

簡易牛血清蛋白定量法之研究

宋文恭

(臺灣省家畜衛生試驗所)

序 言

自1948年 Wieland & Fischer 發表以濾紙為支持體之電氣泳動法以來，濾紙電氣泳動法今已成為生物學、化學、醫學及其他各種方面之定性及定量分析上不可缺少之利器之一。尤其是在臨床醫學上，對血清、尿液、乳汁及其他組織液中之各蛋白分割之檢查極為普遍地被採用。但是在臨床上最感遺憾的是電氣泳動法雖能測定 A/G 等各蛋白分割之相對濃度，惟若欲測定各分割之絕對濃度，則尚須仰賴其他方法，以先測定該一溶液中所含之總蛋白量，然後換算之。

Kjeldahl 法，Biuret 法，Folin 法，比濁法及屈折率法等均為測定總蛋白量之方法。但這些非失之於操作複雜，即失之於消耗試料過鉅^{1,5)}。本試驗即針對此種缺點，把生物統計學上之四點測定法導入於乳牛血清蛋白之濾紙電氣泳動法上，試圖僅以一次之電氣泳動而能完成各成份之定性，相對及絕對濃度之測定等一連串的分析操作，以提高電氣泳動法在臨床獸醫學上之實用價值。

材 料 與 方 法

材料：

供試血清原液：由三頭荷蘭種母牛頸靜脈採取之血液，經室溫自然分離後，取其上清，再以3000 rpm遠心分離 5 分鐘而得。隨後立即以蛋白計測定所含之總蛋白量。

Al標準原液：以 Bovine Albumin Powder 按 3g/dl 之濃度溶解於泳動用緩衝液中而得。上述供試血清原液與 Al 標準原液再按表 I 所示之倍數分別稀釋成高低二種不同之濃度，使成為高濃度血清，高濃度 Al 標準液，低濃度血清及低濃度 Al 標準液等四種材料 (M₁~M₄)。

表 1. 各血清原液與 Al 標準原液之總蛋白量與稀釋倍數

Exp No	總 蛋 白 量	高 濃 度 稀 釋	低 濃 度 稀 釋
1	8.1	×1.0	×2.0
2	7.4	×1.0	×2.0
3	6.0	×1.0	×1.5

方法：

1. 電氣泳動操作：在本實驗中使用小林式恆電流電壓器及水平泳動槽。以 0.06 M, pH 8.6 之 Veronal Buffer 注入於泳動槽中為泳動用緩衝液。在 9×2.5cm 大之醋酸纖維膜上預先以鉛筆於陰極端 3.5cm 處作一記號為泳動起點。然後浮放於 0.07 M, pH 8.6 之 Veronal Buffer 上經潮濕後夾於二張濾紙中輕按，以除去多餘之緩衝液。以超微量吸管吸取上述四種材料各 0.001ml 滴注於泳動起點上成一 1cm 長之線條。然後通入 0.4mA/strip 之電流共泳動 2 小時。

2. 染色：泳動後之膜立即放入於 Poncacu-3R 染色液中染色 1 分鐘後，再以 5% 醋酸溶液清洗附着於膜面之染色液。

3. 光學定量：清洗後之膜，經夾於上下各四層之濾紙中，上壓以書本等重物放置於室溫中令其

(臺灣畜衛試研報6, 69~73, 1969)

自然乾燥。經充份乾燥之膜，以光電濃度計波長 510mu 下實施定量。

生物統計學之分析

1. 分散分析：由於考慮到因材料 ($M_1 \sim M_4$)，泳動膜在槽內之位置 ($C_1 \sim C_4$) 使用吸管 ($P_1 \sim P_4$) 及反覆泳動等因子所引起之誤差，故於每次實驗均按拉丁方格法⁸⁾之排列，反覆實施四次之泳動 ($J_1 \sim J_4$)，並以分散分析法對 M. C. P. J. 等各因子及其交互作用 ($M \times D$) 之有意性加以檢討。

2. Al 絕對濃度之測定：以一般被使用於荷爾蒙之生物檢定或精漿中葉糖含量之四點測定法^{6,7)} 求其血清材料 (M_1, M_2) 內所含 Al 量，對 Al 標準液 (M_3, M_4) 之相對力價及其 Al 之母平均存在範圍。

試 驗 成 績

茲把各材料中之 Albumin 積分值與血清材料中之 Albumin 相對濃度列於表 2 之中。而其積分值是由濃度計上之積分器所記錄者。經實施分散分析之結果，在 C. P. J. 及 M 等各項因子中除了 M ($P > 0.01$) 以外均無呈現有意之差異 ($P > 0.05$)。換言之，表 2 中所示之泳動定值並不因吸管，泳動槽內之位置及反覆測定等因子之影響。但是在材料 (M) 與稀釋倍數 (D) 之間之交互作用 ($M \times D$) 檢定時，發現於 Exp. 3 具有有意性之存在。(表 3)

