正常人 CSF 样品进行分离，以银染法检出，取得满意的结果。

1　材料与方法

1.1　仪器　瑞典 Pharmacia 公司生产的 Phast Sysytem 全自动电泳仪，配以 Phast Gel Gradient8－25 聚丙烯酰胺薄层凝胶板及 Phast Gel SDS Buffer Strip (缓冲凝胶条)。DISKBOY 离心机。LIBROR AEG－220 电子分析天平、UV－120 分光光度计。

1.2　试剂

1.2.1　考马斯亮蓝 G－250(CBBG－250) 溶液：CBBG－250 100mg 溶于 95% 乙醇 50ml 中，加入 85% H_3PO_4 100ml，用 DH_2O 调至 1000ml。

1.2.2　样品缓冲液：称取 Tris 3.0270g，EDTA0.1860g，溶解于 500ml 双蒸水中，用盐酸调节 PH 至 8.0。

1.2.3　A 液　取样品缓冲液 7.5ml，加入 β－巯基乙醇 2.5ml，溴酚蓝 0.005g，SDS 0.75g。－20℃冰箱保存。

1.2.4　银染试剂

1.2.4.1　固定液　醋酸：甲醇：水 = 1：4：5

1.2.4.2　清洗液　乙醇：水 = 1：4

1.2.4.3　增效剂(新鲜配制)　25% 戊二醛用双蒸水 1：1 稀释。

1.2.4.4　银染液(新鲜配制)　取 20% 硝酸银溶液 200μl，加氨水 200μl，4% 氢氧化钠溶液 1.0ml，20% 乙醇 18.6ml(按顺序加入)。

1.2.4.5　扩展液　取 20% 乙醇 20ml，加 37% 甲醇 20μl，2.3M 柠檬酸溶液 5.0μl。

---

calculated content of fibrinogen).

The above parameters weremessured in 70 patients with coronary heart disease(CHD), of whom 7 patients had acute myocardial infarction(MI), and in a control group of 40 healthy persons. CST in the patient group was significantly shorter than that in the control group. The fact that MCE, FC, AFE and CEF were higher than those in the control group was of statistical significance. The values of FFE, WFT, and others showed no apparent differences in the two groups. These results suggested that in patients with CHD there is an increased clottability and relatively insufficient fibrinolytic activity. No differences with statistical significance were found between the patients with MI and without MI

KEY WORDS Coronary heart disease; Blood coagulation; Fibrinolysis

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.2.4.6 保持液 甘油:醋酸:水 = 1:1:8

1.2.5 蛋白质标准液：含磷酸化酶 B(94KD)、牛血清白蛋白 (67KD)、肌动蛋白 (43KD)、碳酸酐酶 (30KD)、TWV 外壳蛋白 (17.5KD)。其浓度为 1mg·ml^{-1}。

1.3 CSF 样品处理

样品液以 12.000RPM 离心 15min，取上清液保存。

1.4 CSF 总蛋白质定量

1.4.1 标准曲线 按表 1 操作

混匀，室温放置 2min 后，用空白调零，在 λ595nm 处测定。

1.4.2 样品蛋白质含量测定 取样品 5μl，加入双蒸水 0.095ml，CBBG－250 5.0ml，混匀。室温放置 2min 后，用上述空白调零，在 λ595nm 处测定。

1.5 电泳

1.5.1 操作程序 按表 2 设定

1.5.2 取离心后的样品 20μl，加 A 液 20μl，放入沸水浴 3min。

1.5.3 放置好加样梳，分别取 (2) 的样品溶液 4μl 和蛋白质标准液 4μl，进行点样。

1.5.4 取一张 Phast Gel Gradient 8－25 胶片放入电泳室，放好缓冲凝胶条，调整室内架子至规定位置，将加样梳置于架子上。关闭电泳室盖后开始电泳操作。

1.6 银染

将胶片从电泳室取出后，按以下顺序操作：

1.6.1 固定 在固定液中浸泡 5min；

1.6.2 清洗 用双蒸水浸泡清洗 5min；

1.6.3 增敏 在增敏液中浸泡 7.5min；

1.6.4 清洗 用双蒸水清洗胶片两次，各 5min；

1.6.5 清洗 用清洗液浸泡胶片 7.5min；

1.6.6 染色 胶片放入染色液中浸泡 7.5min；

1.6.7 清洗 用清洗液浸泡胶片两次，各 5min；

1.6.8 扩展 胶片放入扩展液中浸泡 3－6min；

1.6.9 保持 胶片放入保持液中浸泡 3min；

1.6.10 用双蒸水洗净胶片，放置亮干，保存。

以上银染法的每一步都需均匀震荡，银染色用的试剂纯度以及蒸馏水的纯度都极大地影响银染色的质量。

表 1 蛋白质标准溶液反应条件

加入物 ml	空白	1	2	3	4	5
标 液	–	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10
DH_2O	0.10	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
CBBG－250	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
蛋白质浓度 ($mg.ml^{-1}$)	0	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10

表 2 CSF 电泳程序设置

步骤	电压 (V)	电流 (mA)	功率 (W)	温度 (℃)	持续时间 (V·h)
SEP2.1	250	10.0	3.0	15	80
SEP2.2	50	0.1	0.5	15	0

维普资讯 http://www.cqvip.com

2 结果与讨论

2.1 CSF 中总蛋白质含量的测定

本研究用考马斯亮蓝法测定 CSF 总蛋白含量。标准曲线在 0.02～0.10mg·ml^{-1}的范围呈现良好的线性关系，如图 1 所示。按该法所测得的 CSF 蛋白质总量为 0.34mg·ml^{-1}，在正常人 CSF 蛋白质总量范围内(0.15～0.45ml·ml^{-1})。

