维普资讯 http://www.cqvip.com

重庆医科大学学报 1993年第18卷第3期

(2) 174-176, 173

超薄层等电聚焦技术检测β-内酰胺酶

第一医院传染科 钱元恕 王其南 R978.1

提 要 本文采用国产试剂，建立超薄层（0.2mm）聚丙烯酰胺等电聚焦电泳技术分析β-内酰胺酶，可在相同条件下同时比较分析多个样品，具有操作简便，分辨率高等优点，且电泳时间短，样品用量少。此技术适用于临床和实验室科研，在改变个别条件下也适用于其它生物样本的分离和分析，值得在生物研究领域推广应用

关键词 β-内酰胺酶；等电聚焦 抗菌素
中图分类号 Q5，R978.1

等电聚焦电泳是识别和分类β-内酰胺酶（β-lactamases，β-lase）的主要技术，自建立至今已有10多年历史。但以往的方法因胶层厚、电泳时间长、所用试剂价格昂贵而无法适应实际工作需要。尤其对大量流行病学调查工作很不适应。随着β-内酰胺抗生素的大量应用和新抗生素的不断涌现，细菌耐药现象日趋广泛而严重，也要求能提供一种能快速对β-lase进行分型，且分辨率高，简便易行，价格便宜的等电聚焦电泳技术。本文介绍的超薄层等电聚焦技术具有电泳时间短，分辨率高等优点，且使用国产试剂，使价格大大降低，能满足临床和实验室需要，现报道如下：

试验材料

1. 化学试剂

丙烯酰胺（acrylamide，Acr，临海化学厂产品）；甲叉双丙烯酰胺（N,N,-methylbisacrylamide，Bis，广州化学制药厂）；四甲基乙二胺（N，N，N'，N'-tetramethylethylendimin，TEMED，上海前进试剂厂）；载体两性电解质Ampholine，中科院上海生化研究所产品，pH3.5～10.0）；过硫酸铵（Amonium persulfate，APS，上海桃浦化工厂产品）；Nitrocefin（英国Glaxo公司产品）。

2. β-lase制备

依照文献[1]的方法制备β-lase提取液，提取液用β-lase特异性鉴定试剂Nitrocefin判断为阳性后，分装并贮存于－40℃。

标准产酶菌株包括10株产质粒介导的β-lase（PSE1～4，OXA1～3，TEM1～2，SHV-1）的菌株和2株染色体介导的β-lase（D_{31}，P_{99}）产酶株。其中除PSEs的产酶株为绿脓杆菌外，余均为大肠杆菌。

实验方法

1. 制胶

按照表1的配方配制聚丙烯酰胺凝胶工作液，负压抽滤脱气10min后加少量过硫酸铵轻轻摇匀，然后用压片法在LKB公司提供的制胶模具上制胶。待聚丙烯酰胺凝固后取下胶板，在4℃冰箱中以保湿盒保存，可在36h内使用而不影响电泳结果。

2. 电泳

将水平电泳仪（LKB产品）上涂以轻质液体石蜡油并将制好的胶板置于其上，循环水温恒定于4℃。用1M H_3PO_4和1M NaOH浸湿电极条，分别放在凝胶表面的阳极和阴极，以1200V，10mA，5W的参数预电泳30min，使凝胶表面形成稳定的pH梯度，然后将点样纸分别放在凝胶表面，点上适量β-lase提取液，凝胶中间的点样纸上点上Bio-

维普资讯 http://www.cqvip.com

表1 凝胶工作液配方

试　剂	容 量(ml)
29.1%丙烯酰胺	1.35
0.9%甲叉双丙烯酰胺	1.35
40% Ampholine	0.1
重蒸水	4.10
四甲基乙二胺	8(μl)
负压抽滤脱气10min	
0.05%过硫酸铵	0.8

Rad等电聚焦标准蛋白5μl以制作标准曲线。重新接通电源，以2400V，10mA，5W恒功率电泳30min，最后将参数改为2400V，10mA，7W再电泳30min，共计电泳90min。

