

蛋白质电泳谱的同位素标记与分析

贺新军

(中国医学科学院协和医院, 北京)

把放射性同位素应用于蛋白质电泳, 不仅可提高分析灵敏度和准确性, 还便于方法实现自动化。高分辨双向电泳技术问世以后, 一块凝胶板上可显示上千个蛋白质斑点^[1], 但此种图谱分析十分困难。采用高灵敏度同位素检测技术可以解决这一问题。本文拟简述常用的蛋白质电泳谱同位素标记与分析技术。

一、蛋白质电泳谱的标记

用于蛋白质电泳谱标记的放射性同位素, 主要有 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 和 ^{125}I , 它们的基本物理性质见表 1。蛋白质大多在电泳前先标记, 也可在电泳后进行。标记方法分化学和生物合成两大类。

表 1 常用放射性同位素的基本物理性质

同位素	半衰期	比放射性	β^- 最大能量(Kev)	γ 能量(Kev)
^3H	12.3 年	29Ci/mmole	18.6	—
^{14}C	5730 年	62.4mCi/mmole	156	—
^{32}P	14.3 天	9000Ci/mmole	1708	—
^{35}S	87.4 天	1500Ci/mmole	167	—
^{125}I	60 天	2000Ci/mmole	~6	35

(一) 化学标记法

1. ^{125}I

(1) 氯胺 T 碘化法 放射性碘可参入到蛋白质酪氨酸残基上, 形成单碘或二碘酪氨酸。 Na^{125}I 的碘是负离子 (I^-), 只有正碘离子 (I^+) 才能取代酪氨酸苯环上的质子。因此, 反应需加催化剂。氯胺 T (学名氯胺赶对甲苯磺酸钠) 就是一种催化剂, 它可从负碘离子上移去一对电子, 使之转变成正离子 ($\text{I}^- \rightarrow \text{I}^+$)。碘化反应几乎在瞬间完成。标记的蛋白质用凝胶过滤等方法提纯。把氯胺 T 分子联接在聚苯乙烯小球上可制备成固相氯胺 T, 商品名为 IodoBeads。将这些小球与反应成分混合就可碘化蛋白质。倒出反应液, 反应即停止^[2]。

氯胺 T 碘化法的优点是简单、快速。但强放射性 Na^{125}I 和强氧化剂氯胺 T 可使蛋白质变

性。

(2) 酶促碘化法 过氧化酶与过氧化氢形成络合物后可氧化碘。双酶偶联就是通过葡萄糖氧化酶产生 H_2O_2 供过氧化物酶利用, 可避免蛋白质同 H_2O_2 接触。蛋白质不接触强氧化剂是此法的优点。但酶是蛋白质, 自身也可被碘化; 用固相酶技术可避免此问题^[3]。

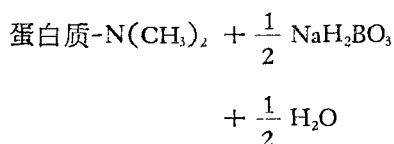
(3) 联接碘化法 是近几年最常用的蛋白质碘化法。通过末端氨基与碘化试剂形成肽键而完成蛋白质的标记。碘化试剂有: 碘苯胺, 甲基-对-羟基苯亚胺酯, 碘化对氨基苯磺酸, 二磺荧光素和 Bolton-Hunter 试剂 (学名: 3-(4-羟基苯)-丙酸琥珀酰亚胺酯)。Bolton-Hunter 试剂用得最为广泛, 它是 N-羟基丁二酰和碘化对羟基苯丙酸形成的酯^[4], 可在实验室从 N-琥珀酰 3-(4-羟基苯基)-丙酸盐合成。须注意, Bolton-

Hunter 试剂在水中很容易分解, 形成 N-羟基丁二酰; 在 pH8.5, 其半减期只有 9 分钟。

联接碘化法简单, 不损害蛋白质的生物活性。有人比较几种碘化法对钙调节蛋白生物学活性的影响, 发现氯胺 T 法使之完全失活, 酶促法显著减弱其活性, Bolton-Hunter 试剂联接法对其活性毫无影响^[5]。

