

一般预电泳, 2000V、30 分钟即可完成。对于长 40cm 的 6% 的凝胶, 3000V 时溴酚蓝 40 分钟可泳动到胶底, 2000V 时二甲苯蓝 FF, 3 小时可泳动到胶底。

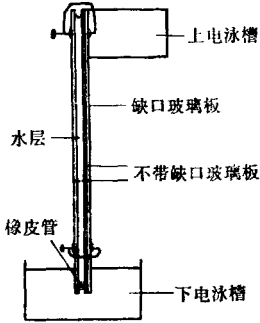


图 3 附有散热水层的电泳装置

4. 放射自显影 电泳结束后用刮脸刀片分开玻璃板, 凝胶与 Silane 处理过的带缺口的玻璃板联在一起。将凝胶在 10% 乙酸中浸泡 15 分钟以上, 除去凝胶中的尿素并固定核酸带。凝胶表面用水洗一下, 滤纸吸干后, 置于 80℃ 烘箱中 1 小时烘干。复上 X 光底片后即可在室温下曝光。

5. 凝胶的除去 放射自显影后将联有凝胶的玻璃板放在 10% 的 Deconex (瑞士 Borer Chemie AG 公司出品的去污剂) 中浸泡过夜即可将凝胶从玻璃板上除去。KOH 溶液也可将凝胶除去。

综上所述, 超薄凝胶由于极大地减低了 β 粒子在凝胶中的散射和自吸收, 短时间的电泳和电泳后的固定又减少了核酸带在凝胶中的扩散, 所以大大提高了核酸带的分辨率。电泳时凝胶上所附的散热水层也使放射自显影带谱平整, 这也增加了一块凝胶中可读出的核酸序列的碱基数。此外缩短了电泳时间和曝光时间, 可在室温中曝光, 都是超薄胶技术不可忽视的优点。其缺点是做胶时比较困难, 加样时因毛细管极细, 样品中的细微沉淀易堵塞毛细管, 样品体积小, 所以要求样品放射性计数较高。

参 考 文 献

- [1] Sanger, F., et al.: *FEBS Letter*, **87**, 107, 1978.
- [2] Garoff, H., et al.: *Anal. Biochem.*, **115**, 450, 1981.

[本文于 1982 年 5 月 17 日收到]

胃 泌 素 的 提 取 和 纯 化

王 培 之 王 贤 舜

(中国科学技术大学)

胡相钊 邹长康 张树中 盛海琳 张博林

(中国人民解放军 104 医院)

倪元东 尚文学 徐占民

(安徽省阜阳生化制药厂)

早在 1905 年, Edkins 从猫的胃窦部粘膜中, 提取胃泌素的粗制品, 发现它具有很强的刺激胃酸和胃蛋白酶分泌的作用。直到 1964 年 Gregory 和 Tracy 才从猪胃窦粘膜中提取到纯的胃泌素, 并确定它是由 17 个氨基酸组成的多肽。1968 年 McGuigan 首先用放射免疫的方

法, 测定了血清胃泌素的含量, 从而使胃泌素的研究取得了更大的进展。1979 年 Barbara E. Noyes 等测定胃泌素的 mRNA, 并且通过检测胃泌素的基因, 弄清了胃泌素原及其前体的大小, 确证所谓大大胃泌素、大胃泌素、胃泌素和小胃泌素之间的关系。近几年来, 还发现脑中

亦存在这种多肽,认为它是探索这类多肽作用机理的一个很好实验材料。此外,在临床医学上胃泌素也用于诊断和治疗疾病,尤其是对胃泌素瘤(又称 Zollinger-Ellison 瘤或综合症)、萎缩性胃炎、残留胃窦综合症、甲状旁腺机能亢进具有诊断参考意义;对萎缩性胃炎、低胃酸症等具有治疗作用。但国内目前尚未生产。我们按照 Gregory-Tracy 方法,并作了些改进,从每批六百头猪的胃窦粘膜中,提取到最高达 50.06 毫克的胃泌素,并经过 AE-Cellulose 柱,进一步纯化和分离成胃泌素 I(GI)和胃泌素 II(GII)两个组分。氨基酸组成分析、电泳和末端分析的结果与进口的人工合成胃泌素 I 完全一致,且生理效果显著。

