

猪生化及分子遗传

实验导论

● 熊远著 主编

● 中国农业出版社

猪生化及分子 遗传实验导论

熊远著 主编

中国农业出版社

主 编 熊远著

副主编 邓昌彦

编 者 (以下按姓氏笔画)

邓昌彦 吴桢芳 倪德斌 蒋思文

蔡更元 简运华 熊远著

猪生化及分子遗传实验导论

熊远著 主编

* * *

责任编辑 江社平

中国农业出版社出版 (北京市朝阳区农展馆北路 2 号 100026)

新华书店北京发行所发行 中国科学院印刷厂印刷

787mm×1092mm 16 开本 8.5 印张 178 千字

1999 年 4 月第 1 版 1999 年 4 月北京第 1 次印刷

印数 1~3 000 册 定价 20.00 元

ISBN 7-109-05814-X/S·3785

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)

前 言

生化和分子遗传是一门发展很快的学科,是现代分子生物学研究的基础,它的发展和迅速向生物学、医学、农学渗透,将促进生命科学的发展进入一个划时代的新阶段。

为适应学科发展和研究的需要,本实验室从 1985 年起,对研究生先后开设了生化及分子遗传实验并编写了《猪生化及分子遗传实验指导》,在此基础上经十多年来培养研究生及猪遗传育种科研实践,逐步形成了本实验室具有一定特点的实验技术与方法,整理而成此书,本书内容是作者及所指导的研究生科学研究结果的概述和具体实践经验体会的点滴积累。

本书不仅对猪生化和分子遗传实验的方法和技术作了重点详细的介绍,易于实际操作,而且对基本原理作了简要的讨论和阐述,以加深对这些方法技术依据的了解,更具特点的是多数实验都有详实的结果,并介绍了对实验结果如何进行分析与判断,所以本书既具有很强的实用性,又具有科学学术价值。

基于本书以上特点,可以作为农、医院校相关学科师生和有关科研院所科学研究人员的参考书。

由于作者水平有限,写作时间仓促,错误在所难免,敬请读者指教斧正,谨表诚挚谢意!

熊 远 著

1999 年 1 月

目 录

前言

第 1 章 血液蛋白质的多态性	1
1.1 血红蛋白和白蛋白的多态性——水平淀粉凝胶电泳	1
1.2 血清后蛋白-2 多态性——双相平板电泳	2
1.3 血清乳酸脱氢酶同工酶——聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳	5
1.4 红细胞 PHI、PGD 酶型——醋酸纤维膜电泳	6
第 2 章 酶活性测定	9
2.1 血清肌酸激酶活性测定	9
2.2 血清乳酸脱氢酶活性测定	10
2.3 血液和背膘脂肪组织中 NADPH 生成酶活性荧光测定	12
第 3 章 肌肉生化指标的测定	17
3.1 肌肉组织乳酸含量的测定	17
3.2 肌肉 Hart 透过率的测定	19
3.3 肌肉 R 值的测定	20
3.4 肌肉总色素的测定	21
3.5 肌肉脂肪的测定	22
第 4 章 聚合酶链式反应技术	25
4.1 PCR 技术的基本原理	25
4.2 PCR 反应成分	25
4.3 PCR 反应条件的选择	27
4.4 几种特殊的 PCR	27
4.5 PCR 技术的应用	28
第 5 章 氟烷测验	30
5.1 猪的氟烷测验	30
5.2 猪氟烷基基因型单倍型推断	31
5.3 RYR1 基因 PCR - RELP 分析	35
5.4 RYR1 基因 STAS - PCR 分析	36
第 6 章 核酸的分离与纯化	39
6.1 真核基因组 DNA 的提取、分离与纯化	39
6.2 质粒 DNA 的提取、分离与纯化	44
6.3 RNA 的提取、分离与纯化	47
第 7 章 DNA 的多态性分析	52

7.1 限制性酶切片长度多态性	52
7.2 RAPD	56
7.3 DNA 指纹技术	60
7.4 PCR - SSCP 标记	65
7.5 微卫星标记	71
第 8 章 基因组和 cDNA 文库的构建	73
8.1 基因组文库的构建	73
8.2 cDNA 文库的构建	81
第 9 章 家猪基因的定位	93
9.1 家猪基因定位的目的和意义	93
9.2 家系分析与基因定位——连锁作图	93
9.3 用体细胞杂交法进行基因定位	98
9.4 染色体原位杂交技术	100
9.5 引物原位标记定位	113
9.6 原位 PCR 应用于基因定位	114
9.7 家猪基因定位新方法	115
附录 I 动物生物样品的制备	117
附录 II 常用缓冲溶液的配制方法	119
附录 III 常用贮存液的配制	125
附录 IV 常用细菌培养基	126
参考文献	127

第1章 血液蛋白质的多态性

1.1 血红蛋白和白蛋白的多态性

——水平淀粉凝胶电泳

1.1.1 目的意义

掌握水平淀粉凝胶电泳的基本方法和血红蛋白、白蛋白多态性的分离方法。动物血红蛋白(Hb)、白蛋白(AIB)存在遗传多态性现象,并且这种多态性对于品种分类和生产性状的遗传标记有重要意义。

