

## · 短篇报道 ·

## Tricine-SDS-PAGE 法分析腮腺唾液蛋白

郭颖 罗海燕 黄宁 杨美霁 吴琦 王伯瑶

多种口腔疾病或系统性疾病的发生、发展过程中,唾液成分的质和量都可能发生改变<sup>1</sup>。唾液蛋白作为唾液的主要有机成分,与唾液的多种生理功能密切相关<sup>2</sup>。因此研究唾液蛋白对于了解机体的生理及病理状况具有重要意义。十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)是常用的唾液蛋白的分离方法。传统的 SDS-PAGE 系统由 Laemmli 建立,该系统对分子量在 20 kD 以下的蛋白分离欠佳<sup>3</sup>,需通过繁琐的操作制备梯度凝胶。而腮腺唾液的主要成分富脯蛋白和富组蛋白的分子量为 10~40 kD 和 3~5 kD,故分析腮腺唾液蛋白需要对 Laemmli 的方法进行改进。既往研究发现经 SDS-PAGE 电泳后,唾液富脯蛋白难以着色,但可去除乙酸脱色液中的其他有机溶剂成分,使富脯蛋白发生变色效应呈紫红色,与其它蛋白区分<sup>4</sup>。

本实验旨在 Laemmli 方法的基础上,采用 N-三羟甲基甘氨酸(Tricine)代替常用的甘氨酸,用 Tricine-SDS-PAGE 方法慢离子电泳分析腮腺唾液蛋白,探求适合于腮腺唾液蛋白分析的电泳方法,同时改进常规的染色方法,确定 CBB R-250 染色后紫红色区带和蓝色区带的数目,为进一步研究唾液蛋白提供方法学依据。

## 1 材料和方法

## 1.1 试剂

Tricine 购自 Merck 公司,聚丙烯酰胺凝胶电泳试剂及蛋白质分子量标准品均为 Gibco 产品,其余试剂为国产分析纯。

## 1.2 腮腺唾液的收集和處理

试验时,每隔 20 秒在舌尖部滴一滴 2.5% 柠檬酸以刺激唾液分泌。用仿制的 Carlson-Crittenden 装置收集禁食 2 小时后(上午 10:00~12:00)的刺激性腮腺唾液。收集 3 ml 唾液于刻度离心管内,然后取出 100  $\mu$ l 唾液,加入等体积 2 $\times$ SDS 样品缓冲液,内含 8% (0.28 mol/L) SDS, 24% (3.29 mol/L) 甘油, 100 mmol/L Tris, 4% (0.57 mol/L) 巯基乙醇及溴酚蓝, -30 $^{\circ}$ C 冰冻保存备用。依此法先后收集 25 名正常青年、7 例牙龈炎及 13 例牙周炎患者腮腺唾液为样品。

## 1.3 腮腺唾液蛋白含量的测定

蛋白含量的测定采用考马斯亮蓝 G-250 (CBBG-250) 微板法<sup>5</sup>,以牛血清白蛋白(BSA)为标准。

## 1.4 腮腺唾液蛋白的 Tricine-SDS-PAGE 分析

参照 Schagger 等<sup>3</sup>的方法进行。电泳装置为 Mini-pro-

tean II 型电泳仪(Bio-rad 产品),板胶厚 0.75 mm。分离胶浓度分别为 16.5% 和 10%,浓缩胶浓度为 4%。采用不连续缓冲系统,阳极缓冲液为 0.2 mol/L Tris (pH 8.9),阴极缓冲液为 0.1 mol/L Tricine 内含 0.1% (3.47 mmol/L) SDS 和 0.1 mol/L Tris (pH 8.25),凝胶缓冲液为 3 mol/L Tris 内含 0.3% (0.01 mol/L) SDS (pH 8.45)。唾液样品经 40 $^{\circ}$ C 水浴 30 分钟后,在每样品池内加样 15  $\mu$ l,于 80 V 恒压电泳。电泳后,用两种染色方法处理凝胶。方法 1: 以含 0.1% (1.2 mmol/L) 考马斯亮蓝 R-250, 40% 乙醇, 10% 乙酸的染液染色 7 小时, 10% 乙酸脱色过夜。方法 2: 以含 0.1% (1.2 mmol/L) 考马斯亮蓝 R-250, 46% 甲醇, 9% 乙酸的染液染色 7 小时, 以含 10% 乙酸, 25% 甲醇的脱色液脱色过夜。

## 2 结果

腮腺唾液经 16.5% Tricine-SDS-PAGE, CBB R-250 染色, 10% 乙酸脱色,可分离出 15 条以上蛋白区带,分子量在 3~100 kD,其中有十多条呈紫红色的富脯蛋白区带(图 1)。若脱色液中含有甲醇(方法 2),则蓝色区带仍很明显,但未显现紫色区带(图 2)。此外,从图 1、图 2 还可以看到,不同个体蛋白区带的染色深浅不一,表明腮腺唾液蛋白的 Tricine-SDS-PAGE 电泳图谱存在明显的个体差异。

腮腺唾液经 10% Tricine-SDS-PAGE 分析,不同的染色方法得到的电泳图谱与 16.5% 的板胶相似,但对分子量在 43 kD 以上的蛋白区带分离效果优于 16.5% 的板胶。

## 3 讨论

Tricine-SDS-PAGE 可使小分子量蛋白得到很好的分离,16.5% 的 Tricine-SDS-PAGE 适于分离分子量在 1~70 kD 的蛋白。本实验结果发现采用 16.5% 的 Tricine-SDS-PAGE 使主要的腮腺唾液蛋白都得到较好的分离。这与用 5%~20% 的梯度凝胶电泳结果相似<sup>6</sup>。而且通过调节凝胶浓度,也可使高分子量蛋白得到很好的分离。本实验采用的 10% Tricine-SDS-PAGE 对分子量在 43 kD 以上的蛋白分离效果好。由于电泳系统内没有尿素和甘氨酸,不会影响蛋

