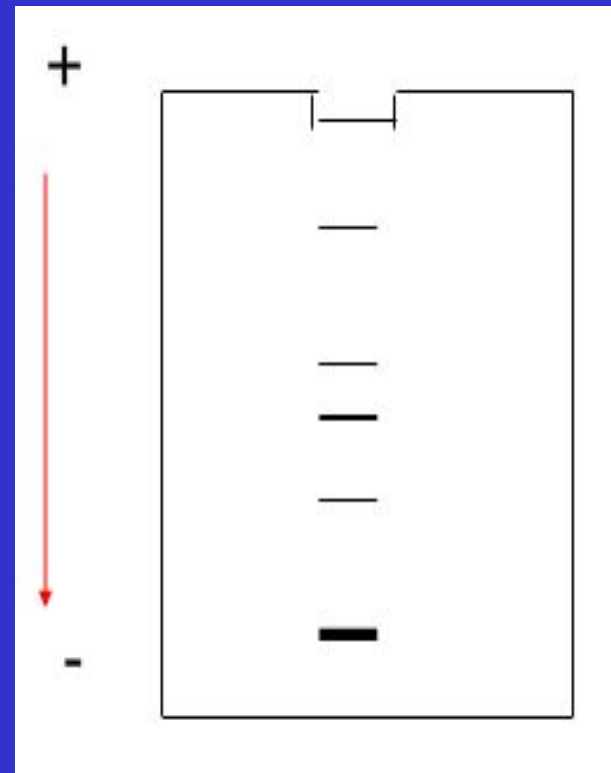


醋酸纤维薄膜电泳法 分离血清蛋白质

电泳分离、分析和鉴定带电粒子

- ❖ 在一定的电场条件下，每一种分子都具有特定的电荷、大小及形状，在一定时间内它们在相同电场中泳动速度不同，各自集中在特定的位置上而形成紧密的泳带，进而达到分离目的。



实验目的

- ❖ 掌握醋酸纤维素薄膜电泳分离血清蛋白质的基本原理；
- ❖ 熟悉基本操作过程；
- ❖ 了解方法学评价和临床意义。

实验原理

人血清中蛋白质的等电点及分子量

蛋白质名称	等电点 (pI)	分子量
血清蛋白	4.88	6900
α —球蛋白	5.06	α_1 —200 000
		α_2 —300 000
β —球蛋白	5.12	90 000—150 000
γ —球蛋白	6.85—7.50	156 000—300 000

实验原理

-

实验原理

- ❖ 由于染色时染料与蛋白的结合量与区带中的蛋白量成正比，因此，将蛋白染色区带剪下，经洗脱、比色或经透明处理后直接用光密度计扫描，即可计算出各区带蛋白的相对百分数。

