

回收凝胶中蛋白样品的电泳方法

于立平 季坤之

(南京医学院, 生化教研室)

近年来聚丙烯酰胺凝胶电泳和薄点聚焦电泳已成为分析和纯化蛋白质的主要手段之一。从凝胶中回收蛋白样品的方法很多^[1-10], 我们参考了其中 Otto^[9] 和 Strabförs^[10] 等人的方法并加以改进, 经过了一些摸索, 建立了一种从凝胶中回收蛋白样品的电泳方法。此法稳定可靠, 简易快速, 回收率高, 值得推广。

材料与方 法

1. 圆盘电泳 玻管 (10cm × 0.5cm), 胶浓度 6.2%, 电极缓冲液 (Tris-Gly, pH8.8), 样品为 Hb, 铁蛋白和正常人血清。电泳完毕后分别切取 Hb, 铁蛋白和血清蛋白条带 (约 4mm 厚), 待洗脱用。

2. 等电点聚焦电泳 玻管同上, 胶浓度 6.0% pH3—10 的 Ampholine 1%, 样品同上。电极液正极为 0.01 M H_3PO_4 , 负极为 0.02 M NaOH。电泳完毕后切取条带供洗脱用。

3. 凝胶中蛋白质的电泳洗脱 玻管同上, 浇铸 6.2%。凝胶灌到距离玻管口约 2—3cm 处作为支持胶。电极缓冲液同圆盘电泳。预电泳 (2mA/管) 3 小时。电泳完毕后吸净管内缓冲液, 将含有样品的凝胶片紧贴在支持胶上, 然后铺上一层约 1mm 厚的, 60℃ 的 1.5% 琼脂糖 (用 2.5m M Tris-75m M Gly, pH8.8 缓冲液配制)。在琼脂糖层上再注入 0.15ml 30% 甘油 (用 25m M Tris-75m M Gly pH 8.8 缓冲液配制), 其上再小心地覆盖上 2M NaCl 至管口。上述各步骤操作时要避免气泡混入。具体装置见图1。电极缓冲液同前, 电极上正下负, 4mA/管电泳 2—3 时。电泳完毕后吸去 E 层大部液体,

收集剩余液体即为所要的蛋白样品液。

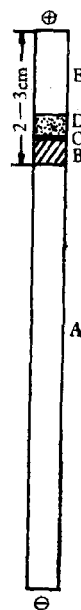


图 1 蛋白质电泳洗脱装置简图

- A. 6.2%凝胶(支持胶),
- B. 含样品凝胶片,
- C. 1.5%琼脂糖,
- D. 30%甘油缓冲液, E. 2M NaCl.

结果与讨论

Hb, Cyt.c 和铁蛋白均为色素蛋白, 因此在电泳时可直接观察到蛋白样品始终是以一条窄带从 B 层移向 D 层; 进入 D 层后立即均匀地弥散开。D、E 两层间有一明显界面, 即使 D 层中蛋白浓度很高也不会向 E 层扩散。待蛋白色带全部进入 D 层后, 收取血清样品经再次电泳, 考马斯蓝染色证实, 蛋白回收率与 Otto 报道相符达 95% 以上。

本法同时适用于圆盘电泳和等电点聚焦电

泳,但后者需时稍长。这可能与蛋白质在等电点聚焦后处于电中性有关。一般用电泳方法洗脱 4mm 厚凝胶片内的蛋白,需 1—3 小时。用本法洗脱 Hb, Cyt. c 和铁蛋白(分子量分别为 6.7 万, 1.3 万和 80 万)的时间分别为 1、2 和 2.5 小时。

在样品凝胶片上铺一薄层琼脂糖,既防止了低浓度凝胶片在 30% 甘油中漂浮,又为收集蛋白样品提供了一个完整而密封的底,以免样品液流失。3M NaCl 覆盖在 30% 甘油上后,二层间如无明显界面,则蛋白质的电泳速度将大大减慢。而且蛋白质进入 D 层后会向 E 层扩散,这可能与高电导 E 层和低电导 D 层所组成的不连续电导梯度被破坏有关。我们在洗脱三种蛋白(pI 分别为 4.6、6.79 和 10.6)时分别采用 pH8.8 和 pH10.8 两个缓冲系统,结果洗脱效果完全相同。关于平板凝胶电泳和等电点聚焦电泳后蛋白的电泳洗脱的原理及操作步骤基

本相同。

参 考 文 献

- [1] Bray, D. et al.: *Anal. Biochem.*, 55, 213, 1973.
- [2] Malcolm, A.J. et al.: *J. Immunol.*, 128, 2599, 1982.
- [3] Ahmadi, B. et al.: *Anal. Biochem.*, 97, 229, 1979.
- [4] Hanaoka, F. et al.: *Anal. Biochem.*, 99, 170, 1979.
- [5] Brown, A. S. et al.: *Anal. Biochem.*, 103, 184, 1980.
- [6] Karsnas, P. et al.: *Anal. Biochem.*, 77, 168, 1977.
- [7] Ziola, B. R. et al.: *Anal. Biochem.*, 72, 366, 1976.
- [8] Wachslight, H. et al.: *Anal. Biochem.*, 84, 533, 1978.
- [9] Otto, M. et al.: *Anal. Biochem.*, 111, 111, 1980.
- [10] Stralfors, P. et al.: *Anal. Biochem.*, 128, 7, 1983.

[本文于 1984 年 11 月 21 日收到]

一种简便适用的蛋白质水解方法

章 蓓 倪大洲 刘祖洞

(复旦大学遗传研究所, 上海)

进行蛋白质的氨基酸的组成分析时,蛋白质水解液的制备是十分重要的一步。样品水解的好坏直接影响测定结果的准确性。经典水解条件是: 6N HCl, 110°C 在封管条件下恒温水解 24 小时。在这条件下进行水解,蛋白质分子中的 Ser, Thr, Trp, Cys, Tyr, Met 仍可能因氧化、降解等反应影响回收率^[1]。为此,要求在封管时减压或充氮以提高回收率,但这又需要特殊装置^[2], 国内一般实验室不具备这样的条件。我们试用 1.5ml 聚丙烯带盖的离心管代替玻璃指管进行蛋白质水解。实验结果表明用这二种管子水解结果相同,而使用聚丙烯离心管可以免去加热封管等步骤,减少了样品的损

失,确实是一种较为简便适用的蛋白质水解方法。

材 料 与 方 法

1. 胰岛素、细胞色素 c 均为分析纯。
2. 氨基酸标准样品 17 种氨基酸和氨(Beckman 公司产), 稀释成 250nmol/ml 的各种氨基酸混合液。
3. 玻璃指管水解 胰岛素、或细胞色素 c 各 1 mg, 分别置于玻璃指管(10 × 100mm)中, 加入 6N HCl 1ml, 煤气灯上加热封口, 110°C 水解 24 小时, 尔后挥发 HCl, 用无离子水洗涤三次, 加入 pH 2.2 柠檬酸缓冲液 1ml, 从中取