另一方面，對血清材料由四點測定法所得之 Al 效力比與其母平均存在範圍及依從來之方法由血清總蛋白質質量換算得來之 Al 絕對值均列於表 3 中。在 Exp. 1 及 Exp. 2 以從來方法所得之 Al 絕對值不但在由四點測定所得 Al 效力比之母平均存在範圍內，且與效力比本身亦極相似。然而於 Exp. 3，由從來方法得之 Al 絕對值為 1.425g/dl 較由四點測定法所得母平均存在範圍之下限 1.603 為低。因此由此二種方法所得之測定值並不相一致。

在表 4 中，把每一次實驗所得各材料 (M_{1-4}) 之 Al 積分值按高濃度稀釋液與低濃度稀釋液各劃出二條直線以觀察其間之平行關係。結果在 Exp. 3，明顯地在高低二濃度之直線之間並無平行之關係存在。

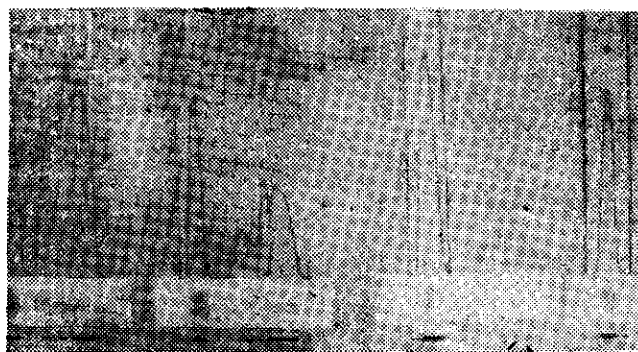
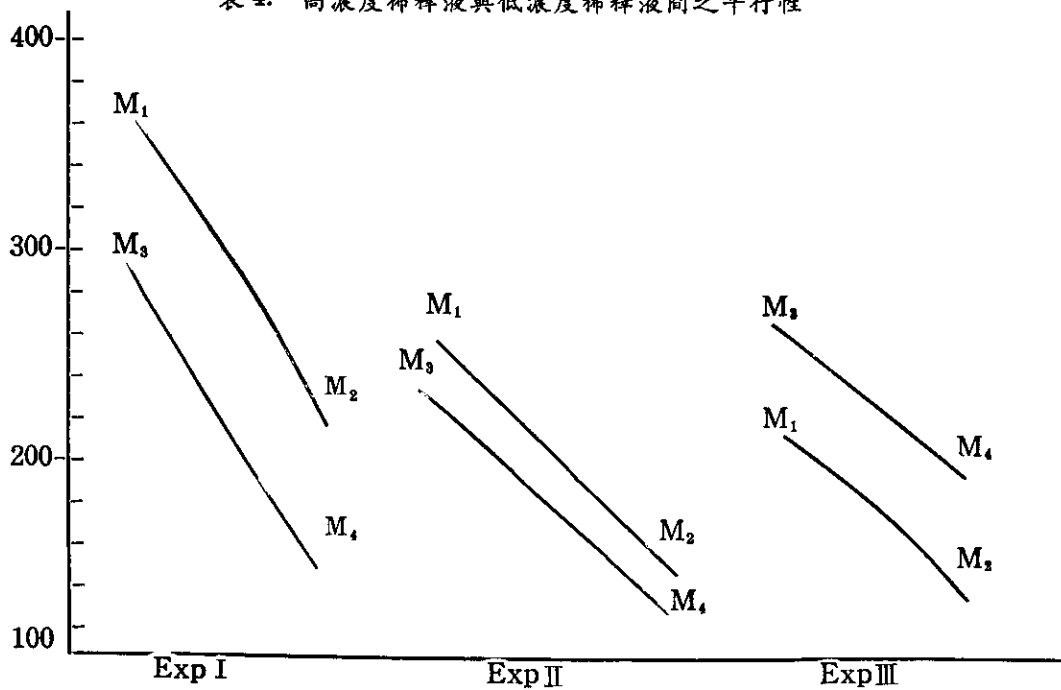
表 2. 各材料中 Albumin 之積分值與其百分率

