DOI:10.16016/j.1000-5404.1996.01.031

表1 线性关系、线性范围与检测限

组分	直线回归方程	相关系数	线性范围 (μg)	检测限 (μg)
PI	$Y=-0.374+2.551\times10^{-6}X$	0.9973	0.2～16	0.012
PS	$Y=-0.125+1.375\times10^{-6}X$	0.9991	0.2～16	0.014
PE	$Y=-0.218+6.707\times10^{-7}X$	0.9974	0.4～32	0.011
PC	$Y=-0.731+9.453\times10^{-7}X$	0.9988	0.8～64	0.031

2.3 检测限与灵敏度

在前述色谱条件下，由基线噪音计算信噪比(S/N)为2时各被测磷脂组分的检测限，结果见表1。检测限这一结果表明，本法的灵敏度是比较高的。将检测器灵敏度上调还可进一步提高本方法灵敏度，但从我们测定的数百份标本来看，这一灵敏度已足以满足生物样品测定要求。

2.4 精密度

取同一样品在1 d内重复进样5次，以计算日内变异系数。同时，对同一样品连续测定7 d，以计算日间变异系数，结果见表2。结果表明，日内及日间变异系数均小于5%，说明本法比较稳定、重复性好。

表2 变异系数与回收率

组分	日内CV (%，$n=5$)	日间CV (%，$n=7$)	回收率 (%，$n=5$)
PI	2.68	2.89	83.58±7.58
PS	2.41	2.82	87.83±6.25
PE	1.84	3.83	87.73±7.77
PC	1.32	2.82	96.67±5.93

2.5 回收率

生物体液或组织中的内源性物质的回收实验，是一较为复杂的问题，一般多采用标准加入法。我们也采用标准加入法，在同一肺组织样品中加入磷脂标准，PI、PS、PE和PC标准的加入量分别为20 μg、20 μg、40 μg和80 μg，然后按前述方法提取磷脂，计算每种磷脂的回收率，结果见表2。四种磷脂的平均回收率均在80%以上，说明本方法的准确性较高。

2.6 应用实例

我们采用本法测定了10只正常大鼠肺组织、BLCF、肝组织及肝细胞线粒体磷脂含量，结果见表3。任何生物样品只要经过磷脂提取这一预处理步骤，均可采用HPLC分离测定，且快速简便。

表3 正常大鼠肺组织、BLCF、肝细胞线粒体磷脂含量

	肺组织 (mg/g肺)	BLCF (mg/g肺)	肝细胞线粒体 (μg/mg蛋白)
PI	4.04±0.88	0.48±0.09	8.12±0.77
PS	3.26±0.87	0.32±0.16	4.27±0.63
PE	4.81±1.22	0.64±0.26	94.30±8.40
PC	38.95±6.93	6.77±1.79	106.85±9.63

关键词 磷脂类/分析；色谱法，高效液相

中图法分类号 Q545

参考文献

1 Folch J, Lees M, Stanley GHS. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animals tissues. J Biol Chem, 1957; 226: 497

2 穆魁敏，刘秉锟，燕 生等. 肺表面活性物质的检测. 北京医科大学学报，1990; 22(5): 397

3 Chen SS, Kou AY. Improved procedure for the separation of phospholipids by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr, 1982; 227(1): 25

4 汤习锋，康格非，曾成鸣. 高效液相色谱分析生物膜磷脂. 生物化学与生物物理进展，1993; 20(5): 399

(收稿：1995-05-04；修回：1996-01-04)

(编辑 刘 鹏)

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳技术的改良及其应用

An improved method for SDS-PAGE and its application

胡承香 张玉纯 李 磊 顾长国 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第一研究室) 重庆，630042

生物样品分子量的测定方法有多种，近年来，SDS-PAGE用于生物样品的分离、纯化和鉴定评价较高，其主要作用是分辨率高，设备简化，方法易行，时间短，用量少(1～5 μg)，其分离水平达10^{-9}～10^{-12}克级，凝胶透明易干燥保存[1]。我们在创伤血清免疫抑制物的分离中发现，SDS电泳制胶容易失败，为克服这