2. ^3H 或 ^{14}C

蛋白质的赖氨酸(和末端)氨基可与甲醛和硼氢化物发生还原甲基化反应:



用 ^3H 或 ^{14}C -甲醛或 ^3H -硼氢化物可标记蛋白质^[6]。按每个氨基加上两个甲基计算, 用 ^{14}C 甲醛可得比放射性为 $5 \times 10^6 \text{dpm/mg}$ 的标记蛋白质, 相当于最大理论值的 20%。用 ^3H -硼氢化物标记蛋白质, 其比放射性可达 $3.5 \times 10^8 \text{dpm/mg}$ 蛋白质, 比氯胺 T 或酶促碘化法高。

硼氢化钠在水溶液中易分解, 这种分解在硷性 pH 下较慢; 在室温 pH9 时, 其半减期也只有 10 分钟; 在 pH8 则仅 1 分钟左右。氰基硼氢化钠在水溶液中稳定, 用它代替硼氢化钠, 反应可在 pH7 条件下进行, 这有利于某些不稳定蛋白质的标记。

蛋白质的多种残基, 如半胱氨酸、组氨酸、蛋氨酸和赖氨酸的侧链上, 很容易引入羧甲基。α-卤酸盐, 如碘乙酸钠或溴乙酸钠是常用烷化试剂。利用 ^3H 或 ^{14}C 烷化试剂就可标记蛋白质。

溶剂中的 ^3H 可与肽键上和一级胺上的 ^1H 交换。利用这个反应可将 ^3H 标记在蛋白质上。交换法简便, 反应条件温和, 不损伤蛋白质活性。但因交换反应是可逆的, 标记原子可迅速回到溶液中(比如 2 小时内可减少到 25%), 因此, 只适于立即走电泳样品的标记。

化学标记法中, 最有效、方便且安全的方法

是 Bolto-Hunter 试剂联接碘化法。若需长寿命 ^{14}C 或 ^3H 标记蛋白质, 则宜选用还原甲基化标记法。上述方法均在样品标记后再走电泳。文献中也有相反的报道。电泳后碘化^[7]和放射性染料标记^[8]是两种值得推荐的方法。

(二) 生物合成标记法

化学标记法是标记已合成的蛋白质; 生物合成标记则是在蛋白质合成的同时引入标记原子。此法又分体内、体外标记两种。

1. 体内标记

给机体一合适的放射性前身(主要为氨基酸), 通过体内蛋白质生物合成将标记原子引入。前身给予方式有口服、腹腔、皮下、肌肉或静脉注射。常用的同位素包括 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 。前身多采用亮氨酸和赖氨酸, 因它们在多数蛋白质中含量较高, 并且在代谢过程中不会转变成其他氨基酸。蛋氨酸在蛋白质中含量不高, 但因为它可用 ^{35}S 标记, 比放射性较 ^3H 标记氨基酸高且比较便宜, 故也常用于生物合成标记。标记前身的引入量和时程, 随使用的动物、标记前身的放射性强度、代谢通路及问题的性质而定。实验者可根据经验或通过预实验确定方案。

体内标记法的特点是标记蛋白质的性质不会有任何改变, 能同时标记多个器官或多种组织的蛋白质。在研究整体代谢方面, 体内标记是不可缺少的。但它的应用有其局限性, 这是因为 1) 前身通过代谢通路参入蛋白质。由于代谢库的稀释作用, 供细胞合成蛋白质所用的标记前身的比放射性降低, 并且难以测定; 代谢库本身也随代谢速率而变, 难以估计。2) 放射性物质用量大, 既造成浪费又易造成污染。