3. **染色**

迅速取下凝胶板，以25mg%的Nitrocefin湿润滤纸后覆盖于凝胶表面。凡有β-lase的地方将出现红色区带，照相或描记实验结果（图1）。

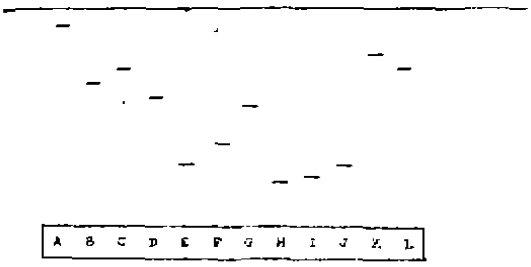
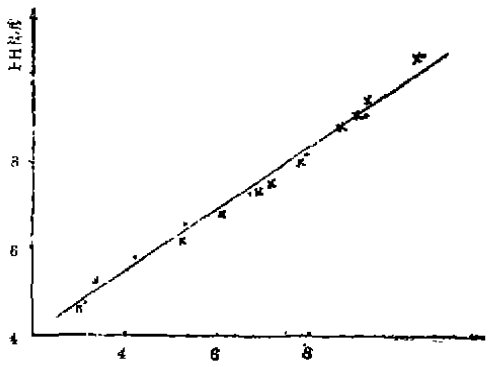


图1 β-内酰胺酶的等电聚焦图描记

A. D_{31}; B. OXA-1; C. OXA-2; D. OXA-3; E. PSE-1; F. PSE-2; G. PSE-3; H. PSE-4; I. TEM-1; J. TEM-2; K. P_{99}; L. SHV-1;

4. **样本PI测定**

分别以PI标准蛋白和表面pH电极制作标准曲线，方法如下：(1)重新电泳15min，使扩散了的区带再次聚焦在各自的等电点上，然后关闭电源，取下胶板，根据文献[2]的方法对其进行固定、染色和漂洗，可见标准蛋白出现11条区带。仔细量取这些区带距凝胶边缘的距离，以这些区带的PI对迁移距离绘制标准曲线，$Y=2.8115\pm0.8398x$ ($r=0.9965$, $n=6$)，(2)以表面pH电极从阴极起每隔1cm量取一次凝胶表面的pH值并制作标准曲线，$Y=2.6571+0.7364x$ ($r=0.9905$, $n=3$)。最后将凝胶置于37℃孵箱中温孵1h，在凝胶表面盖一张玻璃纸，此胶可长期保存



迁移距离（cm）

×——× 以IEF标准蛋白测定

·——· 以表面pH电极测定

图2 等电聚焦标准曲线

将标准β-lase各样本显色后区带的迁移距离代入上述直线方程式，根据算得的PI检验此技术的可信性，结果，实测PI和理论PI基本一致，说明该方法的结果是可信的。

表2 超薄层等电聚焦测定β-内酰胺酶的pI

酶　型	标准pI	实测pI	酶　型	标准pI	实测pI
PSE-1	5.7	5.7±0.04	OXA-3	7.1	7.1±0.04
PSE-2	6.7	6.7±0.02	TEM-1	5.4	5.4±0.04
PSE-3	6.9	6.9±0.04	TEM-2	5.6	5.6±0.01
PSE-4	5.3	5.3±0.05	SHV-1	7.6	7.6±0.03
OXA-1	7.4	7.4±0.02	P-99	8.0	8.0±0.01
OXA-2	7.5	7.5±0.03	D-31	8.6	8.6±0.02

维普资讯 http://www.cqvip.com

该技术同样适用于其它蛋白质类样品的分离和分析（见图3）。

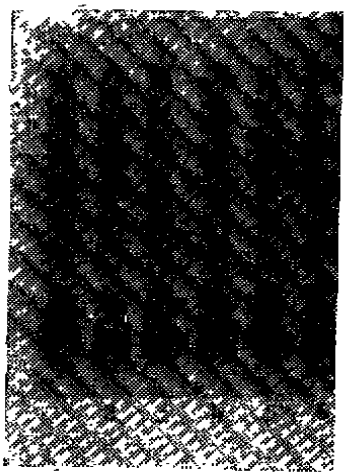


图3 以等电聚焦方法分离正常人血清

讨 论

识别和分类β-lase的方法很多，主要的有氨基酸序列分析[3]，等电聚焦电泳分类法[4,5]，以及综合了β-lase生化特性、底物轮廓、对酶抑制剂的反应性、等电点、分子量及酶结构基因定位的Richmond和Sykes分类法[6]，但最重要的方法是通过等电聚焦电泳，获得β-lase的PI，然后根据β-lase的标准酶谱对其进行分型和分类。