1.1.2 基本原理

淀粉凝胶电泳是血红蛋白和白蛋白常用分离方法之一。淀粉胶是一种具有三维网状结构的微颗粒,凝胶网孔的大小具有分子筛作用,而且由于凝胶骨架中的多糖键含有大量羟基($-OH$),凝胶具有很强的亲水性。水平淀粉凝胶电泳分离血红蛋白和白蛋白多态性具有操作简便,无毒、谱带清晰的优点。

1.1.3 仪器和试剂

(1) 仪器 电泳仪(100mA, 500V), 电泳槽, 抽气装置。

(2) 试剂

- ①Hb 电极缓冲液(pH8.6): Tris30.2g, EDTA 3.0g, 硼酸 2.3g, 定容到1000ml;
- ②Hb 凝胶缓冲液: 取23ml 电极缓冲液, 加77ml 蒸馏水;
- ③Aib 电极缓冲液(pH8.7): 氢氧化钠 4.0g, 硼酸 18.6g, 用蒸馏水溶解到1000ml;
- ④Aib 凝胶缓冲液(pH5.6): 柠檬酸 0.84g, Tris 1.0g, 用蒸馏水溶解, 定容到1000ml;
- ⑤马铃薯淀粉和可溶性淀粉;
- ⑥染色液: 考马斯亮蓝(G250) 1.25g, 甲醇 227ml, 冰醋酸 48ml, 加蒸馏水 225ml;
- ⑦聚氯乙烯薄膜、玻璃纸等。

1.1.4 操作方法

①凝胶板的制备 称取12g 马铃薯淀粉和可溶性淀粉4g, 加100ml 凝胶缓冲液, 混匀, 在电炉上加热糊化, 边加热边摇, 凝胶由稠变固呈透明状, 若有小气泡产生立即抽气, 排除凝胶中的气泡, 迅速将凝胶均匀地倒入事先备好的模具里, 趁热用一块聚氯乙烯薄膜盖在胶面上, 注意不要产生气泡, 然后压一重物, 室温冷却1h, 即可点样。

②样品制备 白蛋白检测, 新鲜血清稀释5倍; 血红蛋白检测, 取用肝素作抗凝剂的新鲜血液1ml, 加入生理盐水7ml, 混匀, 2500r/min 离心5min, 除去上层浮液, 再用生理盐水洗涤离心, 将沉积血细胞用蒸馏水制成大约10%的血红素溶液, 放冰箱中, 第二天用于点样。

③点样 揭去胶面上的塑料薄膜,用刀片将胶与有机玻璃槽分开,在距阴极一端 2.5cm 处用切口梳子,垂直切下,取出后,留下的切口作点样槽,用 6mm×4mm 的新华滤纸二片蘸取样品,放入点样槽中。

④电泳 将凝胶板放在电泳槽上,点样一端靠近阴极,两端用两层纱布或滤纸与电泳槽内的电极缓冲液连接,低温电泳。Hb 电泳时, $I_1=1\text{mA/cm}$, $V_1=200\text{V}$, 10min 后, $I_2=2.5\text{mA/cm}$, $V_2=300\text{V}$ 。电泳时间 3h。Alb 电泳时, $I_1=1\text{mA/cm}$, $V_1=200\text{V}$; 10min 后, $I_2=2.7\text{mA/cm}$, $V_2=365\text{V}$ 。电泳时间 2.5h。

⑤染色和保存 电泳完毕后,将点样滤纸片取掉,放入染色液中,在室温下放置 2h 左右即呈现天蓝色谱带,用水冲洗后,置水中保存。若长期保存,可置于含有 10% 的甘油中,浸泡 1~2 天,然后用玻璃纸包贴在玻璃板上(注意不要有气泡),室温下晾干,就可得到干胶片,可长期保存。

1.2 血清后蛋白-2 (postalbumin-2 简称 Po-2) 多态性

——双相平板电泳

1.2.1 实验目的意义

掌握 Po-2 双相平板电泳方法,掌握 Po-2 的定型及电泳图上其他血清蛋白的多态性。通过测定 Po-2 多态性,分析 Po-2 与 Hal、PH1、6-PGD 的连锁关系及其单倍型,对判定氟烷基型具有重要作用和意义。

1.2.2 基本原理

第一相酸性琼脂糖电泳,血样蛋白质组分在 pH5.4 缓冲系统中依其电荷性质及多少向两极移动。然后进入第二相高 pH 的碱性不连续性电泳系统。这种系统包括以下 3 种不连续性系统。

①凝胶浓度与孔径的不连续性 第一,样品凝胶(称大孔胶)。它可防止样品被缓冲液冲动,同时起抗对流作用;第二,浓缩凝胶。用来防止对流和起到对样品浓缩作用;第三,分离胶。各组分的生物蛋白质根据各自的分子量和获得的净电荷的多少,通过分子筛效应而被分开。