一、材料和方法

1. 材料 新鲜猪胃窦 600 个(阜阳肉联厂提供); DEAE 纤维素和 Sephadex G-50 (进口分装); AE 纤维素采用 Whatman AE11; 去过氧化物异丙醇、去过氧化物乙醚及其余试剂均为国产分析纯。

2. 方法 ①取新鲜猪胃窦 600 只,剔除油脂,在冷水中轻轻漂洗干净,加 60 立升清水,煮沸半小时,冷却,放置 4℃ 冰库过夜。倒出上清液用纱网捞去上层油脂,离心;取上清液,加冷水使成 125 立升,倒入 300 克 DEAE 纤维素,搅拌 3 小时;在布氏漏斗中铺上尼龙布过滤,纤维素呈灰褐色;用蒸馏水洗,再用 4000 毫升 0.1N NaOH 洗脱(胃泌素在此溶液中于室温下放置数小时一般不会明显降低活力)。用冰醋酸调至 pH7,冷却到 10℃ 以下;再调 pH 到 4,冷藏过夜;加入用酸洗过的硅藻土,在布氏漏斗中过滤;将滤饼放入 -20℃ 以下冰箱保存,一般在几周内不会降低活力。

②从冰库取出滤饼,在 15—20℃ 环境下溶化,加 550 毫升水;用 18N 氨水调至 pH10,使充分溶解后,离心去除硅藻土等杂质;洗沉淀物再离心合并洗出液,使最后体积达到 600 毫升。加入 300 克磷酸氢二钾,搅拌,然后一边用力搅拌,一边慢慢加入 480 毫升异丙醇,加毕再搅拌

30 分钟;离心(2000 转/分,30 分钟)收集上清液,再加入 2 倍体积的乙醚和 50 毫升水,充分振摇;离心,去除上层乙醚,水相为淡黄色,约 300 毫升;加 2 倍体积乙醚,充分振摇,离心,收集水相;在室温下抽去残存的乙醚,然后,在 10℃ 时,用冰醋酸调到 pH4,冰藏过夜。

③将上述溶液离心,收集沉淀物;加入相当上清液一半体积的水(约 90 毫升),边搅拌边滴入 18N 氨水,使沉淀完全溶解,最后 pH 为 10。在 10℃ 时,用冰醋酸调到 pH4;几小时后,放在 50 毫升的离心管中,离心收集乳白色沉淀物;加入 5 毫升重蒸水,滴几滴 18N 氨水使之溶解,加入 0.5 克蔗糖,做成上柱样品。

Sephadex G-50 柱(3cm × 100cm)用 0.04M 碳酸氢铵溶液平衡;加入上述样品液,在低于 10℃ 下,用 0.04M 碳酸氢铵溶液洗脱;每 10 分钟收集一管,每管 5 毫升;用紫外分光光度计在 280nm 读数,结果见图 1,收取第 99—123 管,加入 1 倍体积重蒸水,使溶液碳酸氢铵浓度成 0.02M。

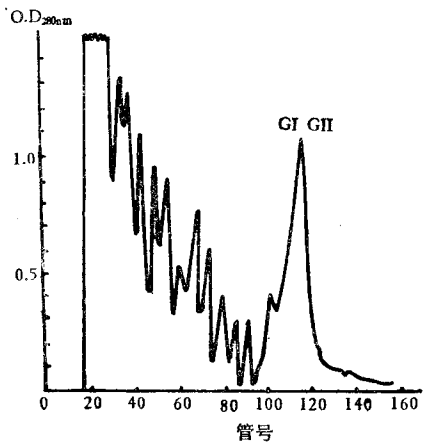


图 1

AE 纤维素柱(1cm × 30cm)用 0.02M 碳酸氢铵溶液平衡,将上述样品液过柱,每分钟 4—5 滴,流出液在 280nm 读数为 0;柱上端呈黄褐色,说明蛋白质和多肽已完全吸附在柱上。用 0.02M—0.20M 碳酸氢铵 180 毫升进行梯度洗脱,每 15 分钟收集一管,每管 1.3 毫升;在 280nm 读数,结果分成三个主峰(图 2)。根据