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

一难点，本室建立了一种新的封漏法和制胶技巧，既简便可靠，又经济实用，为该项技术的推广应用创造了有利条件。

1 材料和方法

1.1 试剂

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳所用试剂为电泳级或 AR 级。

1.2 方法

1.2.1 简便封漏法　封边胶制备：30%Acr-Bis 0.5 ml，3.0 mol/L Tris-HCl(pH8.8)3～3.5 ml，10%AP 0.2 ml，TEMED 15 μl，临用前配备。取平整洁净电泳玻板，加边条，夹子固定，用 2 cm 宽透明胶带紧密封边 3/4 周(加样边除外)，无皱折和气泡，再吸取 1.5 ml 封边胶内封一次，多余的胶立即弃除，铁夹固定，垂直平稳放置，约 5～10 min 胶凝结，封边完毕，胶室制成以备灌胶。

1.2.2 制胶　各试剂依次、准量、贴壁加入，充分混匀，室温静置片刻连续倾入胶室，立即加水封顶。胶凝后(30～40 min 凝结为佳)，反复用水冲洗去除未凝固的 Acr-Bis-gel 液，滤纸条沾干水迹。加样品梳和浓缩胶混合液，胶凝后(约 20～30 min)，用水反复冲洗弃除未凝的胶液，加样孔校正，长针头吸尽余水。此时弃除透明胶带和铁夹，置电泳槽固定，所得胶板平整光滑，加样方便，分离效果好。

2 讨论

垂直平板 SDS 电泳是测定分子量，分离、纯化和鉴定生物样品的好方法，但因制胶和封漏难以达到理想效果，而影响实验结果。为更好地解决问题，我们建立了一种新的封漏法，此法与其它的经典方法比较具有其突出优点：①封边胶不会浸入凝胶聚合的腔隙，阻碍凝胶的聚合。②封边胶组成与分离胶相似，导电性能好，不污染蛋白带。③无需反复进行加热、冷却，且凝结过程中不易形成裂隙，出现漏水漏胶现象。④电泳前勿需排气泡，容易清洗，剥胶。⑤重复性好，成功率高，快速简便，经济实用。

制胶技巧：SDS 电泳技术中，制胶可谓是关键一步，如果制胶失败，将造成时间浪费和经济损失。如果制成的凝胶不均匀、不平整或出现漏斗状裂痕，将直接影响实验结果。针对这一情况，我们在大量实践中摸索出制胶技巧，各试剂依次、准量混合，胶浓度愈高，AP 和 TEMED 的量愈严格控制，宁少勿多，AP 临用时配制，凝胶混合液连续倾注胶室，立即加水封顶，胶凝结后用水冲洗要彻底。制备浓缩胶时，最好是先加样品梳后灌胶，不易产生气泡。扒梳动作平稳缓慢，加样孔校直。

样品和标准蛋白处理的关键：制备 SDS 电泳样品的关键是使蛋白质变性和断开二硫键，并与 SDS 充分结合。影响它们结合的因素主要有三个：①溶液中 SDS 单体的浓度。单体的浓度与 SDS 总浓度、温度和离子强度有关。为保证蛋白质与 SDS 充分结合，它们的重量比应为 1∶3 或 1∶4。②样品缓冲液的离子强度。SDS 结合到蛋白质分子上的量仅取决于平衡时 SDS 单体的浓度，不是 SDS 的总浓度，而只有在低离子强度的溶液中，SDS 才具有较高的平衡浓度。③二硫键是否完全被还原。只有在蛋白质分子内的二硫键被彻底还原后，SDS 才能定量地结合到蛋白质分子上并使之具有相同的构象。这就是在样品缓冲液和加样前加二巯基乙醇的缘故[2]。蛋白质变性一般在 100℃水浴中保温 2～5 min。标准蛋白经同法处理，其选择原则是标准蛋白的构象和行为应尽可能与未知蛋白相似，分子量的范围略高于或低于未知蛋白的分子量。