②缓冲溶液离子和电位梯度的不连续性 不连续性缓冲溶液要具有 3 种离子:第一,先导离子。第二,尾随离子。第三,配对离子。先导离子与尾随离子要和被分离蛋白质具有相同的电荷性,向同一方向泳动。且其有效泳动率是按下列次序进行:先导离子>蛋白质分子>尾随离子。

电泳开始时,3 种凝胶中都含有先导离子,只有电泳槽中的缓冲溶液含有尾随离子。电泳开始后,先导离子由于泳动率最大,很快超过蛋白质分子。这样在先导离子后面形成一离子浓度的低区域即低电导区。因此,在电导区有较高的电压梯度。由于电压梯度的增加,迫使蛋白质分子以同样的速度跟在先导离子的后面向前移动。当电压梯度和泳动率的积彼此相等时,则三种离子的泳动速度相同($V=ME$)。当这个条件保持相等时,则达到一稳定的泳动状态,并不断向阳极泳动。于是在先导离子与尾随离子之间形成一移动界面。蛋白

质分子恰好介于两离子之间, 积成一窄而高浓度的蛋白质区带。在实际工作中, 先导离子常用的是 Cl^- , 尾随离子是甘氨酸 ($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$), 配对离子是三羟甲基氨基甲烷 (Tris)。因此, 氯根的泳动率高且不受 pH 影响, 对蛋白质也无破坏作用。尾随离子应为弱酸或氨基酸, 具有 pH 要高于分离胶一个 pH 单位, 以保证在分离弱酸分子中, 大约一半得到解离, 使有效泳动率超过所有蛋白质。

(3) pH 的不连续性 为了控制尾随离子的泳动率, 促使尾随离子既要走在先导离子和蛋白质分子之后, 同时又要以同样的泳动速率前进, 因此需要在不同凝胶层设置不同 pH 缓冲液。

采用不连续性电泳系统技术, 手续虽较繁, 但分辨率较高, 区带狭窄集中, 清晰易辨, 分离效果好。

1.2.3 主要仪器及药品

LKB 多用电泳仪及其水平电泳附件;

琼脂糖, 醋酸钠 EDTA, 三羟甲基氨基甲烷 (Tris), 柠檬酸, 硼酸, 溴酚蓝, 考马斯亮蓝 G250, 氯化汞, 冰醋酸, 高氯酸等。

1.2.4 操作步骤

(1) 血样处理

采血前, 在收集血液的试管中按 30ml 血液加 5ml 含肝素的 pH7.4 等渗磷酸盐溶液的比例加好缓冲溶液, 采血后, 将血样在 3000r/min 下离心 20min, 上清液则为血浆, 血浆样放在 -20°C 下保存。

1) pH 7.4 等渗磷酸盐缓冲液中, 1ml 溶液含肝素 500 单位。

2) pH 7.4 等渗磷酸盐缓冲液 (含 0.15mol/L 氯化钠的 5mmol/L pH 7.4 磷酸缓冲液)。

液 (A): 称 0.780g 磷酸二氢钠 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 溶于水, 定容至 2000ml。

液 (B): 称 3.582g 磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 溶于水, 定容 2000ml。

取 380ml 液 (A) 加 1620ml 液 (B) 用水量浓盐酸调 pH 值至 7.4, 再称取 17.53g 氯化钠溶于其中。

(2) 琼脂糖凝胶制备 1g 琼脂糖加入 100ml 0.05mol/L 醋酸钠 EDTA 缓冲液 (pH 5.4) ($\text{NaAC} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 6.8g EDTA 1.0g/l) 水浴加热溶解摇匀, 倒入一洁净水平的玻璃板上 (12.5cm $\times$ 26cm) 凝胶厚度 1.2mm, 冷却凝固 (20min)。

(3) 聚丙烯酰胺凝胶制备 它的制作是根据 Gahne (1977) 提供的方法:

1) 贮液 (A) 称 32g 丙烯酰胺和 0.8gNN-亚甲基双丙烯酰胺溶于 100ml 水中。或按此比例制备, 在 4°C 冰箱保存 2 个月用于试验。

2) 贮液 (B) 90.00g 三羟甲基氨基甲烷和 20.0g 柠檬酸, 溶于水至体积 1000ml, 并保存在 4°C 下。

3) 过硫酸铵溶液 (C) 在水中按 2mg/ml 的浓度使用前配备即可。

4) 凝胶制备 用两块玻璃板做成一个槽, 每块 22cm $\times$ 26cm, 中间被一“U”型塑料架隔着 (U 型框架 1.2mm 厚), 用铁夹夹紧三边, 垂直放置。不同凝胶长度如下: 碱性 12% 聚丙烯酰胺 (分离胶) —16cm, 4% 样品胶和 8% 浓缩胶 2cm。工作组成如下表:

聚丙烯酰胺浓度 (%)	液			蒸馏水 (ml)	TEMED	总 计
	A	B	C			
12	20.0	13.5	13.5	7.0	40	54
4	2.0	2.0	4.0	8.0	12	16
8	2.0	1.0	2.0	3.0	6	8

