

对蚕丝蛋白质分子量测定的研究，近五十年来国内外从未间断过。由于制备方法、测试手段不同，因而结果相差悬殊。现将有关报道的主要结果与本文的实验结果对比见表 3。

表 3

作者	分析方法	分子量	样品来源及制备条件
Sprague (1975年)	凝胶电泳法	2.0—22 万	中部绢丝腺前区提取的丝胶
Gamo et al. (1977年)	凝胶电泳法	8.1万	中部绢丝 S-4
		30.9万	S-1
		14.5万	腺后区分 S-3
		17.7万	
		13.4万	泌出的 S-2 S-5
本文 (1981年)	凝胶层析法	1.4万 2.5万 8.0万 31.0万	中部绢丝腺液状绢蛋白质水溶液

从上述数据可见，本文测得的分子量与文献记载的数值在范围上大体接近，有部分结果基本一致。

三、讨 论

1. 以硅胶层析法测定蚕丝蛋白质的分子量，通过相关系数 r 的计算，表明了蛋白质分子量与淋出体积之间的线性关系。从理论上证实了这种测定的可能性。

2. 通过实际测定蚕丝蛋白质的分子量，并与有关文献报道的数据进行比较，表明实验结果大体上比较接近。从实验的角度证实了采用硅胶层析法测定蛋白质分子量是完全可能的

3. 我们曾将层析法与电泳法进行对比试验，发现硅胶层析法峰的容量小，不能分离具有相同或非常相近分子量的分子。这是硅胶层析法的缺点。然而，这些缺点随着高效填料的出现将逐渐得到一定程度的弥补。

4. 用多孔硅胶的凝胶层析法在 SN-01A 型凝胶色谱仪上测定蛋白质的分子量，与经典的层析法（以 Sephadex 为凝胶）比较，测定时间短，分析一个样品，一般只需 3—4 小时，仪器操作简便，层析柱维护方便，是一个有前途的方法。

参 考 文 献

[1] 鲁子贤：《生物化学与生物物理进展》，1974 年，第一期。
[2] 施良和：《凝胶色谱法》，科学出版社，1980 年。
[3] 袁静明：《凝胶层析法及其应用》，科学出版社，1975 年。
[4] Takuma Gamio Inokuchi, et al.: Insect Biochem., 7, 285, 1977。

[本文于 1982 年 2 月 11 日收到]

本工作曾得到中国科学院上海生物化学研究所鲁子贤先生指导，特此致谢。

核酸序列分析中应用的超薄凝胶技术

方 荣 祥

(中国科学院微生物研究所)

在核酸序列分析中已普遍使用厚度为 0.4mm 左右的聚丙烯酰胺凝胶^[1]。与早先使用的厚度 1—2mm 的凝胶相比，这种薄胶技术具有分辨率高、带谱平整、电泳速度快等优点。

为进一步提高放射自显影图上核酸带谱的分辨率，目前正在推广使用超薄胶^[2]。这种超

薄胶技术的要点是：(1)凝胶厚度为 0.2mm，经干燥后厚度约为 0.02mm；(2)电泳时保持凝胶各部分温度均匀；(3)电泳后凝胶经过固定、烘干后再进行放射自显影。

下面介绍超薄胶技术的操作方法。

1. 玻璃板处理 构成凝胶模子的二块玻璃

板,面向凝胶的一面分别作如下的处理:一块不带缺口的玻璃板用二甲基二氯硅烷(2%四氯化碳溶液)进行常规的硅化处理;另一块带缺口的玻璃板用 Silane GF-31 (γ -methacryloxypropyltrimethoxy-Silane, 西德 WACKER CHEMIE 公司产品)处理,方法如下:

溶液 A: 在 160ml 95% 乙醇中加入 300 μ l Silane GF-31。

溶液 B: 10% 乙酸水溶液。

临用前将 10ml 溶液 A 和 300 μ l 溶液 B 混合,用滤纸涂于玻璃板上,室温下 2—3 分钟后即干燥,用 95% 乙醇涂洗一次后空气干燥待用。在铸胶后聚合的凝胶与处理过的玻璃板因共价键粘结。

2. 铸胶方法 有拉法、推法二种。

(1) 拉法 在硅化玻璃板的二边铺上厚 0.2mm 宽 1.5cm 的聚四氟乙烯条作凝胶厚度的间隔物,在二条间隔物中间铺上一块同样厚度的聚四氟乙烯布,其宽度略小于二条间隔物之间的距离。

复上一块 Silane 处理过的玻璃板,用胶纸将二块玻璃板固定。将这个凝胶模子稍微倾斜地搁置(与水平面成 10° 左右)(图1)。

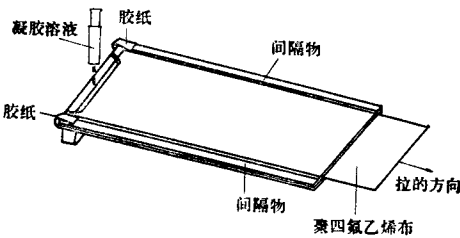


图 1 拉法铸胶

将配置好的凝胶溶液(50mM Tris-硼酸 pH8.3, 1mM EDTA, 7M 尿素, 一定浓度的丙烯酰胺/双丙烯酰胺, 适量的过硫酸铵和 TEMED)装在一个大注射器里。要制备 20 × 40cm 的凝胶,用 30ml 凝胶溶液足够。凝胶溶液通过注射器滴加在玻璃板缺口的上沿,随着中间那块聚四氟乙烯布往后拉,凝胶溶液即被引入二块玻璃板之间(见图1)。待聚四氟乙烯布全部被拉出后,将玻璃板放平,插入样品槽模子(也用同

