

用银染色显示的 rHuIFN- α D 垂直板聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳测定法*

张 向 明

(中国药品生物制品检定所,北京)

提 要

本文报道了用聚丙烯酰胺垂直凝胶板进行蛋白质等电聚焦的方法,用改进的银染法使测定灵敏度达到 ng 水平。通过分析蛋白质等电聚焦的影响因素,建立了稳定的电泳条件,并用该方法发现了重组人 α D 型干扰素 (rHu IFN- α D) 基因表达产物的带电荷不均匀性。

等电点聚焦 (IEF) 具有非常高的分辨率,是测定蛋白质等电点 (pI) 的重要手段,是分析蛋白质纯度和组成不可缺少的参数,尤其对蛋白质中某些氨基酸变化非常敏感。用银染法显示蛋白 IEF 的结果,可使检测灵敏度比考马斯

亮蓝染色提高几十至上百倍。本文用普通凝胶电泳的垂直板电泳槽进行等电聚焦,并用改进的银染色法显示结果。测定了基因工程技术生

* 本文为国家七·五科技攻关项目“人基因工程干扰素”协作组的工作。

而当电压在 260V 时,这些 DNA 是可以分开的。推测这是由于一定分子量的 DNA 在不同电压下挤压过筛孔所需的时间是不同的,受到的阻力也不同。

酵母染色体 DNA 经交变脉冲电场凝胶电泳分开并用非啉溴红染色,除明显的荧光条带外,还有一些较弱的条带。不难设想,这是由于酵母染色体的多形态性引起的,即在一酵母群体中存在若干不同大小的同源染色体。由此可见,交变脉冲电场凝胶电泳可以方便地进行细胞核型分析,这称为电泳核型分析 (electrophoretic karyotype)。

交变脉冲电场凝胶电泳问世还不久,尚不十分成熟,在原理上也未完全搞清楚。它的潜力很大,原则上凡线性的大分子电解质均可采用此技术进行分析分离。对这一技术我们正在作进一步的研究。

交变电场电泳仪由张正本同志设计安装,孙相超同志参与电泳槽的安装,于永彬和郝福英同志帮助冲洗相片,我们在此向他们表示感谢。

参 考 文 献

- [1] Schwartz, D. C. et al.: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1983, 47, 189.
- [2] Carle, G. F. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 1984, 12, 5647.
- [3] Schwartz, D. C. et al.: *Cell*, 1984, 37, 67.
- [4] Van der Ploeg, L. H. T. et al.: *Cell*, 1984, 37, 77.
- [5] Carle, G. F. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, 82, 3756.
- [6] Van der Ploeg, L. H. T. et al.: *Science*, 1985, 229, 658.
- [7] Kemp, D. J. et al.: *Nature (London)*, 1985, 315, 347.
- [8] Carle, G. F. et al.: *Science*, 1986, 232, 65.
- [9] Bernards, A. et al.: *Gene*, 1986, 42, 313.

[本文于 1987 年 5 月 26 日收到]

产的人 α D 型干扰素的 pI 值。现将方法及结果报道如下。

材 料 和 方 法

一、试剂和样品 两性电解质为LKB公司产品。牛血清白蛋白(BSA), 卵清白蛋白(OV), 肌红蛋白(MYO)为 Boehringer Mannheim 公司产品, 转铁蛋白(T)为 Sigma 公司产品。rHu IFN- α D-McAb 由上海生物制品研究所用单克隆抗体亲和层析纯化。rHu IFN- α D-CM 由长春生物制品研究所用 CM₂₃ 柱纯化。这两种基因工程干扰素生产菌都是由中国预防医学科学院病毒学研究所组建的。垂直夹心式电泳槽为六一仪器厂产品。

二、IEF 法 在电泳槽的两块玻璃板之间(13 × 9 × 0.1 cm)加入 3 ml 60% 甘油, 再在上方缓缓加入 10 ml 胶液(5% 丙烯酰胺, 0.13% 双丙烯酰胺, 10% 甘油, 5% 两性电解质, 20 μ l TEMED, 40 μ l 10% 过硫酸铵)。胶聚合后, 拔去梳子, 每孔加 20 μ l 加样液(12% 甘油, 5% 两性电解质, 0.01% 甲基红)。上下槽分别加 0.01 M 乙二胺和 0.01 M 磷酸, 进行预电泳, 200V 恒压 20 分钟。吸出上槽液, 用双蒸水洗加样孔二遍, 加入电泳样品, 其中含有加样液成份。加入电极液后, 电压从 200V 起, 每半小时升高 100 V, 直至 500V, 再恒压 3—4 小时。

三、银染色 按 Butcher^[1] 的方法进行。但其中 50% 甲醇, 10% 乙酸的步骤省略, 5% 甲醇步骤后的水洗时间由过夜改成 2 小时。染色胶的保存方法以前已有介绍^[2]。

四、pI 值的测定 将平行电泳的空白胶切下, 每 1.0 cm 切一段, 加适量脱气无离子水, 于室温过夜。次日测定每段胶的 pH 值, 并以胶长为横座标, 每段胶的 pH 值为纵座标绘制 pH 曲线。按下列公式求出蛋白在染色前的迁移距离, 在 pH 曲线上得出相应的 pI 值。

$$\text{蛋白染色前迁移距离} = \text{染色前胶长} \\ \times \frac{\text{染色后蛋白迁移距离}}{\text{染色后胶长}}$$

