

区带毛细管电泳法检测牙鲆血清 蛋白组成的研究*

王宏田 张培军

(中国科学院海洋研究所)

毛细管电泳技术是近年来逐步发展、完善的一项新的分析检测手段。其中区带毛细管电泳技术应用得较为普遍。由于所需样品量少,操作简便、快速,检测灵敏,因此毛细管电泳技术被广泛用来分析和分离多肽,蛋白质,糖蛋白,寡聚核酸等物质(Siles *et al.*, 1997; Leeds *et al.*, 1996)。在国外已开始用区带毛细管电泳技术来研究免疫球蛋白的稳定性(Dai *et al.*, 1998),分析人血清蛋白的组成,并尝试作为临床诊断手段(Voelter *et al.*, 1998),但这一技术在海洋科学研究领域还未获得应用。通常鱼类血清中蛋白质的含量以及蛋白组分的变化,可以用来判断鱼体免疫功能的水平。用区带毛细管电泳方法来检测蛋白质样品,不但能够检测出样品的种类,同时能够较准确地检测出各种蛋白质的含量,是一种理想的方法。本文作者第一次试用毛细管电泳技术分析牙鲆血清蛋白的组成,并比较了在一定条件下血清蛋白组成的变化。

一、材料与方 法

1. 毛细管电泳仪

实验用毛细管电泳仪为伯乐公司生产的 Bio-Rad Biofocus 3000 型毛细管电泳分析系统。

2. 牙鲆的获取

实验用牙鲆由荣城市寻山养殖场提供,3 条牙鲆的平均体重为 $350 \pm 30\text{g}$ 。

3. 血清样品的制备

用无菌采样器从牙鲆的尾静脉中抽取血液,于 4°C 放置 24 h,血细胞凝集,与血清分离,收集上层血清,然后于 4°C ,以 $10\,000\text{r/min}$ 的转速离心 15 min,收集上清液。将 3 条牙鲆的血清混合进行测定,或者于 -30°C 保存待测。

4. 样品分析

依照仪器说明书推荐的方法,将血清样品用浓度为 0.02 mol/L , pH 为 8.7 的硼酸-

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 3847 号。
国家 973 课题“鱼类的特异性免疫系统和疫苗免疫”资助项目, G1999012006 号。
收稿日期: 1999 年 12 月 7 日。