样厚度的聚四氟乙烯做成),在玻璃板两侧夹上夹子,保持凝胶厚度为 0.2mm。凝胶在室温下较快地聚合,使样品槽较好地成形。

(2) 推法: 如拉法一样在硅化玻璃板二边铺上厚 0.2mm 宽 1.5cm 的聚四氟乙烯间隔物,搁置在一个水平台上,在这块玻璃板右端紧接着放上一块同样厚度的普通玻璃板,也铺上厚 0.2mm 的间隔物,这二块玻璃板构成一个铸胶平面。将 Silane 处理过的玻璃板放在那块普通玻璃板之上(图2)。

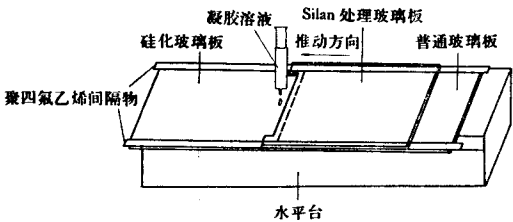


图 2 推法铸胶

将凝胶溶液装在一个大注射器里,边滴加凝胶溶液边向前推动 Silane 处理过的玻璃板,待二块玻璃板重合后,凝胶溶液即被灌入二块玻璃板之间。与拉法一样插入样品槽模子,夹上夹子,凝胶在室温下聚合。

3. 电泳 在电泳过程中,为保持凝胶具有一定的温度,使 DNA 保持变性状态,更主要的是使凝胶各部分温度均匀,使核酸带谱平整,减少所谓微笑(smiling)现象(带谱弯曲如笑时的嘴形),在超薄胶技术中常在凝胶玻璃板前再加上一层水,让水作为介质来分散电泳过程中产生的热。如有条件,可用超级恒温水浴来带动循环温水(60—70℃);方便的做法是在不带缺口的玻璃板前再加上一块普通玻璃板,用橡皮管封住左、右、下三边,在隔层中加入水,也可达到分散热量的效果(图3)。

由于凝胶极薄,所以加样用的毛细管要求极细,且有一定机械强度。对于宽 5mm 的样品槽,样品体积以 0.5—1 μ l 为宜。

超薄凝胶由于电阻大,所以电泳时即使加上较高电压也不致发热过多,大大缩短了电泳时间,也减少了长时间电泳引起的带的扩散。

一般预电泳, 2000V、30 分钟即可完成。对于长 40cm 的 6% 的凝胶, 3000V 时溴酚蓝 40 分钟可泳动到胶底, 2000V 时二甲苯蓝 FF, 3 小时可泳动到胶底。

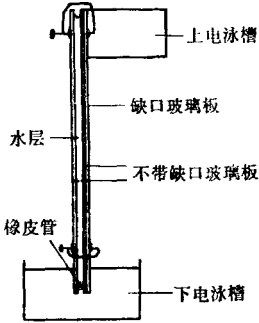


图 3 附有散热水层的电泳装置

4. 放射自显影 电泳结束后用刮脸刀片分开玻璃板, 凝胶与 Silane 处理过的带缺口的玻璃板联在一起。将凝胶在 10% 乙酸中浸泡 15 分钟以上, 除去凝胶中的尿素并固定核酸带。凝胶表面用水洗一下, 滤纸吸干后, 置于 80℃ 烘箱中 1 小时烘干。复上 X 光底片后即可在室温下曝光。

5. 凝胶的除去 放射自显影后将联有凝胶的玻璃板放在 10% 的 Deconex (瑞士 Borer Chemie AG 公司出品的去污剂) 中浸泡过夜即可将凝胶从玻璃板上除去。KOH 溶液也可将凝胶除去。

综上所述, 超薄凝胶由于极大地减低了 β 粒子在凝胶中的散射和自吸收, 短时间的电泳和电泳后的固定又减少了核酸带在凝胶中的扩散, 所以大大提高了核酸带的分辨率。电泳时凝胶上所附的散热水层也使放射自显影带谱平整, 这也增加了一块凝胶中可读出的核酸序列的碱基数。此外缩短了电泳时间和曝光时间, 可在室温中曝光, 都是超薄胶技术不可忽视的优点。其缺点是做胶时比较困难, 加样时因毛细管极细, 样品中的细微沉淀易堵塞毛细管, 样品体积小, 所以要求样品放射性计数较高。

参 考 文 献

- [1] Sanger, F., et al.: *FEBS Letter*, **87**, 107, 1978.
- [2] Garoff, H., et al.: *Anal. Biochem.*, **115**, 450, 1981.

[本文于 1982 年 5 月 17 日收到]

胃 泌 素 的 提 取 和 纯 化

王 培 之 王 贤 舜

(中国科学技术大学)

胡相钊 邹长康 张树中 盛海琳 张博林

(中国人民解放军 104 医院)

倪元东 尚文学 徐占民

(安徽省阜阳生化制药厂)

早在 1905 年, Edkins 从猫的胃窦部粘膜中, 提取胃泌素的粗制品, 发现它具有很强的刺激胃酸和胃蛋白酶分泌的作用。直到 1964 年 Gregory 和 Tracy 才从猪胃窦粘膜中提取到纯的胃泌素, 并确定它是由 17 个氨基酸组成的多肽。1968 年 McGuigan 首先用放射免疫的方

法, 测定了血清胃泌素的含量, 从而使胃泌素的研究取得了更大的进展。1979 年 Barbara E. Noyes 等测定胃泌素的 mRNA, 并且通过检测胃泌素的基因, 弄清了胃泌素原及其前体的大小, 确证所谓大大胃泌素、大胃泌素、胃泌素和小胃泌素之间的关系。近几年来, 还发现脑中