电泳参数选择：在 SDS 电泳中，电压不应有明显变化。我们通常选用的电参数是：浓缩胶段：恒压 8 V/cm，恒流 12 mA/板；分离胶段：恒压 15 V/cm，恒流 18～20 mA/板，若电流电压急剧改变表明电泳状态不正常。实验随时观察电参数变化。每 30 min 将上下槽电极缓冲液交换，以确保电泳参数的稳定。

SDS 电泳技术在创伤血清免疫抑制物分离中的应用：我们收集家兔双后肢粉碎性骨折伤前和伤后第 1、2、4 d 血清及机械创伤病人血清，正常健康者血清作对照。血清标本与样品缓冲液适量混合，在 100℃水浴中保温 3～5 min，冷却后加 5～10 μl/管 2-巯基乙醇，离心取上清加样，点样要稳、准、快，以防样品扩散。电泳时选用恒压 8 V/cm，约 30～40 min 到达分离胶前沿，因胶浓度高，迁移阻力大而使样品压缩成一条细线，此时加压至 15 V/cm，电泳 2～3 h 结束。取胶，经考马斯亮蓝染色 2 h，在摇床上脱色过夜，其间换液 2～3 次，电泳带清晰明显。结果提示，创伤血清异常蛋白带的出现频率与创作程度正相关，创伤家兔尤以伤后第 2 天为明显，创伤病人血清出现异常蛋白带预示其预后不良。并经计算测得该异常蛋白带的分子量约为 9000，此异常蛋白质可能为创伤血清免疫抑制物[3]。

注意事项：(1)一切器皿均需洁净，尤其是电泳玻璃板和样品梳光滑平整。(2)电泳中途不能断电和振荡。(3)染色和脱色时间视样品浓度而定，随时调整。(4)水洗过程要充分，但尽力避免胶体膨胀和破裂。(5)凝胶不宜久置脱色液和蒸馏水中，宜干燥保存。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

关键词 电泳,聚丙酰凝胶
中图法分类号 R446.112

参考文献

1 周本正. SDS特殊电泳分离技术. 实用卫生检测技术大全. 北京:科学出版社,1992:94～119
2 郭尧君. SDS电泳技术的实验考虑及最新进展. 生物化学与生物物理进展,1991;18(1):32
3 李 磊,王正国,张玉纯等. 创伤家兔血清免疫抑制物的初步分离. 中华创伤杂志,1994;10(6):252

(收稿:1995-09-04;修回:1996-01-09)
(编辑 优玉福)

固定剂对染色效果影响的研究

Study on the effects of fixatives on staining

古德全 闫国和 栗永萍 (第三军医大学预防医学系防原医学教研室)重庆,630038

固定对染色效果的影响,直接关系到组织化学染色的成败和质量的高低。为此,我们观察研究了7种固定剂对13种不同染色效果的影响,并简要阐述了有关固定的作用机理与染色效果的相关性和出现染色差别的主要原因。为准确选择适当的固定剂和染色方法,提供了可靠依据。

