

不饱和硫酸二糖的纤维素薄板层析

张春玲 张英珊

(中国医学科学院心血管病研究所生化研究室, 北京)

提 要

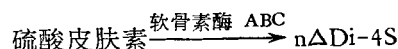
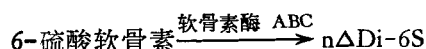
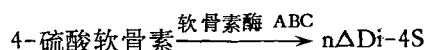
提纯的人主动脉蛋白聚糖 (PG) 经碱性氢硼化钠处理生成氨基葡聚糖 (GAG)。GAG 经软骨素酶 ABC 消化生成 Δ -4, 5 不饱和硫酸二糖, 后者以纤维素薄板层析[标准二糖为 Δ di-0S, Δ di-4S, 及 Δ di-6S; 展开剂为: 正丁醇:冰乙酸: 2M 氨水 = 2:3:1(V/V)] 可得到满意的层析谱。本法可用以鉴定 PG (或 GAG) 中硫酸基位置及有关二糖的相对含量。

蛋白聚糖(PG)是一个或多个氨基葡聚糖 (GAG) 键以共价键连接在核心蛋白上的复杂大分子。GAG 链上有带负电的硫酸根及(或)羧基, 对其中是否有硫酸根或硫酸根的位置(在 4-位或 6-位)是对 GAG 分析的重要内容之一。本室为探讨蛋白聚糖与动脉粥样硬化的发病关系, 建立了可分离不同的不饱和硫酸二糖的纤维素薄板层析法, 现简述如下。

一 原 理

提纯的 PG 样品先经碱性氢硼化钠降解为 GAG 和核心蛋白碎片后, 由重复二糖单位 [β -D-葡萄糖醛酸和 β -D-N-乙酰氨基半乳糖-4-(或-6-)硫酸酯]_n 构成的硫酸软骨素 (CS) 及 [α -L-艾杜糖醛酸和 β -D-N-乙酰氨基半乳糖-4-硫酸酯]_n 构成的硫酸皮肤素 (DS), 再经软骨素酶 ABC (Chondroitinase ABC) 消化

产生 4,5 不饱和硫酸二糖即:



由于上述 Δ Di-4S、 Δ Di-6S 在紫外光下有吸收峰(最大在 232nm), 故经层析分离后各个不饱和二糖的位置可根据紫外光(260nm)下所见层析点而检出^[1-3], 又根据不饱和硫酸二糖混合标准的层析点可确定样品中各点的种类, 另外从层析点的强弱可估计样品中不饱和硫酸二糖的相对含量。

二 试剂及材料

(1) 纤维素 (MN300, Macherey Nagel, Germany);

(2) 硅酸锌锰 K-35 (北京化工厂);

度高, 经几年来实际应用, 效果良好。

参 考 文 献

- [1] Pegg, A. E.: *Cancer Investigation*, 2(3), 223—231, 1984.
- [2] Dolan, M. E., et al.: *Cancer Research*, 45, 6413—

6417, 1985.

- [3] Karran, P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 5285—5289, 1985.

- [4] Balsiger, R. W., et al.: *J. Org. Chem.*, 25, 1573—1575, 1960.

[本文于 1986 年 6 月 29 日收到]

表 1

样 品	**Tris缓冲液 (pH8.0)	软骨素酶 ABC (1U/100 μ l)
*CS-GAG100 μ l	3 μ l	15 μ l
*DS-CS-GAG 100 μ l	3 μ l	15 μ l

* 醛酸含量为 100 μ g;

** Tris 缓冲液 (0.25M Tris, 0.3M 乙酸钠, 0.25M NaCl, 牛血清清蛋白 0.5mg/ml, pH8.0)。

(3) 正丁醇(北京化工厂, AR);

(4) 氢氧化铵 [北京化工厂, CP (25—28%)];

(5) 冰乙酸(北京化工厂, AR);

(6) 软骨素酶 ABC (Proteus vulgaris, Seikagaku, Kogyo);

(7) 本实验室分离提纯的人主动脉 CS-GAG, DS-CS-GAG 样品;

(8) Δ Di-0S, Δ Di-4S, Δ Di-6S 二糖标准 (20 μ g/ μ l, Seikagaku Kogyo);

(9) 长方层析缸 (21 $\times$ 11 $\times$ 23cm);

(10) 层析板 (4.5 $\times$ 23cm);

(11) 铺板器 (0.1cm 厚)。

三 实验步骤及结果

(一) 软骨素酶 ABC 消化 CS-GAG 及 DS-CS-GAG 样品(表 1)