[注明] 12%胶层的缓冲液浓度是 0.18mol/L,而在 4%、8%胶层为 0.09mol/L,每层 TEMED(1 μ l)的数量为贮液 C 的三倍。

首先注入 12%胶液,小心轻缓加水 2.3ml 蒸馏水,10~15min 后可见一聚合界面,标志此层已聚合,倒掉蒸馏水,然后注入 4%胶液,聚合后 8%胶液注入。接着玻璃槽连同凝胶包在塑料袋内 4℃下放置 2 星期以上,用于试验。

(4) 第一相琼脂糖凝胶电泳

1) 点样 一张(26cm $\times$ 5cm)滤纸放在琼脂糖胶中间部分。当其全部浸润后立即揭走。在这被吸“干”的部分,用点样箔(电泳仪附件)附在其上,7ml 血浆样加到每一裂口,大约 20~30min,样品被吸收,而点样箔轻轻地从凝胶上揭走。

2) 电泳 使用 LKB 多用电泳仪。电极缓冲液与凝胶缓冲液相同。在 8℃水温下电泳,带胶玻璃板放在冷凝盘上,两张双层滤纸(26cm $\times$ 2cm)浸上电极液整齐地摆入在凝胶两端。电泳时,在电压 250V(恒)电流 70~75mA 范围内变化(大约 20V/cm),电泳 70~80min,然后每个胶谱用解剖刀切成 3mm $\times$ 5mm 的琼脂糖条,用薄塑料片挑出,轻缓地颠倒(反面)放置在 4%聚丙烯酰胺凝胶层中部,用于第二相分离。

(5) 第二相平板聚丙烯酰胺凝胶电泳

第一相琼脂糖胶电泳后,用于第二相电泳的凝胶按如下处理:携带聚丙烯酰胺凝胶槽打开,带胶玻璃板放在冷凝盘上,一塑料薄片覆盖住 12%层胶的最末端 1~2cm 和 4%层 1~2cm 处,滤纸片浸上电极液整齐地摆放在阴阳极端,然后两极端上用四层医用纱布(26cm $\times$ 8cm)作盐桥。电极缓冲液为 0.06mol/L pH 9.0 的三羟甲基氨基甲烷-硼酸(8.0g Tris+2.0g 硼酸溶于水至 1000ml),加 5ml 液态溴酚蓝溶液,容器每边大约盛 800ml 的电极缓冲溶液。经过上述准备后,琼脂糖凝胶条转到 4%聚丙烯酰胺胶层(如前所述),电泳时工作电流 70~80mA(恒)电压由 400V 逐渐上升到 1100~1200V,当蓝色界面达到琼脂糖胶时(20min),琼脂糖条从聚丙烯酰胺胶上揭挑走。4%层盖一塑料片,电泳直到清蛋白带在分离胶 12%层迁移 8cm(整个时间 3.5~4.0h)然后分离胶用考马斯亮蓝 G250 液染色 30min,5%冰醋酸褪色 30min,则得到完整的电泳图谱。

1%水样溴酚蓝溶液:33g 氯化汞+95%乙醇溶解,然后加 1g 溴酚蓝稀释到 100ml。

考马斯亮蓝 G250 液:

1) 贮液:8.0g 染料溶于 1L 水中

2) 工作液:1800ml 水+100ml 70%高氯酸+100ml 上述贮液,工作液可重复使用 5~6 次,直到它的颜色由棕变到蓝止。

(6) P_0-2 电泳结果定型 按 Juneja 和 Gahne1983 提供方法:每一血浆样谱呈现一群或两群 P_0-2 段,每一群含一大片段和三小片段(在主片段之前),根据其迁移快慢,如含一群者分别命名为 F(Fast)型片段和 S(Slow)片段,猪个体只含一群 P_0-2 片段称为 P_0

- 2FF 型或 P₀-2SS 型,而那些含上述两群片段的个体为杂合型称 P₀-2FS 型,其迁移速度在上述两者之间。

1.3 血清乳酸脱氢酶同工酶

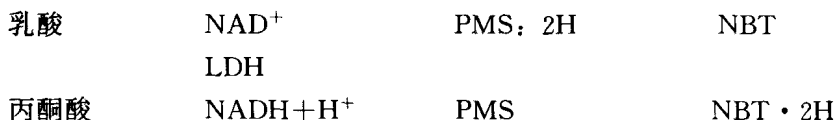
——聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳

1.3.1 目的意义

了解聚丙烯酰胺凝胶电泳的基本原理,掌握乳酸脱氢酶同工酶电泳方法和染色方法。

1.3.2 基本原理

用聚丙烯酰胺凝胶进行圆盘电泳后,乳酸脱氢酶同工酶得到分离,然后进行染色。染色是根据辅酶 I 的氧化还原反应进行的。



PMS: 吩嗪甲酯硫酸盐, NBT: 氯化硝基四氮唑蓝。

1.3.3 仪器和试剂

仪器: 电泳仪 (300V, 100mA), 圆盘电泳槽, 凝胶扫描用分光光度计。

试剂: (1) pH 8.9 凝胶缓冲液: 称量 Tris 6.0g, EDTA 1.17g, NaCl 1g, 加蒸馏水至 100ml;