1 材料和方法

雄性健康小鼠,体重25 g左右,使颈椎脱位活杀,取十二指肠,剪成若干段,分别放入10%中性缓冲福尔马林(NBF)固定24 h、酒精-甲醛(AF)3 h、甲醛钙(Fca)24 h、Carnoy氏液3 h、Bouin氏液24 h、Karnorsky氏液4℃ 12 h、Helly氏液12 h;固定条件及冲洗步骤均按各固定剂的要求。固定后同时按常规脱水、透明和浸蜡,并将各固定剂固定的组织块依次包埋在一个蜡块上。连续切片数十张,其厚度均为4 μm。分别用ABC免疫组化法,以抗Ⅳ型胶原单克隆抗体(重庆医科大学病理生理教研室提供)为一抗显示基底膜;用SP法,以兔抗第Ⅷ因子相关抗原(迈新公司出售)和羊抗鼠IgA(sigma)为一抗分别显示血管内皮第Ⅷ因子和固有层内浆细胞;用PAS法和六胺银法分别显示粘多糖;AB法显示酸性粘多糖;Feulgen-AB法显示DNA和酸性粘多糖;Feulgen改良法显示DNA;Schiff-亚甲兰法显示DNA和RNA、天青Ⅰ伊红法显示浆细胞;Weigert氏间苯二酚品红法显示弹力纤维(EF);V.G法显示胶原纤维。光镜对比观察,并按染色的优劣和组织细胞结构的破坏程度评估分值,极好91～100分,好81～90分,较好71～80分,一般61～70,较差51～60,差41～50分,极差21～40分,阴性或阳性移位为0分。

2 结果

ABC法显示基底膜,以NBF固定最好,尤其对小肠绒毛上皮细胞基底膜显示很清楚;其次是Fca(图1);AF和Bouin氏液固定除粘膜下及隐窝周围略显弥漫性阳性外,其余部位均阴性(图2);Carnoy、karnorsky和Helly氏全为阴性。SP法显示血管内皮第Ⅷ因子,以Fca固定最佳,在粘膜下层固有层的血管内皮及毛细血管中有较多的均匀的棕黄色颗粒,背景清晰,对比度很好;NBF固定的同Fca相差不多,只是清晰度略次;Bouin氏液固定的亦可,只是反应强度不如NBF;AF固定的血管内皮细胞只有少量的阳性颗粒,清晰度也差,尤其组织和细胞结构严重破坏;Carnoy和Helly氏液固定的基本相同,均只在粘膜下血管内皮有少量阳性颗粒,而固有层毛细血管全为阴性;Karnorsky氏液固定的各部血管全阴性。SP法显示浆细胞,以Carnoy氏液和Bouin氏液固定的最好,固有层内有大量阳性细胞,背景清晰,对比度十分好(图3);NBF、Fca、Helly氏和AF固定的阳性反应差不多,均强度差,清晰度不够,尤其AF固定的非特异性着色较强;Karnorsky氏液固定的全阴性。天青Ⅰ伊红法显示浆细胞,以AF固定最好,色彩鲜艳、清晰,但组织和细胞收缩明显;其次是NBF和Fca;Carnoy氏液固定的细胞核着色浅;Karnorsky氏液固定的细胞着色深,但细胞界线模糊不清;Bouin和Helly氏液固定的胞核均几乎不着色(图4)。PAS法显示粘多糖,以Carnoy氏液固定的最好,绒毛上皮细胞游离缘和杯状细胞强阳性,基底膜也有轻度到中度阳性反应;AF、Fca、NBF、Bouin氏液固定的,只胞核着色不同程度的不如Carnoy氏;Karnorsky氏液固定的阳性反应弥漫,对比度十分差。六胺银法显示粘多糖,以Bouin氏液固定的最好,杯状细胞和上皮细胞游离缘以及基底膜均强阳性,对比清楚;NBF、Fca、AF和Carnoy氏液固定的,只基底膜显示较差,其余部位的阳性反应和Bouin氏液基本相同;Karnorsky氏液固定的阳性反应弱,对比度差;Helly氏液固定的,除杯状细胞有阳性反应外,其余部位均阴性。AB法显示酸性粘多糖,7种固定剂固定的均有阳性反应,而且部位相同;但从清晰度看,Carnoy氏液最好;Karnorsky氏液最差。Feulgen-AB法显示DNA和酸性粘多糖及用改良Feulgen法显示DNA,均以Carnoy氏液固定最好;Bouin氏液最差;其余几种固定亦可。Schiff-亚甲兰法显示

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net