保温 (37 $^{\circ}$ C, 4 小时) 后 N₂ 气吹干, 再加 40 μ l 蒸馏水溶解备层析用。

(二) 薄板层析

(1) 制板 称取 1 克纤维素, 0.1 克硅酸锌锰 K-35, 加 8ml 蒸馏水置电磁搅拌器上混匀后倾倒于干净的玻璃层析板上, 用铺板器推板(厚约 0.1cm), 铺好的板水平放置干燥后(室温)备用。

(2) 点样 准备两块纤维素薄板 (a 及 b) 两侧各距边沿 1.2cm 处 (距下端边沿 2cm), 用 10 μ l 微量注射器:

(a) 分别吸取 Δ Di-0S, Δ Di-4S, Δ Di-6S 硫酸二糖标准(各 10 μ l, $\sim$ 100 μ g) 和其混合物 (30 μ l, 各 100 μ g);

(b) 分别吸取酶消化过的 CS-GAG 或 DS-CS-GAG 样品及 Δ Di-0S, Δ Di-4S, Δ Di-

6S 混合标准(各 100 μ g) 各 15 μ l 点样。

点样时, 将微量注射器针尖轻轻接触板面分数次滴加, 每次滴加后用电吹风机冷风吹干。点样直径应小于 3mm。

(3) 展层 点样完毕将板立即置于一装有 60ml 混匀推进剂[正丁醇:冰乙酸:2M 氢氧化铵 = 2:3:1(V/V)] 的带盖长方形玻缸中, 使板与水平呈 $\pm 60^{\circ}$, 盖好密封, 展层 9 小时 (20 $^{\circ}$ C $\pm$ 4 $^{\circ}$ C), 将板取出, 室温干燥。

(三) 结果观察

将板放在紫外灯 (± 260 nm) 下观察, 背底现荧光, 在有饱和硫酸二糖处为清晰的暗点, 标准饱和和硫酸二糖的层析点位置如图 1 (见封 3)。参照混合标准品的层析点的位置可确定样品中各点的种类(图 2 见封 3)。另根据层析点的强弱可估计样品中硫酸二糖的相对含量。若样品为同位素标记的, 可将层析点刮下做放射性定量测定。

四 讨 论

(1) 温度对层析结果的影响

温度高层析速度快, 样品分离效果差, 层析点拖尾现象严重。适宜温度为 20 $^{\circ}$ C $\pm$ 4 $^{\circ}$ C。

(2) 纤维素板均一程度对层析结果的影响

开始所用的板为 20 $\times$ 20cm, 几次实验分离效果均不佳, 后发现是铺板时双手推板用力不匀, 致纤维素板不均一。后改用小板, 一手推板, 板较均一, 层析效果较满意。

(3) 硅酸锌锰 K-35 对样品层析后结果观察的影响

开始时, 制板未加硅酸锌锰 K-35, 紫外灯 (± 260 nm) 下, 背底现淡龙胆紫色, 与饱和和硫酸二糖的层析点(暗点) 差别不十分明显,

测定多肽分子量的 SDS 聚丙烯酰胺电泳

郭燕捷 陶 陵 姚志建

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京)

提 要

一般说来,十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺电泳(SDS-PAGE),分离分子量10,000以下的多肽样品效果不佳。本文介绍了一种用强电解质离子为前导离子和拖尾离子、加尿素的 SDS-PAGE 系统,可对分子量2,000—20,000范围内的蛋白质多肽样品进行分子量的测定。

对蛋白质分子量的测定,最常用的是十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)^[1,2],但是这种方法最适用的样品分子量范围是一、二万到二、三十万道尔顿。对于分子量较低的多肽则缺乏简便灵敏的分子量测定方法^[3]。随着生物活性多肽研究的进展,现在已有愈来愈多的结果表明不少分子量低于一万的多肽常具有重要的生物学作用,因此在多肽研究中很需要一种既稳定可靠又简便实用的分子量测定方法。

最近,Anderson等发展了一种分别利用两种电泳迁移率快的强电解质离子为前导离子及拖尾离子的不连续电泳系统^[4]。我们在此基础上,又着重选择了在样品分子量2,000—20,000

区域内能获得较满意分离效果电泳条件,通过二年多的实际应用,认为可做为一种多肽分子量测定的常规方法。

材 料 和 方 法

试剂

(一)分离胶缓冲液并用做下槽缓冲液的贮存液: 1M 三羟甲基氨基甲烷(Tris,浙江黄岩人民化工厂产), 0.2% 十二烷基硫酸钠(SDS,西德 Serva 公司产)的溶液,配制时用浓硫酸调 pH 至 7.8。用做下槽缓冲液时,需稀释 5 倍。