$$\text{各区带蛋白质}\% = \frac{A_x}{A_T} \times 100$$

AX表示各区带蛋白质（Alb， α_1 、 α_2 、 β 和 γ -球蛋白）的吸光值

AT表示各区带蛋白质的吸光值总和

区带蛋白绝对浓度（g/L）＝

血清总蛋白（g/L）×各区带蛋白百分浓度（%）

试剂和器材

❖ 一、试剂

(1)新鲜血清

(2)巴比妥-巴比妥钠缓冲液(pH8.6): 称取巴比妥1.66g和巴比妥钠12.76g, 溶于少量蒸馏水后定容1000ml。

(3)染色液: 称取氨基黑10B0.5g, 加入蒸馏水40ml, 甲醇50ml和冰醋酸10ml, 混匀, 贮存于试剂瓶中。

(4)漂洗液: 取95%乙醇45ml, 冰醋酸5ml和蒸馏水50ml, 混匀。

❖ 二、器材

电泳仪、电泳槽、醋酸纤维素薄膜、点样器、滤纸、剪刀、镊子。

操作方法

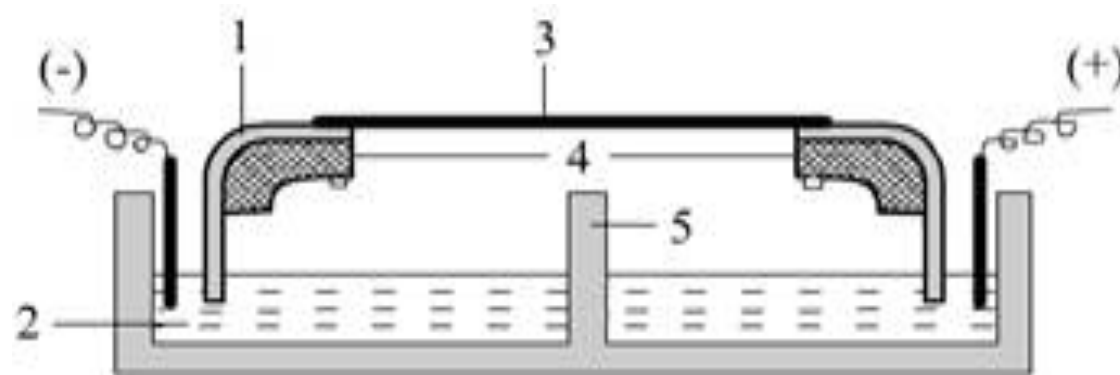
❖ 一、醋酸纤维素薄膜的润湿和选择

将 $2 \times 8\text{cm}$ 醋酸纤维薄膜迎着光辨别光泽面和无光泽面。在无光泽面距短边一端 1.5cm 处用铅笔轻轻画一条点样线，将薄膜无光泽面朝下放入缓冲液中浸泡 20min ，整条薄膜颜色一致且无白色斑点，方可用于点样。（使用镊子拿取薄膜）

❖ 二、制作电桥

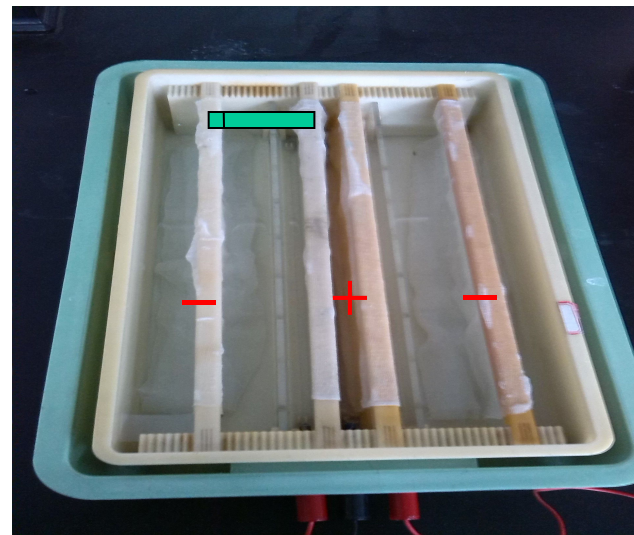
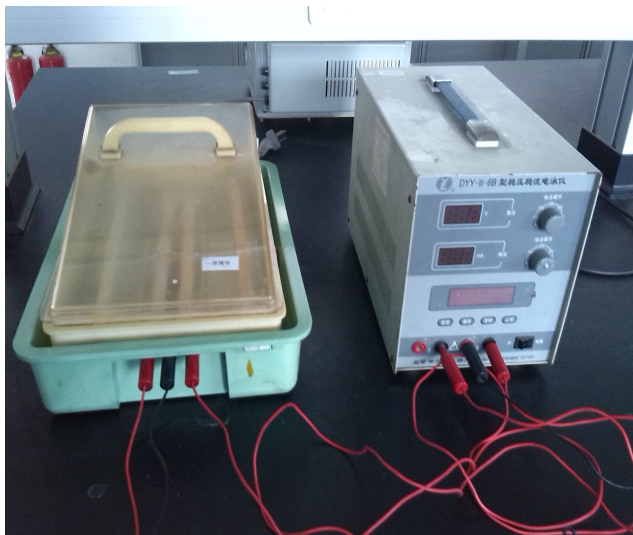
在两个电极槽中，各倒入等体积的电极缓冲液（巴比妥缓冲液， $\text{pH}=8.6$ ）。在电泳槽的两个膜支架上各放两层纱布，使纱布一端的长边与支架前沿对齐，另一端浸入电极缓冲液内。当纱布全部润湿后，用玻璃棒轻轻挤压在膜支架上的纱布以驱逐气泡，使纱布的一端能紧贴在膜支架上。纱布是两个电极槽联系醋酸纤维素薄膜的桥梁。