(2) 丙烯酰胺储存液 丙烯酰胺 (Acr) 30g, N, N'-甲双丙烯酰胺 (Bis) 0.8g, 加蒸馏水至 100ml;

(3) 10% 过硫酸铵 过硫酸铵用蒸馏液解 (新鲜配制)。

(4) pH 7.4 磷酸缓冲液 称 Na₂HPO₄ · 7H₂O 22.55g, KH₂PO₄ 2.16g 加水至 1000ml。

(5) 辅酶 I 取辅酶 I 10ml, 加 pH 7.4 磷酸缓冲液 1ml 溶解后备用。

(6) 0.5mol/L 乳酸钠 吸取 60% 乳酸钠 1ml, 加入 pH 7.4 磷酸缓冲液 2ml。

(7) 0.1% PMS PMS 5mg 溶于 5ml 水中。

(8) NBT NBT 37mg, 加 pH 7.4 磷酸缓冲液至 10ml。

(9) 溴酚蓝蔗糖溶液 溴酚蓝 0.1mg, 蔗糖 4g, 加水至 10ml。

(10) 显色混合液 0.5mol/L 乳酸钠 0.6ml, NBT 1.2ml, 辅酶 I 0.3ml, 0.1% PMS 0.4ml。

(11) pH 8.3 电极缓冲液 Tris 0.6g, 甘氨酸 2.88g, 加蒸馏水至 100ml (临用前 1:10 倍稀释)。

以上试剂均应冰箱保存。

1.3.4 操作方法

① 凝胶的制备 将洁净的玻璃板 (5mm × 100mm) 垂直插入橡皮座 (可采用疫苗塞), 分离胶的配制: pH 8.9 凝胶缓冲液 1.8ml, 丙烯酰胺储存液 1.8ml, 10% 过硫酸铵 0.25ml, 4% TEMED (N, N, N', N'-四甲基乙二胺) 0.25ml, 蒸馏水 5.9ml。将上述溶液轻轻混

匀，用 10ml 注射器吸取后，沿玻璃管管壁注射凝胶混合液，注射高度 7~8cm；再用细长针头注射器吸取蒸馏水小心加在凝胶表面，以防止凝胶在聚合过程中胶面不平，又可使其隔绝空气，室温放置 30min。

②加样 将已聚合的凝胶上层蒸馏水吸掉（用滤纸），加入 2 滴 1:10 新鲜稀释的电极缓冲液洗凝胶表面，再将缓冲液轻轻吸掉，然后在凝胶表面加入 20 μ l 血清和 20 μ l 溴酚蓝蔗糖溶液。

③电泳 在已加样的凝胶柱上部小心地加满电极缓冲液，安装到电泳槽上，上、下电泳槽中加入电极缓冲液，上槽为阴极，下槽为阳极，电压 300V，每支凝胶柱电流 3mA，1h 后，将电流调至 5mA/支，电泳时间 2h 左右。

④显色 在电泳完毕前 10min，新鲜配制显色混合液，断电后取下凝胶柱，用细长针头的注射器吸取双蒸水后，剥胶，然后浸入盛有显色液的试管中，37 $^{\circ}$ C 孵育 20min，避光。

⑤固定 显色后的胶柱立即放入小平皿内用蒸馏水漂洗，然后迅速换成 35% 甲醇+10% 冰醋酸的混合液中固定脱色，4h 后换成 20% 甲醇+10% 冰醋酸，再 4h 后换成 10% 甲醇+10% 冰醋酸，过夜后再换成 5% 醋酸。

