

# 凝胶电泳法在羊毛防毡缩整理中的应用

陆必泰 陈明珍

(武汉科技学院, 武汉, 430073)

**摘要:**介绍聚丙烯酰胺凝胶电泳法的电泳原理、凝胶分离柱的组成及其制备方法。经过聚氨酯预聚体整理剂整理后的羊毛,其提取物蛋白质成分含量较少,从而起到了保护羊毛细胞间填充物的功能。

**关键词:**聚丙烯酰胺 凝胶 电泳 羊毛 防毡缩整理

中图分类号: TS 195.56 文献标识码: A 文章编号: 0253-9721(2004)02-0051-02

圆盘电泳法是聚丙烯酰胺凝胶电泳的一种,电泳时缓冲液的 pH 值、离子组成、凝胶浓度等是非连续性的。通常是在直径为 5 mm 的电泳玻璃管内合成制备凝胶分离柱,然后进行电泳分离。分离柱由试料凝胶、粗孔凝胶和细孔凝胶 3 种凝胶层组成。电泳时试料先进入试料凝胶,经粗孔凝胶浓缩后,进而在细孔凝胶中进行分离,其电泳原理<sup>[1]</sup>如图 1 所示。

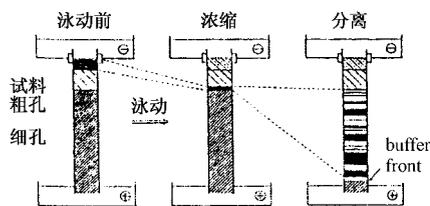


图 1 圆盘电泳原理示意图

在羊毛防毡缩整理中,主要用于羊毛细胞间填充物  $\delta$  蛋白质成分的分析。在电泳过程中,其泳动速度主要取决于蛋白质分子的大小和带电状况。为了消除蛋白质带电状况对电泳速度的影响,电极槽中所使用的缓冲溶液选用迁移速度大的阴离子即  $\text{Cl}^-$ 。此时,在特定条件下蛋白质的电泳速度只取决于蛋白质分子的大小,从而达到分离蛋白质的目的。

## 1 实验

### 1.1 试料及主要药品

试料:  $\delta_L$ 、 $\delta_H$ 、PU $\delta_L$ 、PU $\delta_H$ ; 药品: 丙烯酰胺、亚甲基双丙烯酰胺、NNN'N'-四甲基乙二胺(TEMED)、乙氨酸、过硫酸铵(APDS)、三羟甲基甲胺、尿素、蔗糖、BPB(蓝色色素)、酸性黑 10B、醋酸。

### 1.2 分离柱的制备

1.2.1 pH 为 9.5 的尿素凝胶原液组成 凝胶原液的组成见表 1。

1.2.2 分离用凝胶溶液组成 pH 为 9.5、丙烯酰胺

5.8%,其组成见表 2。

表 1 凝胶原液组成

药品	10 N HCL (mL)	三羟甲基甲胺 (g)	TEMED (mL)	10 M 尿素 (mL)	丙烯酰胺 (g)	亚甲基双丙烯酰胺(g)
A 液	0.24	1.6	0.116	16	-	-
B 液	0.24	1.452	0.23	16	-	-
C 液	-	-	-	16	7.04	0.188

表 2 分离用凝胶溶液组成

	A 液(mL)	C 液(mL)	8 M 尿素(mL)	APDS(mg)
第 1 液	8.0	4.5	15	-
第 2 液	-	-	7.5	11.25

1.2.3 浓缩用凝胶溶液组成 pH 为 9.5、丙烯酰胺 5.4%,其组成见表 3。

表 3 浓缩用凝胶溶液组成

	B 液(mL)	C 液(mL)	8 M 尿素(mL)	APDS(mg)
第 1 液	3.6	3.6	15.6	-
第 2 液	-	-	6.0	9.0

1.2.4 分离柱的制备方法 将内径为 5 mm、长度为 80 mm 的电泳玻璃管洗净后,固定在凝胶制备台上;并在离上管口 12 mm、20 mm 处做上标记。制备细孔凝胶时,将分离用凝胶溶液混合后注入玻璃管内,使液面达到第一刻度线,然后在分离凝胶溶液上方注入 5 mm 高度的蒸馏水。凝胶化过程在室温下进行,约 45 ~ 60 min;制备粗孔凝胶时,将浓缩用凝胶溶液混合后,在分离凝胶上方注入到第二刻度线后,注入蒸馏水,室温约 10 h。

### 1.3 试料层溶液组成

试料层溶液组成及用量见表 4。

表 4 试料层溶液组成及用量

组成	10 N HCL (mL)	三羟甲基甲胺 (g)	10 M 尿素 (mL)	30 %蔗糖 (g)	蒸馏水	总量 (L)
用量	12.0	7.51	800	300	适量	1.0