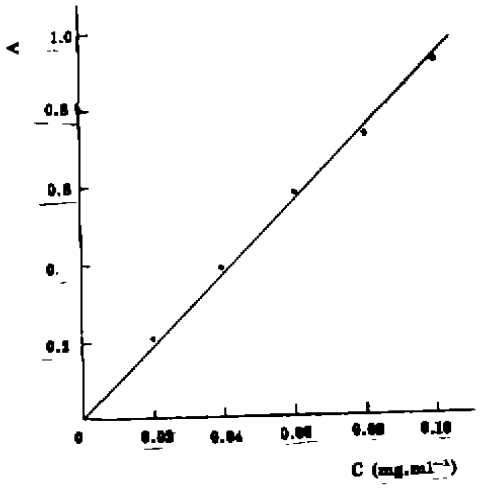


图 1 测定 CSF 总蛋白的标准曲线

2.2 样品处理

CSF 中蛋白质含量仅有血浆中的 0.5% 上下，常规电泳方法中，需采用样品预浓缩技术，但这会使电泳分辨率降低，并有可能造成拖尾。这也是一般电泳方法难于分离 CSF 蛋白质的主要原因之一。本实验省去了样品预浓缩步骤，并以银染法检出。银染法比考马斯亮蓝法灵敏 100 倍，能检出每平方毫米胶片上 0.05－0.1ng 的蛋白质[2]，对于 CSF 蛋白质的检出是适合的。

2.3 电泳结果与电泳模式的选择

正常人 CSF 蛋白质电泳结果图 2。

本实验所用分离载体为 Phast Gel，凝胶增厚度只有 0.35mm，属于超薄型载体，为提高分离度提供了可靠保证。又考虑到 CSF 含有分子量范围较宽的蛋白质，因此，实验时选用了能分离 6KD－300KD 蛋白质的 Phast Gel Grede 8－25 胶片，这种胶片具有分子筛效应，有助于形成分子量梯度。实验结果表明，在这种胶片上，未经浓缩的 CSF 共检出 12 种组分，分子量分布在 6KD－90KD 之间。CSF 按 1∶1 稀释后，仍可检出 9 种组分。

2.4 分子量标准曲线

实验结果表明，标准蛋白质进行 SDS－PAGE 后，其分子量对数与迁移率 Rf 值之间呈现良好的线性关系，如图 3 所示。

对 CSF 蛋白质的电泳分离与检出难度较大，主要是 CSF 各种蛋白质成份分子量分布宽、含量低，致使用一般电泳方法难以对其进行高分辨的分离和高灵敏度检测。本文用 Phast System 建立的方法具有操作简单，规范、样品不需浓缩、用量少、分辨率高等优点。与一般电泳相比，其分析速度大大提高，可在 1－2h 内完成实验，结果满意，国内很少见同类报告。

参 考 文 献

1. Kehr, F. W., J. Chromatogr. 1991; 569: 281
2. Oakley, B. R. et al. Anal. Biochem., 1980; 105: 361

(收稿日期 1995－06－16)

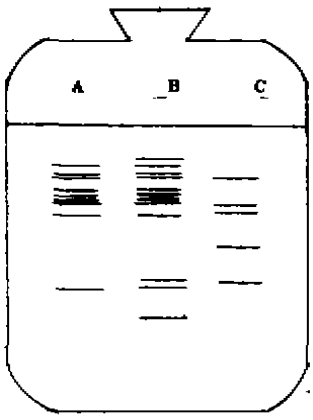


图 2 银染法检测正常人 CSF 蛋白区带图
A. 1∶1 稀释样品的蛋白区带；B. 未经稀释样品的蛋白区带；C. 标准蛋白区带

维普资讯 http://www.cqvip.com

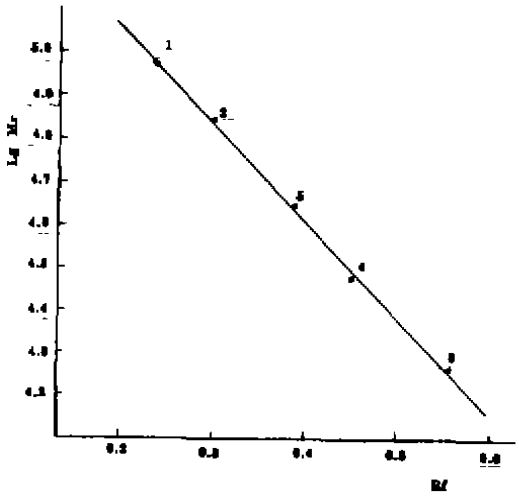


图 3　标准蛋白质分子量与 Rf 的线性关系
1. 磷酸化酶 B，　2. 牛血清白蛋白
3. 肌动蛋白，4. 碳酸酐酶，5. TWV 外壳蛋白

DETECTION OF PROTEINS IN CEREBROSPINAL FLUID (CSF) USING PHAST SYSTEM

Chen Sixiu, et al

Dept. of Administrative Laboratory Section

This Paper describes a method for detecting proteins in unconcentrated cerebrospinal fluid (CSF). The method is based on SDS-PAGE using Phast System, the protein bands are detected by direct Silver Staining. A protein pattern including 12 components was obtained. Advantages of the method presented here include optimal resolution and standardization of the separation and silver staining conditions, in combination with speed and convenience.

KEY WORDS Cerebrospinal fluid; SDS-PAGE