⑥扫描定量 利用国产 721 分光光度计，进行改装，在 625nm 进行扫描定量，获得扫描图谱，如图 1 所示。

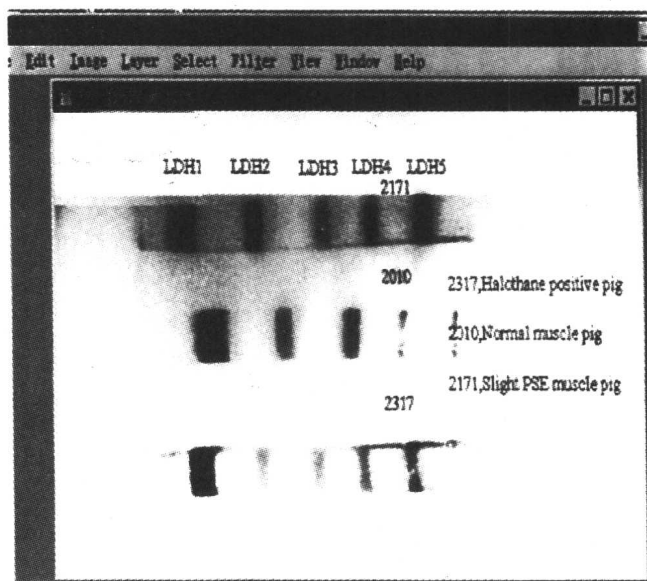


图 1 乳酸脱氢酶同工酶电泳图谱

1.4 红细胞 PHI、PGD 酶型

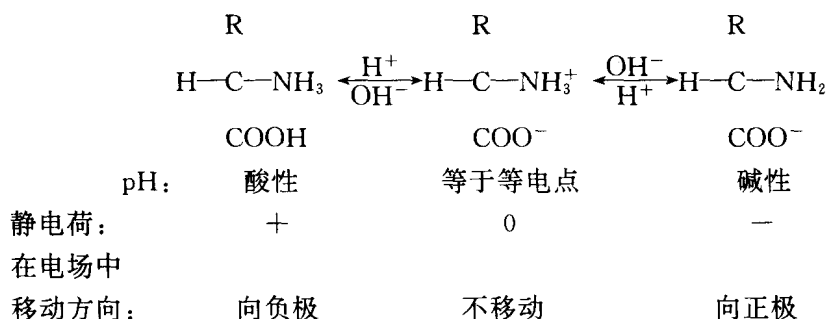
——醋酸纤维膜电泳

1.4.1 目的意义

掌握用醋酸纤维膜电泳法测定猪红细胞 PHI、PGD 酶型的电泳条件、点样和染色方法及各类酶型判定和结果分析。猪血液红细胞磷酸己糖异构酶（phosphohexose isomerase, PHI），6-磷酸葡萄糖脱氢酶（6-phosphogluconate dehydrogenase, 6-PGD），经许多研究证明具有生化多态性，通过电泳，可分离为 AA、AB、BB 三型，并且与猪氟烷基基因位点具有连锁关系。通过酶型单倍型的推断，可间接判定氟烷基基因型，在现代猪遗传育种研究中作为一种遗传标记，应用于肉质早期活体选择、品种分类具有一定意义。

1.4.2 基本原理

猪红细胞 PHI、PGD 酶是生物大分子蛋白质，为两性电解质，在一定的 pH 条件下，可以解离成为带正电荷或带负电荷的离子，在电场中，带正电荷的离子向负极移动；带负电荷的离子向正极移动。所以，带电荷的生物大分子都能进行电泳，反应式如下：



上式说明,蛋白质在其等电点(PI)时,正负电荷相等,静电荷为零,在电场中不移动。当pH高于其PI时,OH⁻离子增加,NH⁺被封闭,显出COO⁻的负电荷,在电场中向正极移动。当pH低于PI时,H⁺离子增加,与COO⁻结合,表现出NH⁺的正电荷,向负极移动。不同的蛋白质携带的氨基和羧基数量不一,等电点不一,在不同的pH条件下,解离程度差别很大,它们所带电荷的多少就不同,在电场中的泳动率也不同。正是利用这一原理,在pH 7.4的条件下,由于PHI带正电荷,向负极移动;6-PGD带负电荷,向正极移动。并能清晰地分辨出AA、AB、BB三种基因型。

1.4.3 试剂、仪器与血样处理

(1) 试剂

1) Tris- maleic acid (顺丁烯二酸或马来酸) 缓冲液 pH 7.4

0.1mol/L	Tris	12.11g
0.1mol/L	Taleic acid	11.62g
0.0087mol/L	EDTA	2.92g
0.01mol/L	MgCl ₂ · 6H ₂ O	2.03g

将以上试剂分别称取后加入 950ml 双蒸水，用 NaOH 滴定，将 pH 调到 7.4，然后加双蒸水至 1000ml 即可。使用前再用双蒸水以 1 : 15 倍稀释。

2) 0.1mol Tris-HCL 缓冲液 pH 8.0 (配制方法见附录)

3) 染色反应试剂

25ml 0.1mol/L Tris - HCl pH 8.0

100mg $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

7.5mg 6-phosphoglucnic acid (6-磷酸葡萄糖)

7.5mg flucose - 6 - phosphate (6 - 磷酸果糖)

25 μ l (0.83mg/ml) glucose-6-phosphata dehydrogenase (6-磷酸葡萄糖脱氢酶)

2mg MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]
[3-(4,5-二甲基噻唑-2-氨基)-2,5-二苯基四唑]

2mg PMS phenazine methosulfate (吩嗪甲基磺酸)

250mg noble agar (高洁的琼脂)

用棕色瓶先将 250mg noble agar 在 45℃ 水浴中溶于 0.1mol Tris - HCl 缓冲液中, 然后加入其他试剂。整个操作过程应迅速, 避光进行。

染色液应在临用时配制, 不能久置。以上配制的染色液量可连续染 3~4 张醋酸纤维膜。

(2) 仪器 电泳仪、点样器、醋酸纤维膜、小瓷盘、吸管、镊子等。

(3) 血样处理 将血样先用 700~1000r/min 离心 5~10min, 去掉上层血浆, 然后用生理盐水 (1:1) 稀释, 用 3000r/min 的速度离心 2~3 次, 即可放入 -20℃ 以下保存备用。

1.4.4 方法

(1) 点样与电泳

1) 点样 点样前, 将醋酸纤维膜缓缓放入盛有缓冲液的小瓷盘中浸泡 20min, 用滤纸稍稍吸干, 迅速用点样器在醋酸纤维膜中间进行点样, 每个血液样品量约 2~3 μ l, 一张醋酸纤维膜可点 8 个样品, PHI、6-PGD 可同时在一张醋酸纤维膜上进行电泳。