### 1.4 电极槽用缓冲液的配制

缓冲液的组成及用量见表 5,pH 值为 8.5。

表5 缓冲液的组成

组分	三羟甲基甲胺 (g)	乙胺酸 (g)	1 N HCL (mL)	蒸馏水	总量 (L)
用量	6.0570	6.0056	14	适量	1.0

## 1.5 电泳实验

1.5.1 试料准备 将玻璃管分离柱从凝胶制备台上取出,装入电泳仪。然后在电泳玻璃管上方注入适量的试料溶液,并分别加入含量为 10 mg/mL 的试料样品  $\delta_L$ 、 $\delta_H$ 、 $PU\delta_L$  和  $PU\delta_H$  各 100  $\mu$ L,试料样品的制备方法见文献[2]。最后加入 0.05% 的 BPB 水溶液 1 滴。当试料层溶液稳定后,在电极槽上、下槽中装满缓冲液。

1.5.2 电泳条件及其泳动 电极极性:上方电极槽为阴极,下方电极槽为阳极;通电量:3 mA/1 支分离柱,8 支分离柱共 24 mA;通电后从 BPB 溶液(蓝色)的迁移可以看到试料蛋白质的泳动。当进入分离凝胶柱后,游离的 BPB 呈紫色,和蛋白质结合的 BPB 呈蓝色。随着电泳时间的延长,不同分子量的蛋白质在分离凝胶柱中的移动距离出现了差异,游离的 BPB 移动速度最快,当游离的 BPB 移动到距玻璃管下端 10 mm 位置时,终止泳移。

1.5.3 分离柱的取出 电泳终止后,从上方电极槽中取出玻璃管,用注射器往管壁和凝胶柱间注入蒸馏水,取出凝胶分离柱后,浸泡在蒸馏水中。

## 1.6 染色与脱色

将取出的凝胶分离柱分别用浓度为 0.05% 酸性黑 10B(7% 的醋酸水溶液溶解配制)室温染色 10 h,在酸性条件下凝胶分离柱中的蛋白质和酸性染料发生结合,呈现颜色。染色完毕后,用 7% 醋酸液进行脱色处理。在脱色过程中,没有和蛋白质结合的染料从凝胶微孔中透析出,和蛋白质结合的染料存留在凝胶分离柱中呈现颜色,从而可由凝胶分离柱中的颜色分布状态来确认蛋白质的泳动状况。

## 2 结果及其分析

### 2.1 电泳结束时间

电泳开始后,试料  $\delta_H$  耗时 123 min、 $\delta_L$  耗时 129 min、 $PU\delta_L$  和  $PU\delta_H$  耗时 146 min,电泳过程全部结束。试料  $PU\delta_L$  和  $PU\delta_H$  耗时较长是因为该试料蛋白质和整理剂  $I_m$ -PEG $I_m$  发生了化学反应,分子量变大使得泳移速度变慢的缘故。

### 2.2 提取物的电泳图

试料通过电泳仪电泳,经染色、脱色,拍摄成照

片后的电泳图如图 2 所示。

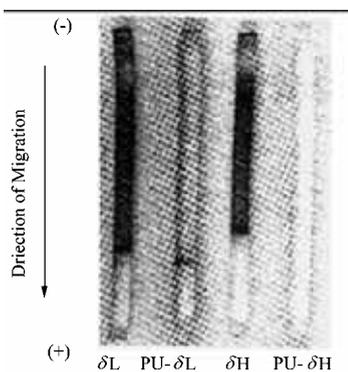


图2 聚丙烯酰胺凝胶园盘电泳图

由图 2 可知:在相同的条件下用甲酸处理所得到的提取物  $\delta_L$  和  $PU\delta_L$ ,其电泳图差别很大。 $\delta_L$  为:整个凝胶分离柱都为色谱带,表明蛋白质呈分散状存在,在其下方有一段浓色的谱带,表明在此谱带区蛋白质含量较高。而

只有这部分谱带在  $PU\delta_L$  的电泳图中才会出现,从而可以说明经整理的羊毛用甲酸处理后,其细胞间填充物的损失较少。

$\delta_H$  的情况和  $\delta_L$  相似,整个凝胶分离柱都为色谱带,在色谱带的下方也有一段浓色的谱带,表明此领域蛋白质浓度较高。而  $PU\delta_H$  凝胶分离柱中没有色谱带,则说明整个凝胶分离柱中没有蛋白质存在,因此可以认为:该部分细胞间填充物与 2 官能度的预聚体整理剂发生了化学反应,存留在羊毛细胞间接合部,从而证明聚氨酯预聚体整理剂整理羊毛后,起到了保护羊毛细胞间填充物的功能。

## 3 结论

1. 聚丙烯酰胺凝胶园盘电泳法,用于羊毛细胞间填充物蛋白质成分的分析是一种有效的分析方法,其电泳图图像清晰,结果直接明了。

2. 作为聚丙烯酰胺凝胶园盘电泳法最核心的技术是凝胶分离柱的组成与制备,本试验所制备的凝胶分离柱能很好的用于羊毛细胞间填充物蛋白质成分的分析。

3. 由电泳结果可知:当羊毛用整理剂整理后,其细胞间填充物与 2 官能度的预聚体发生了化学反应,存留在羊毛细胞间接合部而呈现颜色,从而证明聚氨酯预聚体整理剂整理羊毛后,起到了保护羊毛细胞间填充物的功能。

## 参 考 文 献

- 1 Medical Technology. 电泳法大全—实技篇. 日本医牙药出版社, 59~64.
- 2 陆必泰等. 稳定性聚氨酯预聚体对羊毛细胞间填充物的保护. 日本福井大学学报, 1989(26): 71~79.