

成的很多机理问题,到现在仍然不很清楚,摆在我们面前的仍是一个引人入胜的未知世界。

参 考 文 献

- [1] Nathans, D. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **48**, 1421, 1962.
- [2] Lockord, R. E., et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **37**, 204, 1969.
- [3] Pelham, H. R. B., et al.: *Eur. J. Biochem.*, **67**,

- 247, 1976.
- [4] Efron, D.: et al.: *Virology*, **53**, 343, 1973.
- [5] Carlier, A. R., et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **447**, 436, 1976.
- [6] Srivatsan, E. S., J. D. Indian: *J. Biochem. Biophys.*, **13**, 284, 1976.
- [7] Mathews, M. B., et al.: *Eur. J. Biochem.*, **17**, 328, 1970.

[本文于1982年10月7日收到]

蛇 毒 蛋 白 的 双 向 电 泳

(一种快速简便不含变性剂的双向电泳技术)

蒙义文 莫卫平 徐维政 陈素文

(中国科学院成都生物研究所)

自 Kaltschmidt 和 Wittmann (1970) 用碱一酸系统的双向凝胶电泳法成功地分析了大肠杆菌核糖体蛋白的组分以来,双向电泳技术得到不断的发展与改进,成为分析复杂蛋白质混合物的有效工具。

为了建立一种程序简单、操作方便、保持天然蛋白质活性的高分辨力的双向电泳技术,我们在前人^[5-10]工作基础上作了部分修改,设计了在整个过程中不用蛋白解离试剂,并用普通的丙烯酰胺盘状电泳作第一向,把分辨力高的薄层电聚焦作第二向,对蛇毒蛋白进行了双向电泳分析,效果较好。

一、材料和方法

材料 蛇毒蛋白,采用辽宁蛇岛的蛇岛蝮 (*Agkistrodon Shedoensis zhao*) 的蛇毒蛋白。

贮液配法 (1) 30% 的丙烯酰胺溶液;(2) 分离胶缓冲液:1N KOH-醋酸缓冲液(pH4.3);(3) 20% 丙烯酰胺溶液;(4) 浓缩胶缓冲液:1N KOH-醋酸缓冲液(pH6.7);(5) 0.04% 核黄素溶液;(6) 电极缓冲液: β -丙氨酸-醋酸缓冲液(pH4.5)。以上配法参照 Gabriel (1971) 推荐的酸性和碱性盘状电泳的方法。(7) 0.01%

次甲基蓝水溶液;(8) 20% 蔗糖溶液;(9) 40% (W/V) Ampholine 溶液;(10) 87% 甘油溶液;(11) 固定液、染色液、退色液及保存液等均参照 LKB 公司推荐的程序 (Djupsund 1976)。

实验方法

1. 第一向电泳(酸性盘状电泳) (1) 灌胶、聚合 采用内径 2.8mm 外径 8mm 长 105mm 的匀质玻管,涂上 0.1% 吐温,干燥后灌胶;7.5% 的分离胶混合液为 30% 丙烯酰胺溶液:分离胶缓冲液:核黄素溶液:蒸馏水, (2:1:1:4), 混合后抽气 10 分钟,立即灌胶,8ml 混合液可灌 12 管,室温下,2×20 瓦荧光灯照射聚合约 40 分钟后灌浓缩胶;3.3% 浓缩胶混合液为 20% 丙烯酰胺溶液:浓缩胶缓冲液:核黄素:蒸馏水, (1:1:1:3);灌柱高 10mm,同前光聚合约 30 分钟后即可使用。(2) 加样 取蛇毒蛋白样品 2mg 溶于 60 μ l 的 20% 蔗糖溶液中,加少许次甲基蓝溶液,每管加入样品约 1mg/30 μ l。(3) 电泳 采用通常盘状电泳用的圆筒形电泳槽,其中上下槽各盛约 1 升电极缓冲液,上槽接电源正极,下槽接负极,样品走向从正到负,电泳时采用恒定电流 1.5mA/管,指示剂(次甲基蓝)走到胶柱末端后,再电泳半小时,共约 4 小时。(4)

电泳后处理 挤出凝胶柱，立即浸入 1/20 Ampholine (pH3.5—10) 的水溶液中，每根胶柱约需 1ml，不时摇动平衡半小时。

2. 第二向电泳(薄层电聚焦) (1)灌胶、聚合 灌胶模型是由一有机玻璃板 (125×100×4mm) 上粘有 $\phi 2.8 \times 80\text{mm}$ 的半圆柱条作模板，以及橡皮垫圈 (厚 1.5mm)，支撑玻璃板等组合成 (图 1)，有机玻璃板预先涂上吐温，干燥后，用强力夹安装好，即可灌胶。凝胶混合液比

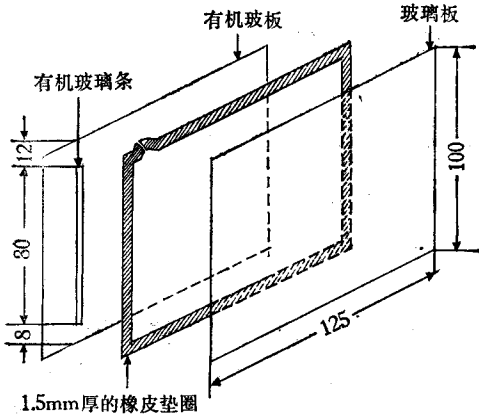


图1 第二向等电聚焦薄层凝胶模型示意图

例是：30% 丙烯酰胺溶液 5ml，87% 甘油 3.5 ml，水 17.7ml，TEMED $21\mu\text{l}$ ，Ampholines pH 3.5—9.5 共 1.8ml (其中含 pH4—6 的 0.1ml；pH5—7 的 0.1ml；pH9—11 的 0.2ml；pH3.5—10 的 1.4ml)；核黄素溶液 2ml，总体积为 30ml，可灌注两块胶板。溶液混合后，抽气 10 分钟，立即灌注，室温下光聚合 30 分钟，置冰箱中备用。电泳之前，除去有机玻璃板和橡皮垫圈，凝胶板上呈现一条由半圆形的有机玻璃柱条印成的长槽，即第二向电泳的样品槽。(2)电泳 第二向(电聚焦)电泳使用 LKB 2117 Multiphor 装置，凝胶板的长边正好与该电聚焦槽宽度一致。将凝胶板连同其支撑玻璃板一齐平放在电聚焦槽上，沿凝胶的短边 (100mm) 贴上各被 $1\text{M}\text{H}_3\text{PO}_4$ (正极) 和 1M 的 NaOH (负极) 浸湿的电极滤纸条，将已经平衡过的凝胶条 (第一向盘状电泳的) 置于凝胶板上的样品槽中，而在样品槽旁较宽 (12mm) 的一方，放上一块被 $0.5\text{mg}/25\mu\text{l}$ 水的样品液浸湿了的 $5 \times 10\text{mm}$ 滤纸片作为单独

电聚焦 (第二向) 的对照。样品槽靠正极，电聚焦采用恒功率 6瓦/板，聚焦半小时后除去样品滤纸片，继续聚焦 1 小时，共 1.5 小时。全过程中电压从 250 伏左右可上升到 1000 伏左右，电流则从 20mA 下降到约 8mA。(3) 电泳后处理 电聚焦毕，取出凝胶，置固定液中过夜，用退色液浸泡 2 次 (每次 5 分钟) 以除去 Ampholines，在 60°C 的染色液中染色 30 分钟后置退色液中，每隔 1—2 小时换一次新的退色液，直至背景清晰，再移到保存液中浸一小时，取出用玻璃纸包裹凝胶板，平放于玻璃板上，四周用胶布固定，室温下干燥 2—3 天，使成一薄层干胶板，可长期保存。

3. 凝胶 pH 梯度的测定 电聚焦结束后，沿样品走向切下 10mm 宽的一条凝胶，再每隔 10mm 横切成小块，每一小块放入 2ml 的蒸馏水中浸泡 10—20 分钟，然后在 pH 计上测 pH 值。

二、结果与讨论

1. 以往的双向电泳程序都是将第一向的柱状凝胶条装入第二向凝胶板的顶端，作垂直板状的第二向电泳。Tuszynski (1979) 在第二向作卧式平板电聚焦时，也是将第一向凝胶条嵌入第二向胶板灌注模型中，再灌入凝胶液一起聚合，我们设计模型灌注的胶板，可直接将第一向凝胶条放入第二向胶板样品槽中，程序大大简化了。

自 O'Farrell (1975) 以来的多数研究者在双向电泳的电聚焦中采取恒定电压，持续时间达十几小时甚至几十小时，后来 (1977) O'Farrell 发现由于电聚焦时间过长引起碱性端区带模糊，遂采用恒定电压 400 伏，持续 4—5 小时。以后高见博 (1978) 采用逐步升高电压的方式，如恒定电压 50 伏 45 分钟；100 伏 45 分钟；200 伏 60 分钟；400 伏 200 分钟，共持续约 6 小时。我们参照 LKB 公司方法，(Djupsund 1976)，在第二向电泳时采取恒定功率，即每块胶板恒定功率 6 瓦，持续 1.5 小时，并与恒定电压 400 伏持续 5 小时作比较，结果两种双向电泳图谱都

很好,为省时计,我们推荐恒定功率,由之,我们采用的方法较之以往快速简便。

2. 分辨力 赵尔宓等(1981)用垂直板状聚丙烯酰胺凝胶电泳将蛇岛蝮蛇毒蛋白分离出约二十条谱带。武天爱(1981)用加有 7M 尿素的管状凝胶等电聚焦将浙江产的蝮蛇蛇毒蛋白分离出 33 条区带。我们曾用垂直板状 SDS 凝胶电泳将蛇岛蝮蛇毒蛋白分离出约 20 条谱带(未发表),而采用薄层凝胶电聚焦分析法将该蛇毒蛋白分离出 42 条谱带(蒙义文等 1981)。现在我们用酸性不连续系统的盘状电泳-等电聚焦法将同一蛇岛蝮蛇毒蛋白分辨出 121 个蛋白质斑点(图 2)。可见盘状-等电聚焦的双向电泳保持了高分辨力这一特点,较之单独的 SDS 电泳,盘状电泳,电聚焦等分辨力有显著提高。

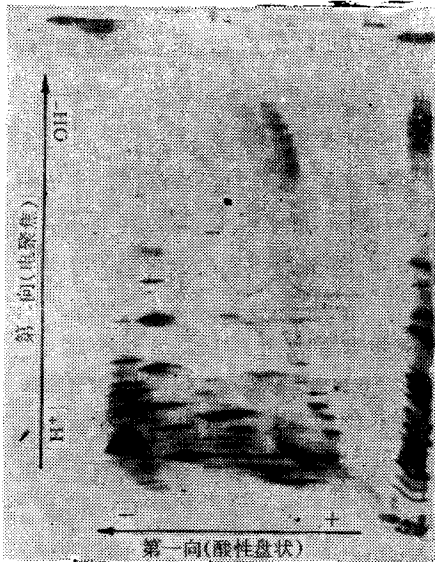


图 2 蛇岛蝮蛇毒蛋白双向电泳图谱

3. 第一向电泳凝胶取出后,进行第二向电泳之前,一般都用第二向的缓冲液平衡,但也有人(Manabe 1979)主张不平衡。我们作了对比试验,结果双向图谱基本一样,但未平衡的图谱斑点较模糊,凝胶板底色较深,退色时间需要延长,我们建议采用平衡 30 分钟,平衡液用 1/20 的商品 Ampholine 溶液 (pH3.5—10)。

4. 本双向电泳方法,全过程不使用变性试剂,蛋白质样品在分离后仍可保持天然活性,这对双向电泳后尚需作酶显色及免疫反应等的样

品特别适宜。

5. 我们在分析蛇毒蛋白样品时,不便事先标记作放射自显影曝光,只能作蛋白染色使斑点显示,然由于蛋白组分浓度差异大,染色深浅悬殊,以致弱的斑点仅能肉眼分辨,给照相记录带来困难,为此,参照 Manabe (1979) 的方法,将几种不同曝光强度的照片综合成一张模式图,以补照片之不足(图 3)。

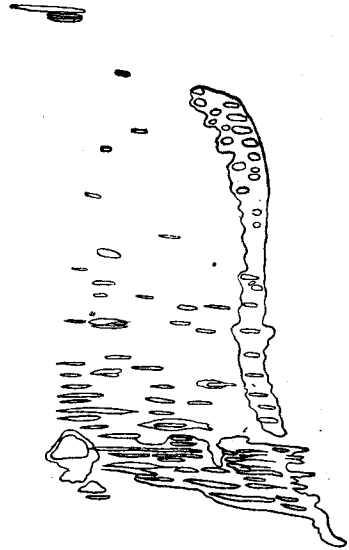


图 3 蛇岛蝮蛇毒蛋白双向凝胶电泳图谱模式图

参 考 文 献

- [1] 赵尔宓等:《动物学报》27(3), 213, 1981.
- [2] 武天爱:《动物学研究》2(2), 169, 1981.
- [3] 蒙义文等:《两栖爬行动物研究》5(13), 81, 1981.
- [4] Djupsund, B. M.: *LKB Application Note*, 243, 1976.
- [5] Kaltschmidt, E. et al.: *Anal. Biochem.*, 36, 401, 1970.
- [6] Madjar, J. J. et al.: *Anal. Biochem.*, 92, 174, 1979.
- [7] Manabe, T. et al.: *J. Biochem.*, 85, 649, 1979.
- [8] O'Farrell, P. H.: *J. Biochem.*, 250, 4007, 1975.
- [9] O'Farrell, P. Z. et al.: *Cell*, 12, 1133, 1977.
- [10] Tuszynsk, G. P. et al.: *Anal. Biochem.*, 93, 329, 1979.
- [11] Gabriel, O.: *Methods in Enzymology*, 22, Academic Press inc. New York and London, 1971.
- [12] 高见博:《蛋白质 核酸 酵素》23(8), 924, 1978.

[本文于1982年11月29日收到]