文献报道和放射免疫方法鉴定, 后两个峰分别为胃泌素 I 和 II, 收集 130—180 管, 逐管分装安瓿瓶, 冷冻干燥, 低温保存。

组成比例也完全和一级结构分析相符合。

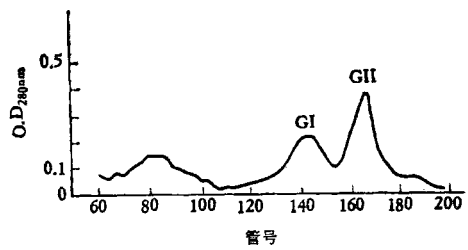


图 2

二、结果和讨论

1. 电泳: 用普通新华滤纸 (1mm), 0.1N pH9 的硼酸钠电极缓冲液, 电压梯度为 15V/cm, 时间 20 分钟, 以亚胺-氯试剂显色, 结果只有一个点 (见图 3)。说明本品基本上达到电泳纯。

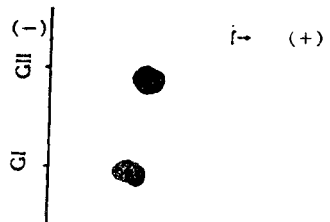


图 3

2. DNS-Cl 法进行 N-末端分析: 因为胃泌素的 N-末端是焦性谷氨酸, 无 α -氨基, 而一般条件下又较难开环, 因此, 用这个方法分析时聚酰胺薄膜上只见一个 DNS-NH₂ 点, 而未见其它明显的 DNS-氨基酸点。说明此产物已达到一定纯度。

3. 氨基酸组成分析: 以美国进口的人工合成的胃泌素 I 作对照。测定的条件是: 用 5.7N HCl, 108℃, 24 小时水解。蒸去 HCl 用 0.02NHCl 溶解, 上 HITACHI (日本)-835 型 AAA 分析仪, 结果见图 4a,b。

因人的 GI 在第 5 位上的氨基酸是亮氨酸, 而猪的 GI 在第 5 位上的氨基酸是甲硫氨酸。因此, 除亮氨酸外, 其它峰完全一致。氨基酸的

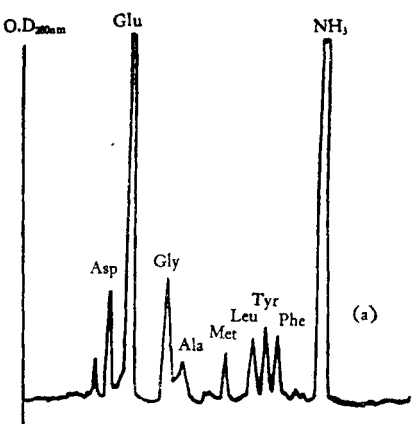


图 4a 人胃泌素氨基酸分析

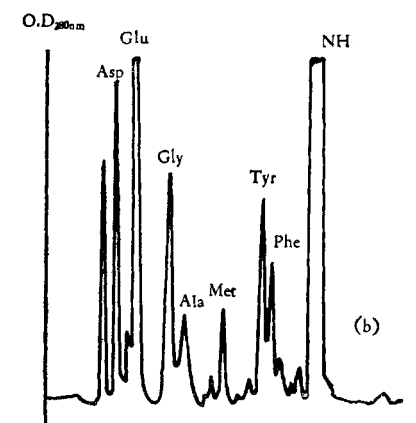


图 4b 猪胃泌素氨基酸分析

4. 胃泌素的生理活性测定: 用插胃管的方法, 先抽净狗的空腹胃液, 然后持续吸引。收集一小时的基础胃液, 收集完毕后, 立即给狗皮下注射 6 微克/公斤体重的胃泌素。之后, 又持续吸引收集经过 15 分钟, 30 分钟, 45 分钟和 60 分钟的胃液, 分别测定胃液量和游离酸度。结果发现在注射后 15 分钟至 45 分钟时, 狗的胃液分泌量和游离盐酸均有明显增加; 到 60 分钟后, 胃液和游离酸的分泌量逐渐恢复到原有水平。与一小时的基础胃液相比较, 胃液量增加到 6.07 倍, 游离盐酸增加到 79.12 倍, 说明我们提取的胃泌素有较显著的生理活性 (图 5)。