2) 电泳 将点过样的醋酸纤维膜迅速置于电泳槽上, 盖上盖子。在室温条件下, 恒定电压 220V, 电泳时间 50min。

(2) 染色

当电泳时间达到 50min 后, 应立即关掉电源, 取出醋酸纤维膜, 浸入染色液中, 置于暗处, 保温 37℃, 使其反应 5~10min, 然后取出用 pH 8.0, 0.1mol/L Tris - HCl 缓冲液冲洗 2~3 次, 即可判定结果。

1.4.5 结果 (酶型) 判定

PHI, 6-PGD 酶型判定结果如图所示, PHI 向阴极方向泳动, 移动速度较慢的为 AA 型、移动速度较快的为 BB 型, 处于中间, 有三条带组成的为 AB 型。6-PGD 向阳极方向泳动, 移动速度较快的为 AA 型, 移动速度较慢的为 BB 型, 处于中间的有三条带的为 AB 型。

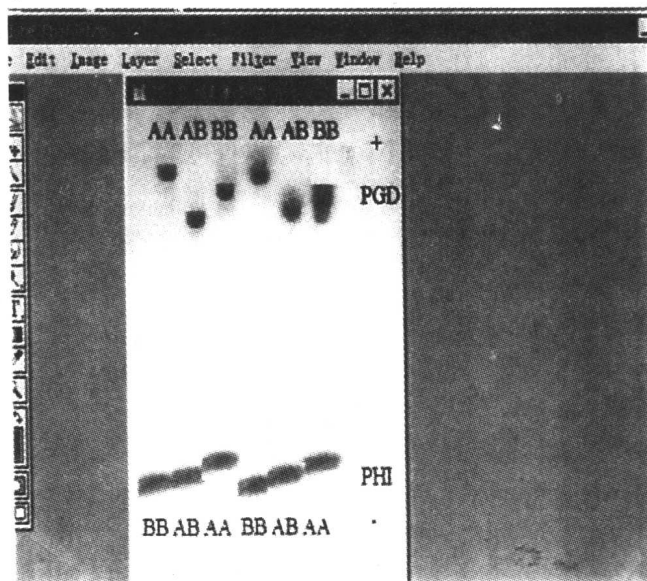


图 2 PHI、6-PGD 酶型判定结果

第2章 酶活性测定

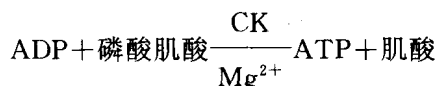
2.1 血清肌酸激酶活性测定

2.1.1 目的意义

了解肌酸激酶 (CK) 活性测定原理, 掌握其测定方法和操作技术。

2.1.2 基本原理

肌酸激酶催化下列反应:



肌酸与茚三酮在强碱溶液中形成荧光物质, 此荧光物质在激发波长 400nm 和发射波长 500nm 处能显示其荧光强度。因此, 利用荧光分光光度计于 400nm 和 500nm 波长处测量其荧光强度, 并依此荧光强度计算其酶活性。

2.1.3 仪器和试剂

(1) 仪器 荧光分光光度计、离心机、水浴锅、移液管等。

(2) 试剂

① Tris - Mg 缓冲液 (pH 6.8): Tris 1.21g、醋酸镁 $[\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ 0.86g, 用双蒸水溶解后, 用 0.1mol/dm³ 醋酸调 pH 到 6.8, 定容到 100ml。

② 磷酸肌酸 (0.2mol/dm³): 溶解 0.654g 磷酸肌酸钠盐在 8.0ml 水中, 用冰醋酸调 pH 到 8.0, 定容到 10ml, 分装冰冻保存。

③ ADP (0.2mol/dm³): 溶解 0.898g ADP 钠盐在 8.0ml 水中, 用 0.1mol/dm³ NaOH 调 pH 到 6.8, 定容到 10ml, 分装冰冻保存。

④ 半胱氨酸 (0.05mol/dm³): 溶解 0.088g 半胱氨酸于 6ml 水中, 用 0.1mol/dm³ NaOH 调 pH 到 6.8, 稀释到 10ml, 现配现用。

⑤ EDTA (0.0044mol/dm³): 用 AR 级 EDTA 二钠盐配制。

⑥ 5% 硫酸锌溶液 (W/V): 用 AR 级 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 配制。

⑦ 氢氧化钡 (0.70mol/dm³): 用 AR 级 $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ 配制。