(二)上槽缓冲液: 0.074M Tris、0.1% SDS 的溶液,配制时用浓盐酸调 pH 至 7.8。

后来在制板时试加入 10% 的硅酸锌锰 K-35,层析后紫外灯($\pm 260\text{nm}$)下背底显荧光,在有饱和二糖处为清晰的暗点,从而易于观察。

(4) 纤维素板上杂质对层析结果的影响

铺好的板干燥后(在室温或 50℃ 烤 2 小时),先用展层的推进剂展层 9 小时(20℃ $\pm$ 4℃),待板上杂质(淡黄色)推向顶端时取出,彻底干透后,再点样、层析。这样,二糖的层析点可更为清晰。

此法操作简便,结果可靠,不需特殊仪器与试剂,且较滤纸层析法省时。在制板时加入 10% 硅酸锌锰 K-35 可得较清晰图谱。

参 考 文 献

- [1] Sakaru, Suzuki: *J. Biol. Chem.*, **235**, 3580—3588, 1960.
- [2] Hidehiko, Saito, et al.: *Ibid.*, **243**, 1536—1542, 1968.
- [3] Sakaru, Suzuki, et al.: *Ibid.*, **243**, 1543—1550, 1968.

【本文于 1986 年 6 月 28 日收到】

本刊刊出论文增添“提要”的通知

根据国家科委情报局的文件通知,本刊自 1987 年第 1 期起刊登论文的内容将增加“提要”一项。现将有关事项说明如下:

一、文件指出,增加论文提要是为贯彻国家标准科技期刊编排规则,是整顿、改革和提高期刊质量的一项措施,望作者大力协助。

二、除“讲座”、“研究快报”、“经验交流”及“学术动态”等栏目外,在其它各栏目内所刊出的论文均请于正文之前附一百字左右的中文提要,最多勿超过两百字。

三、提要应力求简明扼要,但又勿使其流于空泛。

《生物化学与生物物理进展》编辑部

“不饱和硫酸二糖的纤维素薄板层析”一文的图 1 及图 2

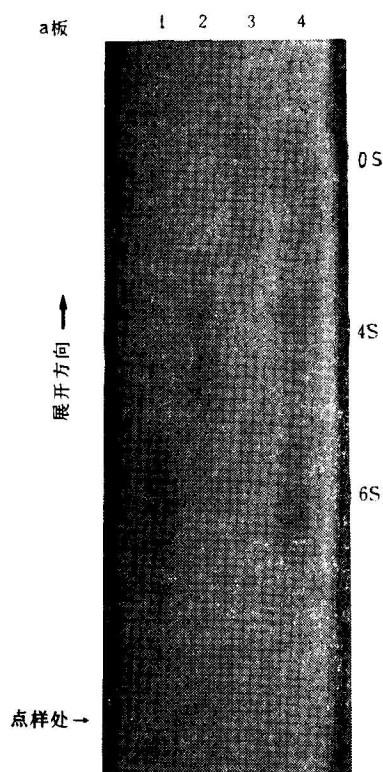


图 1 标准硫酸二糖的纤维素薄板层析谱

层析条件: 正丁醇: 冰乙酸: 2M 氨水=2:3:1,
24°C, 9小时

1. Δ di-6S 2. Δ di-4S 3. Δ di-0S
4. Δ di-6S Δ di-4S Δ di-0S

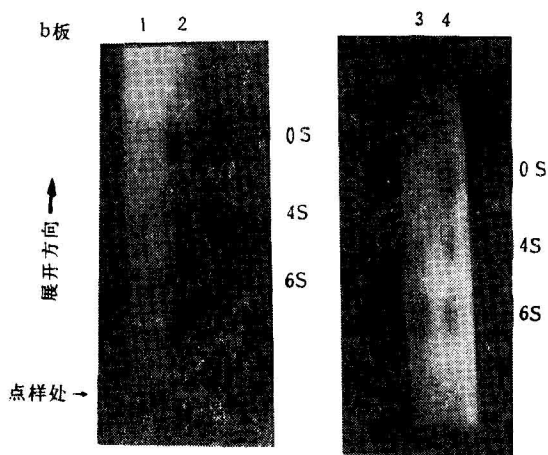


图 2 硫酸二糖的纤维素薄板层析谱

条件同图 1。

1. CS-GAG 样品经软骨素酶 ABC 处理后。
2. 硫酸二糖标准(di-6S, di-4S, di-0S)
3. DS-CS-GAG 样品经软骨素酶 ABC 处理后。
4. 同 2