EXP No	Repetition No	積 分 M_1	M_2	M_3	值 M_4	百 分 率 M_1	M_2
1	1	90	46	71	38	47.87(%)	56.79(%)
	2	94	50	79	34	49.73	64.92
	3	90	52	68	36	48.64	57.77
	4	86	53	80	37	48.59	62.35
2	1	68	37	65	34	45.37	45.78
	2	68	39	63	34	45.30	45.97
	3	68	38	63	34	48.53	45.97
	4	70	40	63	33	43.78	45.00
3	1	44	33	59	47	23.03	23.57
	2	43	36	59	47	24.71	25.00
	3	42	34	62	45	24.13	24.81
	4	44	35	61	46	23.15	23.64

表 3. 由四點測定法與其從來方法所得結果之比較

Exp No	由四點測定法所得之AI效力比與其母平均有在範圍	依從來方法所得之AI絕對值	M×D之有意性
1	3,527~3,899~4,310	3,905	
2	3,241~3,360~3,481	3,386	
3	1,603~1,797~2,015	1,425	* *

表 4. 高濃度稀釋液與低濃度稀釋液間之平行性



討 論

在以濾紙為支持體之血清蛋白電氣泳動法上，往往因反覆測定所引起之誤差而極難得到安定的測定值²⁾。究其原因被認為是因“ablumin tailing”，染色前的乾燥溫度及時間之變動及泳動時緩衝液的蒸發等所致。但是在本實驗因使用表面平滑且於操作過程上不須經過加溫乾燥之醋酸纖維膜^{3,4)}故於反覆測定上並無發現有意之差異。然而在 Exp. 3 由從來方法求得之 AI 絕對值不僅與由四點測定法求得之 AI 效力比不相接近，且在於其母平均存在範圍下限之下。同時，在材料與稀釋倍數之間的交互作用之檢定中出現有意性之存在。

在應用四點測定法上，高低二濃度之測定必須具有直線性且必須互相平行。然而在 **Exp. 3** 高低二濃度之直線間却缺乏平行性。亦即表示材料與稀釋倍數之間存有交互作用，由稀釋倍數所引起色素結合價的增減却隨材料之不同而變化。對於引起此種變化之原因可能與所使用之血清原液之總蛋白濃度之過低有關。

在以濾紙為支持體之電氣泳動法上 **Jencks** 等對蛋白濃度與各種色素攝取力間的直線性，或者色素攝取力與光電濃度反應間的直線關係均有詳細的討論。但是在使用醋酸纖維膜與 **Poncaeu-3R** 色素之電氣泳動法上，尤其是對低濃度蛋白之此種關係仍未有明確的定論。因此 **Exp. 3** 中由四點測定法與從來方法所得測定值之不相一致是否與這些因子有關尚須待今後之追究。

在血清總蛋白量較高之 **Exp. 1** 與 **Exp. 2** 中均顯示利用四點測定法不僅單實施一次之泳動即能同樣達到使用從來方法時之目的，並且因為除了蛋白濃度之效力比外，同時能夠求得其母平均之存在範圍。因此，相信本方法不僅能夠取代操作繁雜而消耗試料甚鉅之從來方法，且更能提高在臨床上之應用價值。

結 論

1. 生物統計學上的四點測定法被嘗試導入於牛血清蛋白之電氣泳動上。
2. 由三頭荷蘭種牛所得之血清利用醋酸纖維膜為支持體之電氣泳動加以分離。
3. 每一實驗均按拉丁方格法重複實施四次並以要因分析法檢定每一因子之有意性。
4. 由四點測定法所得之血清材料內之A1效力比與由總蛋白量和相對濃度所計算之A1值相一致。

參 考 文 獻

1. 阿部：最新醫學 No. 2, Vol. 21, 1966
2. Kojima, Y.: Jap. J. Vet. Res., No. 4, Vol. 7, 1959
3. Kohn, J.: Nature, No. 4612, Vol. 181, 1958
4. Kohn, J.: Nature, No. 4674, Vol. 183, 1959
5. 森、小林：濾紙電氣泳動法の實際，南江堂 1958
6. 佐久間：生物檢定法，東京大學出版會 1966
7. Sato, K.: Jap. J. Vet. Res., No. 2, Vol 12, 1964.
8. 鳥居、高橋、土肥：醫學、生物學のための推計學東京大學出版會19

A Simplified Method for Determining the Bovine Serum Protein

By Sung Weng-Kong

(Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health)

English Summary

(1) It has been tried to introduce the four-point assay into the electrophoretic technique to estimate the concentration of bovine serum protein.

(2) The blood serums obtained from 3 cows were separated with electrophoresis using the cellulose acetate membrane as supporting medium.

(3) Each experiment was duplicated for 4 times as the Latin-square design and the analysis of variance was used for testing the significance of each factor.

(4) The potency ratio of the albumin in serum samples estimated by the four-point assay did correspond with the value measured by total protein content and relative concentration.