⑧ 氢氧化钾 (10%, W/V): AR 级 KOH 配制, 过滤后保存。

⑨ 1% 茚三酮 (W/V): 用 AR 级 95% 乙醇配制, 储存在棕色试剂瓶中。

⑩ 肌酸标准液: 储存标准液浓度 10mmol/dm³, 分装冰冻保存; 工作标准液浓度 0.01mmol/dm³, 现配现用。

2.1.4 操作步骤 见下表。

加入 KOH 10min 后, 在荧光分光光度计上于激发波长 400nm、发射波长 500nm 处测定各管的荧光强度。

2.1.5 结果计算

试 剂	测定管	对照管	标 准	空 白
Tris - Mg(ml)	0.5	0.5	/	/
半胱氨酸(ml)	0.2	0.2	/	/
磷酸肌酸(ml)	0.1	0.1	/	/
血清(ml)	0.1	0.1	/	/
37℃水浴 5min				
ADP(ml)	0.1	/	/	/
双蒸水(ml)	/	0.1	/	0.2
37℃水浴 10min				
EDTA(ml)	5.0	5.0	/	/
Ba(OH) ₂ (ml)	1.0	1.0	/	/
振荡混和均匀				
ZnSO ₄ (ml)	1.0	1.0	/	/
静置 10min, 以 3000r/min 速度离心 20min				
上清液(ml)	2.0	2.0	/	/
肌酸标准液(ml)	/	/	2.0	/
茚三酮(ml)	1.0	1.0	1.0	1.0
10%KOH(ml)	1.0	1.0	1.0	1.0

样品读数 = 测定管读数 - 对照管读数

标准读数 = 标准管读数 - 标准空白管读数

$$\text{肌酸含量} = \frac{\text{样品读数}}{\text{标准读数}} \times \frac{10\mu\text{mmol/dm}^3}{1000} \times \frac{0.8\text{ml}}{10\text{min}} \times \frac{1}{0.1\text{ml}} = \frac{\text{样品读数}}{\text{标准读数}} \times 80$$

$$\text{血清肌酸激酶活性(U/ml)} = \text{肌酸含量}(\mu\text{mol/dm}^3/\text{min/ml}) \times 1000$$

2.1.6 注意事项

- ①肌酸工作标准溶液和半胱氨溶液必须现配现用；
- ②加入 ADP 后必须准确计时，时间定为 10min；
- ③水浴温度不得超过 37℃；
- ④血清制备时不得有溶血现象发生，否则样品不能使用；
- ⑤磷酸肌酸，ADP 和肌酸标准储存液都必须冰冻保存。

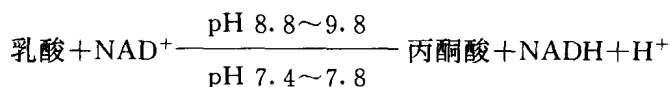
2.2 血清乳酸脱氢酶活性测定

2.2.1 目的意义

了解乳酸脱氢酶 (LDH) 活性测定原理，掌握其测定方法和操作技术。

2.2.2 基本原理

乳酸脱氢酶催化下列反应：



丙酮酸与 2,4 二硝基苯肼反应,所生成的物质在 450nm 波长处有最大吸收峰。因此,利用可见分光光度计于 450nm 波长处测量其吸光值,即可计算出乳酸脱氢酶的活性。

2.2.3 仪器和试剂

(1) 仪器:可见分光光度计、水浴锅、移液管等。

(2) 试剂

①基质缓冲液 ($0.3\text{mol}/\text{dm}^3$, pH 8.8): 2.1g 二乙醇胺, 2.88g 乳酸锂溶解于 80ml 蒸馏水中,用 $1\text{mol}/\text{dm}^3$ 盐酸调 pH 至 8.8,定容至 100ml。

②辅酶 I 溶液 ($11.3\text{mmol}/\text{dm}^3$): 氧化型辅酶 I 15mg,溶于 2ml 水中,冰箱保存。

③2,4 二硝基苯肼 ($1\text{mmol}/\text{dm}^3$): 2,4 二硝基苯肼 200mg,加 $4\text{mol}/\text{dm}^3$ 盐酸 250ml,加水 600ml,加热助溶,冷却定容至 1000ml。

④ $0.4\text{mol}/\text{dm}^3$ 氢氧化钠:用 AR 级 NaOH 配制。

⑥丙酮酸标准液 ($1\mu\text{mol}/\text{dm}^3$): 现配现用。

2.2.4 操作步骤

试 剂	测 定 管	对 照 管
血清(ml)	0.01	0.01
基质缓冲液(ml)	0.50	0.50
37℃水浴 5min		
辅酶 I(ml)	0.1	/
37℃水浴 15min		
2,4 二硝基苯肼(ml)	0.5	0.5
辅酶 I(ml)	/	0.1
37℃水浴 15min		
$0.4\text{mol}/\text{dm}^3$ 氢氧化钠(ml)	5.0	5.0

室温放置 3min 后,用可见分光光度计于 450nm 波长处测定各试管的吸光度。

2.2.5 结果计算

(1) LDH标准曲线绘制

加 入 物	0	1	2	3	4	5	6
丙酮酸标准液 ($1\mu\text{mol}/\text{dm}^3$)	/	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50
基质缓冲液(ml)	1	0.95	0.90	0.80	0.70	0.60	0.50
蒸馏水(ml)	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22
2,4 二硝基苯肼(ml)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
37℃水浴 min							
$0.4\text{mol}/\text{dm}^3$ NaOH(ml)	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
3min 后于 450nm 处测定各管吸光度,并根据相应的丙酮酸含量绘制标准曲线							
相应的 LDH 单位	0	250	500	1000	1500	2000	2500