作者单位: 610041 华西医科大学口腔医学院(郭颖,罗海燕,杨美霁),华西医科大学感染与免疫研究室(黄宁,吴琦,王伯瑶)

蛋白质氨基酸序列的测定。

本实验采用两种染色方法对电泳后的凝胶进行处理,发现 CBB R-250 染色, 10% 乙酸脱色, 可以清晰地显现紫红色的富脯蛋白区带, 而脱色液中含有甲醇的方法只显出蓝色区带。本实验进一步证实了 Beeley 等的观点。富脯蛋白的这种变色效应与 CBB R-250 和富脯蛋白的特殊结构有关<sup>6</sup>。

本实验结果表明不同个体之间唾液蛋白存在明显差异。牙周病患者与正常个体腮腺唾液蛋白 Tricine-SDS-PAGE 电泳图谱的差别是由疾病所致还是个体差异的缘故, 有待进一步研究。

本实验采用的 Tricine-SDS-PAGE 方法分析腮腺唾液蛋白, 操作简便, 不必对唾液样品进行脱盐、浓缩等处理, 可直接加样, 样品用量少, 分辨率高, 尤其适合于小分子量蛋白的分离。此方法还可以应用于全唾液及颌下腺-舌下腺唾液蛋白的分离纯化。

(本文图见中心插页 8)

#### 4 参考文献

- 1 Mandel D. The diagnostic uses of saliva J Oral Pathol Med, 1990, 19 (3): 119~ 125
- 2 杨萍综述 唾液蛋白质的研究进展 国外医学口腔医学分册, 1993, 20 (2): 78~ 82
- 3 Schagger H, Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal Biochem, 1987, 166: 368~ 379
- 4 Beeley JA. Clinical applications of electrophoresis of human salivary proteins J Chromatogr, 1991, 569: 261~ 280
- 5 李成文主编 现代免疫化学技术 北京: 军事医学科学院微生物流行病学研究所出版社, 1990: 6
- 6 Beeley JA, Sweeney D, Lindsay JC, et al. Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis of human parotid salivary proteins. Electrophoresis, 1991, 12: 1032 ~ 1041

(1998-09-15 收稿)

## 菌斑中超氧化物阴离子自由基的测定

阎 鹏 黄力子 王成龙 王多宁

菌斑作为龋病病因的始动因素, 已经得到公认。为了更深入研究菌斑、氧自由基与龋病发病的关系, 作者对菌斑中氧自由基进行检测。

### 1 材料和方法

#### 1.1 主要仪器和试剂

发光光度计 (DG3030 型, 华东电子管厂); 分析天平 (1/100000, 上海分析仪器厂); 匀浆器 (6 ml, 第四军医大学玻璃试验设备室制); Lumino1 液 (简称 L), 0.1 mmol, PB CB=1:1 体积比, pH=9.0 (第四军医大学化学教研室制); 牛血超氧化物歧化酶 (SOD), 生理盐水稀释浓度为 0.1 mg/ml (甘肃省夏河生物制剂厂); 生理盐水 (简称 NS, 陕西省康乐制药厂); 96 孔培养板 (瑞士产); 酶联免疫检测仪 (DG2022A 型)。

#### 1.2 实验原理<sup>1</sup>

由于自由基很不稳定, 无法分离, 用化学方法检测自由基比较困难。但可以用间接方法证明自由基的存在。本实验利用化学发光剂 Lumino1 与自由基反应, 使之激活, 当其返回基态时就向外发光, 用发光光度计可计数。超氧化物歧化酶能特异抑制超氧化物阴离子自由基, 所以能抑制 Lumino1 的发光。根据组织发光强度是否被抑制可以间接检测超

氧化物阴离子自由基。

#### 1.3 实验方法

1.3.1 样品采集<sup>2</sup> 选择无口腔软组织炎症、无牙周疾病的志愿者 31 例, 男性 14 人, 女性 17 人, 年龄 16~ 40 岁。采样前 24 小时禁止口腔卫生, 正常饮食。样品采集前用清水充分漱口以去除食物残渣及软垢。收集自然非刺激性混合性唾液 1 ml, 为对照组; 再用棉垫隔离牙菌斑收集区, 用无菌蜡刀和探针刮取全牙面菌斑 (下颌前牙区除外), 用菌斑染色剂检测所取部位, 若该部位仍残留部分菌斑, 则上述所取菌斑为有效, 为实验组。否则为无效。取样均在上午 8~ 9 时, 10 时进行发光强度测定。

1.3.2 实验步骤 先测定发光值强度。测定条件为 25℃, 60 秒。实验组样品加 1.0 ml NS, 匀浆管内匀浆, 取 0.1 ml 匀浆液置于化学发光管中, 分别加 NS 或 SOD 液 10 μl 测定本底后, 加 L 液 0.1 ml 进行化学发光测定, 得到 (NS+L) 组和 (SOD+L) 组发光值。同法取 0.1 ml 唾液分别加 (NS+L) 和 (SOD+L) 测定发光值作为对照组值。

蛋白定量<sup>3</sup> 采用考马斯亮蓝法测定。取 0.5 mg/ml 牛

作者单位: 710032 第四军医大学口腔医学院口腔预防医学教研室 (阎 鹏, 黄力子, 王成龙), 基础部化学教研室 (王多宁)