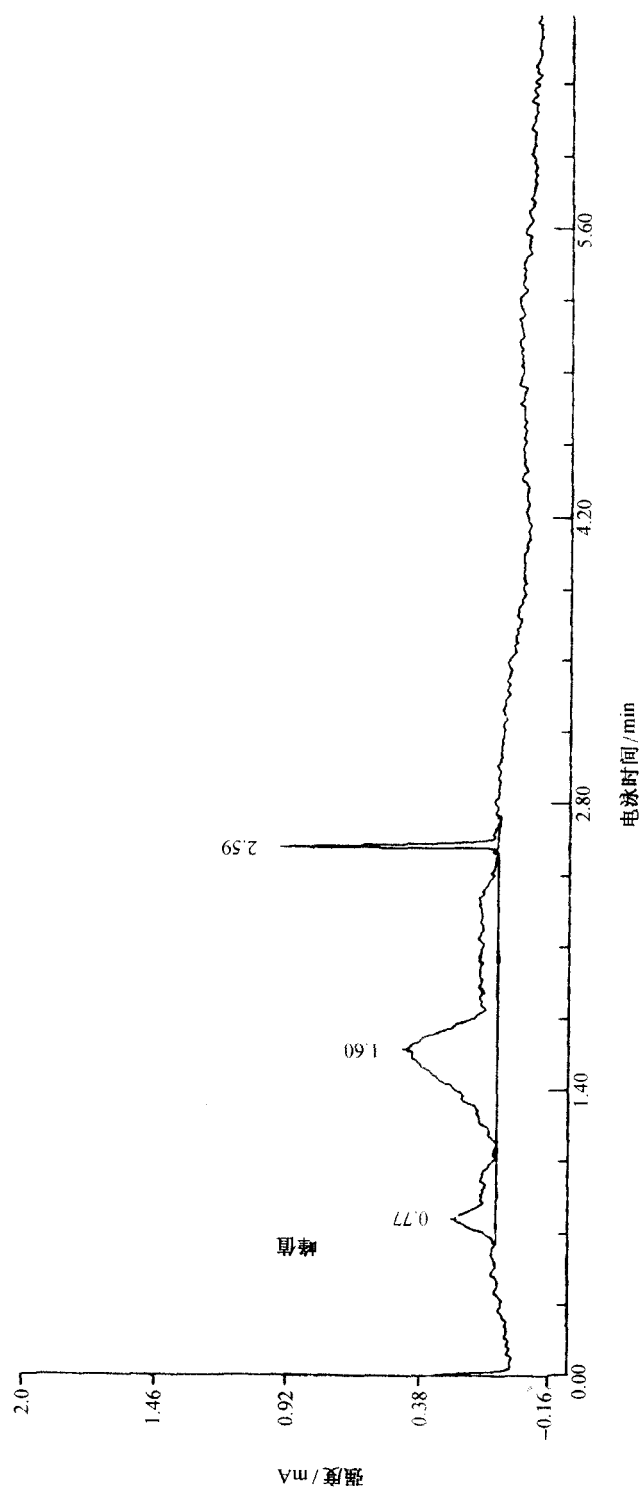


图1 区带毛细管电泳法分析新鲜血清蛋白组分

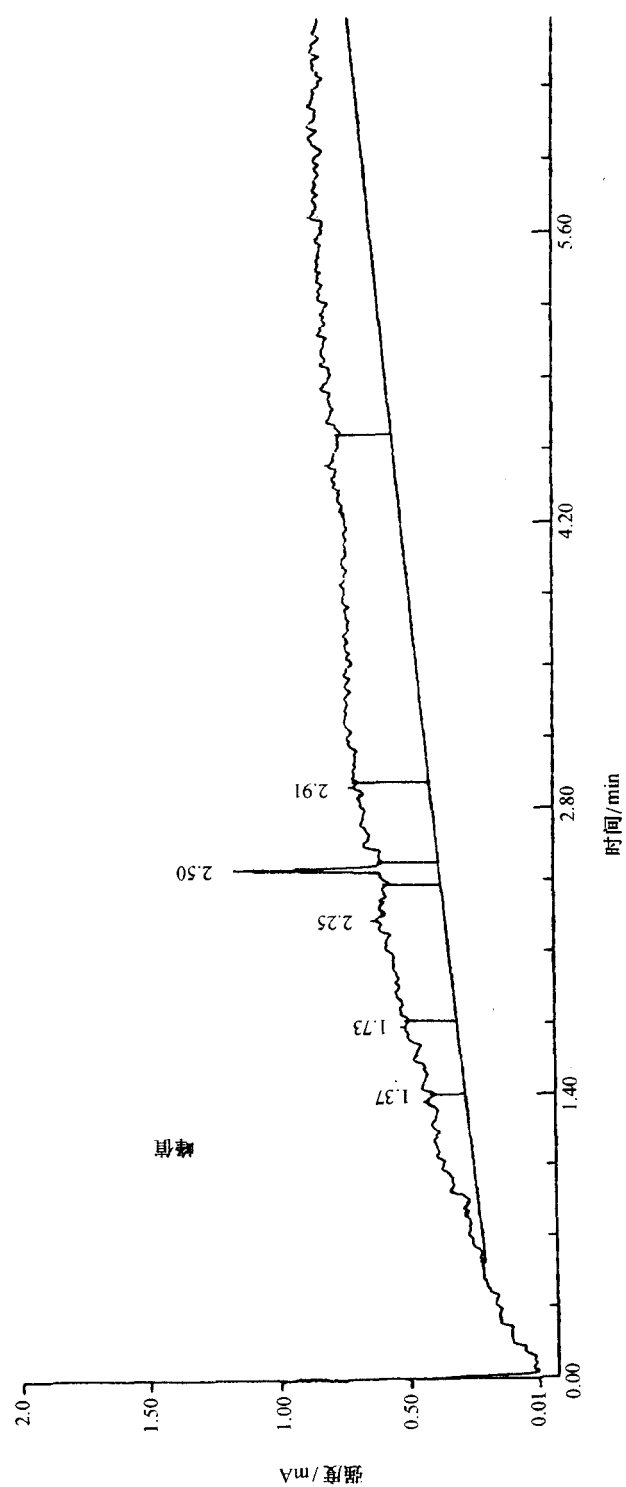


图2 在25℃储存24h后牙鲈血清蛋白组分

硼酸钠缓冲液稀释 (1/9, V/V)。样品分析时所用的电泳条件为: (1) 采用涂层毛细管, 规格为 25 cm × 24 μm; (2) 电泳为恒压电泳, 电压为 10 kV; (3) 检测波长为 200 nm; (4) 分析温度为 20 ℃, 保持恒定; (5) 进样条件采用电动进样, 进样电压 10 kV, 进样时间 8 s; (6) 电泳时间为 10 min。

二、结果与讨论

实验结果见图 1, 2。从图 1 中可以看出, 牙鲆的血清蛋白由 3 种组分组成 (以它们所出现的时间命名), 分别为 2.59 峰、1.60 峰、0.77 峰; 从图 2 中可以看出, 将血清蛋白于室温条件 (25 ℃) 放置 24 h 后, 在同样的检测条件下可以发现血清蛋白的组成发生了变化, 其中 2.59 峰较为稳定, 另外两种组分已经降解。

