

单组分胰岛素的制备和鉴定

彭兴华* 李桐芬 朱尚权

(中国科学院上海生物化学研究所)

单组分胰岛素(Mc-Insulin)在国外已在临床上应用并取得很好的效果。国内目前所用的仍是含少量多种杂质的结晶胰岛素。为了满足科研上的特殊要求,如制备胰岛素抗体,标准胰岛素样品,我们按 Schlichtkrull 等^[1-2]所报道的方法用 QAE-Sephadex A-25 柱层析从结晶胰岛素分离得到聚丙烯酰胺凝胶电泳和等电聚焦呈均一的 Mc-Insulin。产率 70% 以上。产品仍能结晶。

材料与方 法

材料 结晶猪胰岛素为上海生化制药厂出品,生物活力为 27 单位/毫克。Sephadex G-50 fine, DEAE-Sephadex A-25 和 QAE-Sephadex A-25 为 Pharmacia 产品, Ampholine 为本所东风生化试剂厂出品。其它试剂均为分析级。

方法 凝胶等电聚焦电泳:用聚丙烯酰胺凝胶,浓度为 7%,含 40% 脲。Ampholine 为 pH3—10。聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳:胶浓度为 7.5%, pH8.9, 电压 220—240 伏,电流 3 毫安/管,电泳 2.5 小时,用考马斯亮蓝 R-250 染色^[3-4]。

实 验 与 结 果

1. Mc-Insulin 的制备 QAE-Sephadex A-25 分离柱为 1.5 × 25 厘米。洗脱液 I 为 0.06M Tris (pH8.4, 含 0.08M NaCl 和 60% 乙醇),洗脱液 II 为含 60% 乙醇的 0.1N HCl 溶液。柱预先用洗脱液 I 平衡。结晶猪胰岛素 (150 毫克), Tris (28.2 毫克) 和 EDTA (6 毫克) 一起用洗脱液 I 溶解,离心除去不溶物,不溶物的多

少取决于结晶胰岛素的质量。清液上柱分离,样品上柱后先用洗脱液 I 洗脱,待胰岛素主峰完全流出后改用洗脱液 II 继续洗脱。分离在 7—10℃ 下进行。分离结果见图 1。

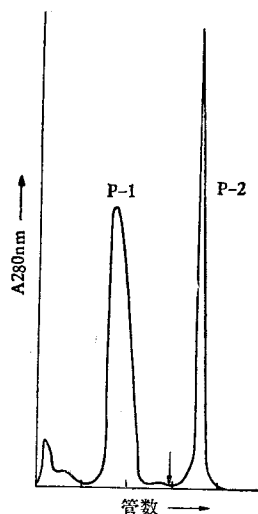


图 1 结晶猪胰岛素在 QAE-Sephadex C25 (1.5 × 3 厘米) 上的分离
(箭头表示更换缓冲液 II)

各峰分别合并后在 35℃ 水浴下减压浓缩至干,用醋酸溶解,通过 Sephadex G-25 柱去盐,冻干,得 Mc-Insulin。回收率一般为 70% 以上。

2. Mc-Insulin 的鉴定

(1) 聚丙烯酰胺凝胶电泳 Mc-Insulin 在聚丙烯酰胺盘状电泳上为一条带(见图 2 中)。

(2) 等电聚焦电泳 Mc-Insulin 在聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳也呈均一条带(图 3)。

* 湖南医学院生化教研组

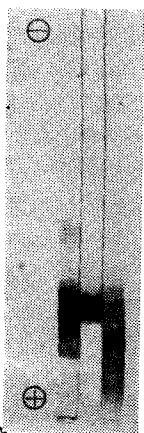


图 2 单组分胰岛素聚丙烯酰胺凝胶电泳行为 (pH8.9)左为结晶胰岛素;中为 Mc-Insulin;右为图 1 中的 P-2。

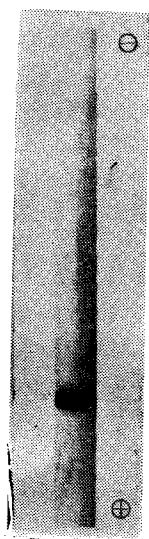


图 3 单组分胰岛素等电聚焦电泳行为

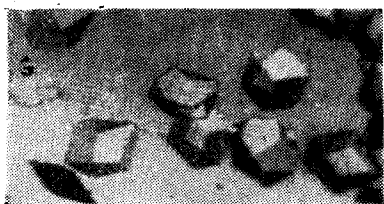


图 4 单组分胰岛素的结晶

(3) 结晶。Mc-Insulin 冻干粉 (5mg) 溶于 0.02 NHCl (0.5ml), 加入 0.15 毫升丙酮和 0.08 毫升 1% ZnCl₂, 摇匀后加入 0.25 毫升 0.2M 柠檬酸钠, 得清液, 在 20—25℃ 下放置 2—3 天,

可得漂亮的结晶 (见图 4)。

讨 论

用 QAE-Sephadex A-25 柱层析分离制备 Mc-Insulin 的效果往往取决于原料的质量。如果原料中含大分子的杂质较多, 尤其是胰岛素原含量较高时, 分离前需通过 Sephadex G-50 柱以除去大分子。一般可用 N 醋酸洗脱。另一方面, 原料的质量不好, 用 QAE-Sephadex A-25 柱分离时, 不溶物显著增加。我们也曾用 QAE-Sephadex A-25 和 DEAE-Sephadex A-25 柱层析分离纯化胰岛素, 但效果都不如用 QAE-Sephadex A-25 柱层析。

上述方法也适用于制备较大的量的 Mc-Insulin。我们曾用 8 × 12 厘米的 QAE-Sephadex A-25 柱, 一次可分离 2 克结晶胰岛素。效果仍然很好。

参 考 文 献

- [1] Schlichtkrull, J. et al.: *Horm. Metab. Res. Suppl.*, 5, 134, 1974.
- [2] Schlichtkrull, J. et al.: in *Handbook of Experimental Pharmacology* (Hasselblatt, A. et al. eds.) 32(2), 754, 1975, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York.
- [3] 张树政等: 《化学通报》, 1, 30, 1973.
- [4] 莽克强等编: 《聚丙烯酰胺凝胶电泳》, 1975年, 科学出版社。

[本文于1982年5月14日收到]

核酸蛋白检测仪性能与相关因素初探

邵 嘉 兴 田 湘 勇

(中国科学院新疆化学研究所, 乌鲁木齐)

柱层析具有一些独特的优点, 已成为有机化学, 生物化学和医学研究中一种普遍应用的分离手段。随着新型载体的诞生和检测方法的改进, 其应用范围还在扩大。此法可将样品物质按不同的分子量进行分离, 层析柱的末端检测则是获取分离结果的重要环节。物质在光的

作用下, 原子由较低电子能级向较高电子能级跃迁。由于电子能级间的跃迁具有较严格的选择规律, 吸收 $E = h\nu$ (h 为普朗克常数, ν 为光的频率, E 为能级差) 的能量, 所以物质对光的吸收也具有明显的选择性, 即不同的物质具有不同的光谱吸收峰。据此原理制成的核酸蛋