从上述结果看, 用本法制得的胃泌素纯度和生物活性都与进口纯品一致, 可供生理、生化科研及临床诊断使用。成本较低, 产量较高, 适

合大规模生产。

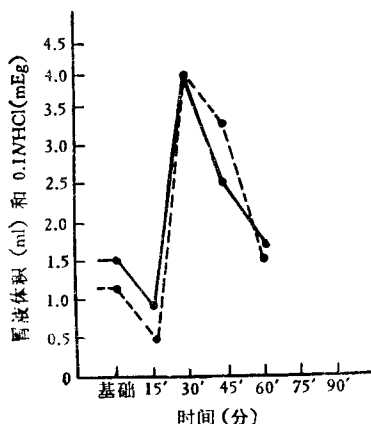


图 5

——胃液体积;-----0.1N盐酸

参 考 文 献

[1] Gregory, R. A. et al.: *Gut.*, 5, 103, 1964.

- [2] 伊藤新: 细胞 (特集消化管的内分泌 I), 11(12), 22, 1979.
- [3] 矢内原升: 细胞 (特集消化管的内分泌 I), 11(12), 34, 1979.
- [4] 冯佑民、鲁子贤等: 《生物化学与生物物理进展》, 1979年, 第5期, 第1页.
- [5] Guye, Abraham: *Clinical and Biochemical Analysis Handbook of Radioimmunoassay*, 469, 1977.
- [6] Danenport, H. W.: *Physiolog of the Digestive Tract*, 1971.
- [7] Rydon, H. N. et al.: *Nature (London)*, 169, 922, 1952.
- [8] Wingerson, Lois: *New Scientistist*, 86, 1201, 16, 1980.
- [9] Barbara, E. Noyes et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 76, 4, 1770, 1979.

[本文于1982年1月18日收到]

本工作承中国科学院上海生物化学研究所、上海化学试剂供应站、中国科学院原子能所、苏州医学院第一附属医院同位素室和中国医学科学院基础研究所给予大力支持, 特此致谢。

辅酶 I 的简易提纯方法

季 钟 煜*

(中国科学院上海生物化学研究所东风生化试剂厂)

辅酶 I 为一重要的生物化合物。二十年前我国已大量生产, 纯度为 60—80%^[1], 并曾用离子层析法加以提纯。国际上也分二步制成其纯品^[2]。

但据 Daziel 报告^[3], 市售 99% 纯辅酶 I 或结晶辅酶 I 奎宁盐中仍含有微量抑制剂, 若用二乙氨乙基纤维素 (DEAE-Cellulose) 分离得纯辅酶 I 溶液, 才可用于酶学研究。后来由 Winer^[4] 制成了结晶辅酶 I (100% 纯), 并将其紫外克分子消光系数修正为 17.8cm²/mol。

本文作者以 500mg 粗制品为一个操作单元, 其中辅酶 I 在树脂层析色谱上的分布较为集中, 回收率好, 操作方便, 无需特殊设备, 对一般生化实验室都能适用。

一、实验及结果

1. 吸附 500mg 辅酶 I (68.6% 纯, 东风生

化试剂厂出品) 溶于 20ml 水, 过滤。清液中滴加 1N NaOH 至 pH6, 在低于 20℃ 处时以 2ml/分流速通过甲酸型 Zerolit FF 柱 (1.6 × 13cm, 80—120 目, 树脂按前文^[1]方法处理)。吸毕后, 用 1 立升水流过柱洗至流出液的 260nm 光密度小于 0.1, 共需 20 小时。上柱排出液及水洗液内都不含辅酶 I (用醇脱氢酶测定)^[5]。

2. 梯度洗脱 按图 1 说明装配实验。先把 b 管插入 A 瓶, 以 1ml/分流速洗涤 5 分钟, 使体系恒定。再取出 b 管, 插入 B 瓶以同速洗脱。柱底与部分收集器相连, 分管收集流出液, 每管为 7ml。

洗脱时, C 瓶内甲酸浓度渐增, 柱底流出液 pH 渐降。测定各管 260nm 光密度及用酶法定出辅酶 I 含量。绘此三曲线于图 2。可知柱底

* 现在在中国科学院上海生物化学研究所工作。