在以往的研究中发现, 采用不同的实验手段分析血清蛋白, 所得到的结果不完全相同 (尾崎久雄, 1982), 其中以淀粉凝胶电泳法和免疫电泳法所分离的结果最为精细, 但纸电泳法和醋酸纤维素膜法应用得最为广泛。用以上两种方法分析海水硬骨鱼类血清中的蛋白组分时发现, 大多数硬骨鱼的血清中包括 F 因子、白蛋白 (Albumin) 和球蛋白 (Globulin), 其中 F 因子是一类分子量较小, 只存在于海水硬骨鱼中的蛋白质, 可能与渗透压的调节有关。球蛋白包括 α_1 -, α_2 -, β - 3 种组分。人类及其他高等动物血清中的 γ - 球蛋白在大多数海水硬骨鱼类的血清中没有发现。本实验中利用区带毛细管电泳技术, 在牙鲆血清蛋白中鉴别出 3 种组分, 即 2.59 峰, 1.60 峰, 0.77 峰; 这 3 种蛋白的面积比率分别为 8.0%, 78.1%, 13.89%, 其中 0.77, 1.60 两峰的峰宽较大, 可能这两种组分中的蛋白质成分还未被完全分离开。在对人体血清所作的实验中发现, 利用区带毛细管电泳技术可以将血清蛋白分为白蛋白, α_1 -, α_2 -, β_1 -, β_2 -, γ - 球蛋白, 与醋酸纤维素膜电泳分离的结果十分吻合 (Voelter, *et al.*, 1998)。如何利用毛细管电泳技术分离牙鲆的血清蛋白以得到更好的效果, 将需进一步深入研究。

从毛细血管电泳分离大分子物质所得到的电泳图谱 (即图 1) 中可以看出, 分子量越小的物质出现的时间越早, 因此 0.77, 1.60, 2.59 这 3 个峰所代表的蛋白质的分子量依次增大, 由图 1 中还可看出, 2.59 峰的蛋白组分比较稳定, 而 0.77, 1.60 两峰的蛋白较易降解。

根据各种蛋白质分子量的差异以及稳定性的不同, 参考用区带毛细管电泳技术分离人血清蛋白所得到的结果, 初步推断 0.77 峰主要为 β 球蛋白, 1.60 峰主要为 α 球蛋白, 2.59 峰主要为白蛋白。

将毛细管电泳技术应用于海水鱼的研究是一项新的尝试。由于这一技术能够快速检测出血清中各种蛋白质的比率变化, 因此, 将这一新型的检测技术用于海水鱼血清蛋白组成的检测, 根据免疫球蛋白组成的变化, 可以用来快速判断海水鱼的免疫能力, 这给鱼病的检测和防治提供了新的方法。

参 考 文 献

- [H] 尾崎久雄, 许学龙等译, 1982, 鱼类血液和循环生理, 上海科学技术出版社, 120—131。

- Dai, H. J., I. S. Krull, 1998, Thermal stability studies of immunoglobulins using capillary isoelectric focusing and capillary zone electrophoretic methods, *J. Chromatogr. A*, 807: 121—128.
- Leeds JM, *et al.*, 1996, Quantitation of phosphorothioate oligonucleotides in human plasma, *Anal Biochem*, 235: 36—43.
- Siles BA, *et al.*, 1997, Analysis of DNA fragmentation using a dynamic size-sieving polymer solution in capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 771: 319—325.
- Voelter, W., *et al.*, 1998, Capillary electrophoresis in biochemical and clinical laboratoriesp selected attractive examples, *J. Chromatogr. A*, 807: 135—149.

ANALYSIS OF THE SERUM PROTEIN COMPONENTS OF FLOUNDER, *PARALICHTHYS OLIVACEUS* WITH CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS (CZE)*

Wang Hongtian, Zhang Peijun

(*Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences*)

ABSTRACT

The serum protein components of flounder, *Paralichthys olivaceu* were analyzed by capillary zone electrophoresis (CZE). Three kinds of proteins can be analyzed with current experimental conditions. Based on the time that these proteins appeared, they were named as Peak 2.59, Peak 1.60 and Peak 0.77. After storage at room temperature (25℃) for 24 hours, the protein Peak 2.59 remained stable, while the other two proteins were destroyed. Comparison of the results with those of the analysis of human being's serum, the protein Peak 2.59 is probably attributable to Albumin, the protein Peak 1.60 is probably attributable to Globulin- α , the protein Peak 0.77 is probably attributable to Globulin- β .

* Contribution No. 3847 from the Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences.