

琼脂糖平板制备聚焦电泳

姚志建 郭燕捷 陈邦本 马立人

(军事医学科学院 北京)

在现有的各种蛋白质、多肽的分析方法中,等电聚焦的高分辨率是十分突出的。但以聚焦电泳来进行制备分离的却并不多,主要原因是缺乏比较实用的方法。

我们在对胸腺素组分五做进一步提纯的研究中^{[1][2]},建立了琼脂糖平板制备聚焦电泳。据我们的经验,这种方法切实可行,效果良好。

一、材料、装置和方法

1. 琼脂糖平板的制作

将一张面积略大于所要制备的琼脂糖平板的亲水性聚酯膜平放在水平玻璃板上,另外从平整的橡胶膜片上用锋利的刀片切下一个矩形的方框作为“铸型”,放在聚酯膜上。面积与所要浇制的平板相等。

选用低电渗的琼脂糖(如 Pharmacia 的 IEF Agarose),按下列比例配制溶液(以一块 $254 \times 110 \times 3\text{mm}$ 的琼脂糖板为例):

(1) 甲液 0.8 克琼脂糖,6.5 克甘油,加水至 60 毫升,沸水浴中令溶。

(2) 乙液 8—10 毫升两性电解质(军事医学科学院放射医学研究所七室合成),溶入待分离的样品(在分离胸腺素组分五的工作中,我们加一克干重的胸腺素组分五粗制品),用水补充至 20 毫升,搅拌令溶。

俟甲液中的琼脂糖全部溶解后,由沸水浴中取出,稍冷片刻。将乙液倾入甲液,混合均匀,(注意避免产生气泡),立即倾入“铸型”中;待琼脂糖凝固后,在 4°C 下放置 1 小时以上即可进行聚焦。对不同大小的板,可参照上述比例制备。

2. 聚焦过程

将制好的琼脂糖板连同下衬的聚酯膜片放在平板电泳仪上,与其接触的冷却板通入约 4°C 的冷却水或乙醇。将两条宽约 5 毫米的滤纸条作电极条,分别放在板的两端。阳极滴加 1M 磷酸,阴极滴加 1M 氢氧化钠。

对于一块 $245 \times 110 \times 3\text{mm}$ 的琼脂板,我们选用电泳电源的限定值为:电压 1500 伏、电流 20 毫安、功率 8 瓦。聚焦约进行 16 小时。对于一块 $80 \times 110 \times 3\text{mm}$ 的琼脂板,限定值为:电压 600 伏、电流 20 毫安、功率 8 瓦。聚焦约进行 6 小时。

3. 分离后样品的回收

聚焦完成后,可等份地切开琼脂糖板,或将该平板置紫外灯下,按其形成的荧光谱带切开。将切下的各部份,收集到小匀浆器中,加入水或其它合适的溶剂 1—2 毫升,稍加研磨,即可转移到离心管中,用旋涡振荡器振荡半分钟。 4°C 下放置 0.5—1 小时,其间不时用旋涡振荡器振荡几次, 4°C 2000g. 离心 15 分钟。取上清,重复上述提取过程数次,合并上清。必要时可用离心减压浓缩器(江苏太仓医疗器械厂生产的 LNG-T83 型)浓缩。

二、结 果

1. 制备聚焦分离:

聚焦开始后,首先在维持电流值的条件下电压逐渐升高,然后电流逐渐下降,直至恒定。在聚焦过程中,应不时观察和记录电压、电流的变化,如出现突然的波动或无规律的变化,则应查明原因。例如是否由于冷却的效率不高而出

现局部过热,致使胶断裂或水气蒸发过多等。

对某些等电点相近的复杂混合物,如果一次聚焦尚不能得到满意的纯品,可将洗脱上清适当浓缩,合并谱图相近的部份后再用较小的琼脂糖板进行第二次聚焦,此次一般可不加或只加入少量的两性电解质(如20毫升胶液中加0.5毫升40%的两性电解质)。

图1显示胸腺素组分五中的多肽,经两次

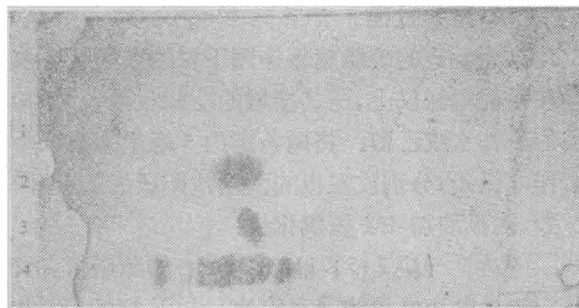


图1 经制备聚焦所得产品的分析聚焦图

样品: 1.人工合成的胸腺素 α_1 (Serva)

2.部份纯化的产品

3.二次聚焦后提纯的产品 (CP2)

4.胸腺素组分五(制备聚焦的原料)

分析条件: 6%聚丙烯酰胺凝胶,含2% pH

3.5—9的两性电介质,0.15%考马斯亮蓝R250染色。

制备聚焦纯化的结果。图2是该纯化组分的SDS聚丙烯酰胺电泳结果,两者都呈现单一的谱带。

2. 样品的回收:

为了获得合适的样品回收率需选定适当的提取次数和溶剂的性质。由表1可见,前四次提取中回收率增加得很快,自第五次以后,回收率增加就很有限了,因此我们一般只提取3到4次。

考虑到被分离的肽在不同的溶剂中或不同的pH下有不同的溶解度,因此应选择合宜的

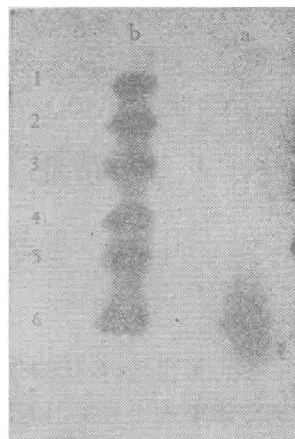


图2 提纯产品的SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳图

样品: a. 二次聚焦后提纯的产品 (CP2)

b. 分子量标准: 1.磷酸化酶 94,000,

2.牛血清白蛋白 67,000,

3.卵清蛋白 43,000,

4.碳酸酐酶 30,000,

5.大豆胰蛋白酶抑制因子 20,000,

6. α -乳清蛋白 14,000.

电泳条件: 按文献[3]的方法进行,

0.15%考马斯亮蓝 R250 染色

溶剂来提取。图3仍以胸腺素组分五为例,显示不同pH溶剂提取的结果。如选用pH较高的

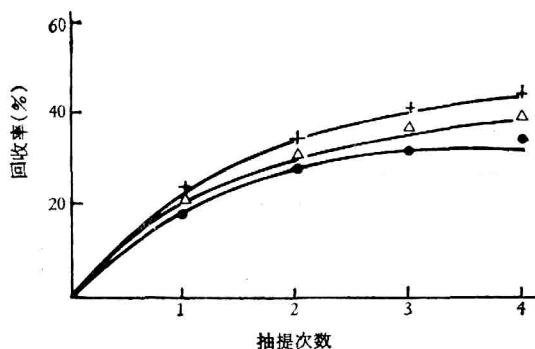


图3 不同溶剂对回收率的影响

蒸馏水 pH6.0 (●—●); 磷酸缓冲液,0.05 M,

pH 6.5' (Δ — Δ); 磷酸缓冲液,0.05 M,

pH 7.5 (X—X)。

表1 抽提次数与回收率的关系

次 数	1	2	3	4	5	6
回收多肽量(mg.)	38.0	19.6	8.9	8.9	0.86	0.38
累计回收率(%)	24.2	36.7	42.4	47.5	48.0	48.2

缓冲液,回收率有一定的提高,但如果提高不多,反而带进了以后不易处理的盐,也许是不合算的,特别是对于分子量不大的小肽。

三、讨 论

制备型聚焦电泳早有文献报道,有代表性的就是在垂直的蔗糖梯度中聚焦的柱式装置^[4]。但至今应用仍不普遍。主要的缺点是聚焦在液体介质中进行而聚焦完成后需在撤消电场的情况下才能将被分离的样品放出。这样使分离好了的各个成份又不同程度地再混合^[5],有时还会发生被分离的成份在等电点处沉淀,因此往往只能获得一个良好的聚焦图象,却拿不到纯净的产品。

琼脂糖平板制备聚焦正好克服了上述这一弱点。被分离的组分在聚焦完成后停留在其等电点附近,只要及时切割,就不可能再混合;即使沉淀,也有可能用合适的溶剂再将其溶解而洗脱。整个操作只要具备一般的多用途平板电泳仪即可完成,无须特殊的设备。

在不少蛋白质和肽的分离提取中,要获

得聚焦电泳上呈单一谱线的制品是不太容易的。往往历经冗长的分离流程后,所得的产品在聚焦谱上仍呈好几条带。此时如进行一次制备聚焦,问题往往迎刃而解。样品中待分离组分的等电点相差愈远,就愈容易分离,即使是一群像胸腺素组分五等电点相近的多肽,也有可能通过应用含窄范围两性电介质的琼脂糖平板,经连续两次的制备聚焦,使它们中的一些组分得到比较满意的分离效果的。

参 考 文 献

- [1] 姚志建等,《生物化学杂志》1(2),75,1985.
- [2] 姚志建、沈倍奋,《生理科学进展》,印刷中.
- [3] Anderson, B. L. et al.: *Anal. Biochem.*, **132**, 365, 1983.
- [4] Svensson, H., *Arch. Biochem. Biophys. Suppl.*, **1**, 132, 1962.
- [5] Righetti, P. G., "Isoelectric Focusing: Theory, Methodology and Applications", p. 96—98, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford, 1983.

[本文于1984年11月19日收到]

应用电泳滴定曲线预测离子交换层析法的最佳 pH 条件

舒 雨 雁

(广西医学院生化教研室, 南宁)

洪 息 君 班 建 东

(广西医学院药理教研室)

储 开 疆 汤 圣 希

(广西医学院蛇毒研究室)

电泳滴定曲线 (Electrophoretic Titration Curve, ETC) 是近年引人注目的一项新技术。它组合等电聚焦-电泳技术进行制备,即在含有两性电解质的聚丙烯酰胺 (PAA) 胶板上,经预聚焦形成 pH 梯度后,胶板转 90 度再经一次

电泳,使样品蛋白质按其表面电荷的性质和密度在 pH 梯度中迁移泳动形成 ETC。

ETC 的分辨力高,可用于蛋白质的纯度检测,包括单一氨基酸或蛋白质突变体;用于蛋白质表面电荷特性和等电点的检测;用于选择各