操作方法



醋酸纤维薄膜电泳装置示意图

- 1. 滤纸桥
- 2. 电泳槽
- 3. 醋酸纤维素薄膜
- 4. 电泳槽膜支架
- 5. 电极室中央隔板



操作方法

❖ 三、点样

用镊子取出浸透的薄膜，夹在两层粗滤纸内吸去多余的缓冲液，然后平铺滤纸上（无光泽面朝上）。同时，取一玻璃载玻片在上面滴一滴血清，点样器（用盖玻片的一边）在血清上蘸一下（可来回移动一次），再将点样器轻印在加样线上，使血清渗透到薄膜内，形成均匀的直线。



注意：不能超出边缘；不能重复点样；必须与短边平行；要适量、均匀，并避免弄破薄膜。

操作方法

❖ 四、电泳

用镊子将点样端的薄膜平贴在阴极电泳槽支架的滤纸桥上(点样面朝下)、另一端平贴在阳极端支架上。要求薄膜紧贴滤纸桥并绷直,中间不能下垂。盖上电泳槽盖。用导线将电泳槽的正、负极与电泳仪的正、负极分别连接,接通电源,在室温下电泳,电压160V,电泳30min。

❖ 五、染色与漂洗

电泳完毕后,切断电源,用镊子将薄膜取出,直接浸于氨基黑10B染色液中,5min后取出。再浸泡于漂洗液,反复漂洗,直至背景无色、电泳条带清晰为止。

❖ 六、结果判断

一般经漂洗后，薄膜上可呈现清晰的5条区带，由正极端起，依次为清蛋白、 α_1 -球蛋白、 α_2 -球蛋白、 β -球蛋白和 γ -球蛋白。

注意事项

- ❖ 1、醋酸纤维素薄膜一定要充分浸透后才能点样。点样后电泳槽一定要密闭。
- ❖ 2、点样时，应将薄膜表面多余的缓冲液用滤纸吸去，以免引起样品扩散。但不宜太干，否则样品不易进入膜内，造成点样起始点参差不起，影响分离效果。
- ❖ 3、点样时，动作要轻、稳，用力不能太大，以免损坏膜片或印出凹陷影响电泳区带分离效果。
- ❖ 4、点样前沿要平，点样好坏是电泳图谱是否清晰的关键。
- ❖ 5、点样量要控制好，少则区带不清，多则有拖尾现象。
- ❖ 6、电泳槽的正、负极与电泳仪的正、负极分别连接，注意不要接错。
- ❖ 7、通电过程中，不准取出或放入薄膜。通电完毕后，应先断开电源后再取薄膜，以免触电。

临床意义

临床意义

- 正常值： 白蛋白： 57 ~ 72%
 α_1 球蛋白： 2 ~ 5%
 α_2 球蛋白： 4 ~ 9%
 β 球蛋白： 6.5 ~ 12%
 γ 球蛋白： 12 ~ 20%
- 急性肝炎：发病早期蛋白质电泳无变化，发病两周后白蛋白、 α_2 及 β 球蛋白减少， γ 球蛋白增高。
- 慢性肝炎： γ 球蛋白升高，白蛋白下降较急性肝炎显著。
- 肝硬化：白蛋白、 α_1 、 α_2 球蛋白均明显下降， γ 球蛋白极度升高，甚至 A/G 比值倒置。
- 肾病综合征时，白蛋白降低， α_2 、 β 球蛋白升高。

方法评价

- ❏ **优点** CAM电泳灵敏度高，标本用量少，分辨率高，区带清晰，电泳时间短，操作简便快捷。CAM对染料不吸附，蛋白区带均匀，背景清晰，既可比色定量，又可透明后进行光密度扫描。
- ❏ **缺点** 有轻微电渗现象，薄膜吸水性差，电阻容易增大。当电流较大时，薄膜中水分极易蒸发，造成蛋白质分子变性破坏。

思考题

1. 血清蛋白醋酸纤维素薄膜电泳图谱分离不清或不整齐，最常见的原因有哪些？
2. 简述血清蛋白醋酸纤维素薄膜电泳的优缺点。