结 果 和 讨 论

一、影响蛋白聚焦的主要因素 在平板凝胶上蛋白区带常常随 pH 分布的不均匀而扭曲。

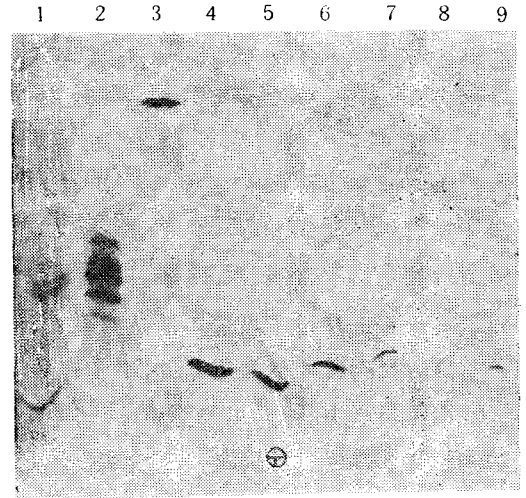


图 1 T5%, C2.6%, pH3.5—10IEF 银染图谱
1. rHu IFN- α D-McAb(2 μ g); 2. T (0.5 μ g); 3. MYO (0.5 μ g); 4—9. BSA, 0.5—0.0156 μ g 倍比稀释



图 2 T5%, C2.6%, pH3.5—10IEF 银染图谱
1. rHu IFN- α D-McAb (2 μ g); 2. BSA (0.5 μ g); 3. T(0.5 μ g); 4. MYO(0.5 μ g); 5. rHu IFN- α D-CM(2 μ g); 6. OV(0.5 μ g); 7. DEAE 柱纯化单克隆抗体 1gG

这是由于凝胶的长短不一致所造成,当加样梳子厚于两块电泳玻璃板的间隔,聚胶后拔出梳子,加样孔的胶面受挤压成弯月状,电泳后会出现图1中 pH3—5 范围的蛋白区带弯曲。当胶的前沿不一致时,蛋白迁移也随之起伏(见图2)。为了克服凝胶前沿不一致的问题,本文用60%甘油作为前沿的隔离层,达到了满意的结果(见图3)。影响蛋白区带弯曲的另一情况是样品中的盐浓度,当样品中盐浓度高于0.05M时,应进行透析。

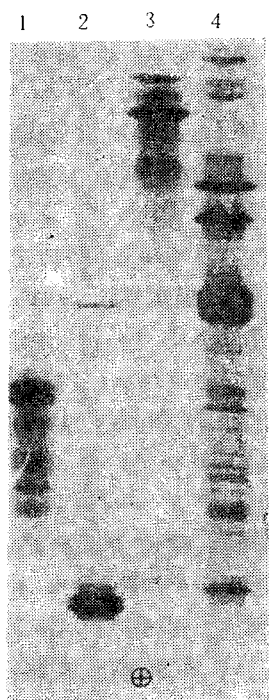


图3 T5%, C2.6%, pH3.5—8IEF 银染图谱

1. rHu IFN- α D-McAb (5 μ g); 2. OV(0.5 μ g);
3. MYO(0.5 μ g); 4. rHu IFN- α D-CM(2 μ g)

二、银染 IEF 胶检测蛋白的灵敏度 用改进的银染法可以检出 2 ng/mm² 的牛血清白蛋白(图1),比考马斯亮蓝的检测灵敏度高出百倍。

三、蛋白质 pI 值的测定 图3为改进后的 IEF 银染结果,其 pH 梯度分布是一致的。根据 pH 曲线和公式求出各蛋白的 pI 值。用单克隆抗体纯化的 rHu IFN- α D-McAb 有 8 条主要区带, pI 值分别为 5.6、5.5、5.38、5.3、5.17、5.05、4.95 和 4.85。用双向电泳证明这些区带的分子量都与干扰素的分子量一致(结果未列出)。说明 IEF 可分辨出蛋白分子的微小改变。图3中 OV 和 MYO 的 pI 值分别为 4.65 至 4.75 和 7.2,与文献报道的值相符。

从上述结果可以看出改进后的垂直板 IEF 蛋白区带迁移整齐,与测 pH 的空白胶有可比性,这不但是由于改进了聚胶前沿,还由于凝胶夹在玻璃中不会变形。水平板 IEF 常常因凝胶暴露,承受不住电泳引起的局部发热而造成变形,这在我们做水平板 IEF 时经常看到。此外,垂直板凝胶的载样品体积较大,用银染法显示 IEF 结果因其灵敏,而大大减少了蛋白加量,从而避免了蛋白浓度大引起的 pH 梯度分布的扰乱。由于银染 IEF 的灵敏度高,才有可能观察到纯化 rHu IFN- α D 的多 pI 值的分子形式,这用考马斯亮蓝染色显示是非常困难的。

参 考 文 献

- [1] Butcher, L. A. : *Anal. Biochem.*, **148**, 384, 1985.
- [2] 张向明:《中华微生物学和免疫学杂志》, **4**, 347, 1984.

[本文于 1987 年 1 月 5 日收到]