该法自创立以来已历时10余年，在技术上日臻完善。1975年，Metthew等将该技术用于β-lase的识别和分类后，迄今为止，国外已有不少成功的报道。国内李家泰[7]、徐晨等[8]亦用此法对耐药阴性杆菌的β-lase进行分型，但以往的凝胶多厚于2mm，且电泳时间长达18～20h[7～9]。近年，凌保东使用进口试剂副胶，成功地将超薄层等电聚焦技术用于β-lase分型，并使电泳时间大大缩短[10]。我们在其基础上进行了改进，全部采用国产试剂，改变电泳参数，进一步将电泳时间缩短到1.5小时，且结果更加满意。由于凝胶厚度直接影响到Ampholine的用量，并与电泳时间、样品分辨率以及结果的保存有关，而Ampholine的产地又与价格密切相关（进装品1300元/25ml，国产品130元/25ml），所以我们改进的技术将大大降低成本，提高分辨率。应用此法研究重庆地区革兰阴性杆菌中β-lase的分布已获成功[11]。且操作简单，值得推广应用。

参 考 文 献

[1] 施耀国，等. 抗生素 1985；10(5)：263

[2] 奥·米克斯. 色谱及有关方法的实验室手册 机械工业出版社 1986；614

[3] Ambler RP. Phil Trans R Soc Lond (Biol). 1980；289：321

[4] Matthew M, et al. J Gen Microbiol. 1975；88：169

[5] Matthew M, et al. Ibid. 1976；94：55

[6] Richmond MH, et al. Adv Microb Physiol. 1978；9：31

[7] 李家泰，杨敏君. 中华医学杂志 1984；64(8)：486

[8] 徐 晨，等. 中国抗生素杂志 1990；15(3)：196

[9] Vecoli C, et al. Antimicrob Ag Chemother. 1983；24(2)：186

[10] 凌保东，等. 中国抗生素杂志 1990；15(3)：184

[11] 钱元恕，等. Ibid. 1991；16(2)：133

（收稿日期：1992-10-14）

（下转173页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

DEVELOPMENTAL PATTERN OF LACTASE ACTIVITY OF THE SMALL INTESTINE IN RATS AND THE EFFECTS OF LACTOSE, HYDROCORTISONE AS WELL AS INSULIN ON IT

Wu Fan, et al

Dept · of Biochemistry

173 rats of *different* ages were used to observe the changes of lactase activity of small intestine during development. Sucrase and alkaline phosphatse activities were also measured. Another 60 rats were used in order to study the effects of lactose, hydrocortisons and insulin. Our results indicate that lactase activity of the small intestion of fetal rat begins to rise from prenatal period. The lactase activity sustains a very high level both in jejunum and ileum during tue first 3 weeks of postnatal development, then both decline rapidly to very low adult values. On the contrary, sucrase and alkaline phosphatase activities are high throught the whole adult life. Gastric feeding of lactose and injection of hydrocortisone or insulin reduce the rate of declination of lactase activity, but do not prevent its dropping. All of these facts reveal that lactase deficiency of adult small intestine is the normal result of developmental maturation of this enzyme in mammalian rat

KEY WORDS Jejunum; Ileum; Lactase

（上接178页）

ULTRA THIN-LAYER ISOELECTRIC FOCUSING FOR CHARACTERIZATION OF BETA-LACTAMASES

Qian Yuanshu, et al

Dept · of Infectious Diseases, The First Hospital

Analytical isoelectric focusing (IEF) is one of the high resolving power methods for protein analysis, and is also important to characterize β-lactamases by determining their isoelectric points in a stable, continuous and linear pH gradient. In this study, we improved the traditional method by setting up an ultra thin-layer polyacrylamide gel IEF to characterize β-lactamases of Gram-negative bacteria. This improved method has many advantages. Many samples can be analyzed within one block of gel. It is easy to perform and the time for electrophoresis is greatly shortened. Only small volume of sample is needed and the resolving power is high. The amount of reagents used is mueh reduced and cost lowered. By changing certain conditions, it can also be used to seperate and analyze other biological material. Thus, we believe this improved method is valuable and is highly recommendable in biochemical researches

KEY WORDS Ultra thin-layer; Isoelectric focusing; Characterization; Beta-lactamases