2. 体外标记

借助细胞培养技术, 利用标记前身研究蛋白质代谢是极有价值的方法。把标记物前身加进培养液中, 细胞通过生物合成完成标记。标记前身多用氨基酸, 因它很容易穿过细胞膜, 若无特殊考虑, 应优先选用, 尤其是 ^{35}S 标记蛋氨酸。也可使用两种标记的氨基酸, 例如有人用 ^{35}S 和 ^3H 标记蛋氨酸标记蛋白质, 经双向电泳分离, 一次实验可测定近 60 种蛋白质的半减

期^[9]。

与体内标记相比,体外标记的最大优点是可以精确控制保温环境,这对激素、药物、毒物等对蛋白质代谢影响的研究是很有用的。

二、标记蛋白质电泳谱的分析

标记蛋白质电泳谱的分析,大致可分为放射性计数和放射照相二法。前者指用放射性探测器直接定量测定凝胶中的放射性强度;放射照相乃通过射线或间接通过光子的作用使胶片感光成象,然后用显微密度计定量测定。

(一) 放射性计数法

1. 分段计数

常用的方法是电泳后将凝胶切成小片,分段计数。此法须注意两个问题,一,不要等厚度随机切片,应先染色,选择性切下斑块,以免造成两个宽度相当、强度相等的峰的计数率很不相同。二,因凝胶切片有一定厚度,样品包埋其中,闪烁体渗入能力有限,因而有相当部分的放射性不能回收,使凝胶完全溶解,把样品从凝胶中洗脱出来,或将闪烁体掺合到凝胶中去,可以解决分段计数放射性回收问题。

聚丙烯酰胺凝胶可溶于 30% H_2O_2 , 每片凝胶(厚 0.5—1mm)加 1ml 30% H_2O_2 , 60℃保温至完全溶解,再加合适的闪烁液计数。如果先加 0.2ml 60% 过氯酸,再加 0.4ml 30% H_2O_2 , 则凝胶更易溶解。琼脂糖凝胶在 1N HCl, 90℃下很易溶解。

凝胶在含 6M 尿素的 1% SDS 溶液中, 37℃保温 40 小时,蛋白质可被洗脱出来。其缺点是洗脱不完全,且不确定,放射性稀释也无法避免。

闪烁体可掺合到凝胶中(方法见下文)。掺有闪烁体的凝胶片直接放在计数杯中,无需加闪烁液即可计数。

2. 整胶扫描

薄层层析和纸电泳后,分离图谱上放射性计数曾广泛采用钟罩或计数管扫描,但后来为高灵敏度液体闪烁计数技术取代。现在,通过改良扫描装置,提高钟罩流气式计数器的灵敏

度,放射性扫描的灵敏度已与液体闪烁计数法相当,足以对聚丙烯酰胺胶板进行定量探测。

西德 Berthold 公司生产的线性分析器,可通过钟罩式计数管的移动(移动速度取决于放射性强度)逐行扫描整块凝胶^[10]。它不仅以象普通流气式计数管那样记录放射性脉冲,还可以定出脉冲发射点在阳极丝上的位置。后者是通过比较电脉冲在阳极丝上的出现和到达末端的传播时间完成的。每行同时处于线性分析器计数管的开放式入射窗(约 $25 \times 1.5\text{cm}$)下,记录脉冲的阳极丝与入射窗长轴平行。同时记录位于该行上所有放射性的位置。这种线性分析器 20 分钟内可记录只有 250dpm ^3H 或 50dpm ^{14}C 的放射性斑点。此扫描仪配有专有计算机,可输入整块凝胶的测量程序(扫描行距等),并能做数据处理,包括对各行的比较。这种扫描装置具有操作简便,自动化,灵敏度高,分辨力好的优点。

(二) 放射照相法

1. 直接放射自显影

电泳凝胶板与感光胶片(X 线胶片)直接接触,凝胶中的放射性标记蛋白质发生的射线使胶片溴化银活化成银原子。直接放射自显影适用于检测发射高能 β 粒子或 X 射线的同位素,例如 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{32}P 和 ^{125}I ,而且只有当样品中的放射性强度足以形成有效潜影时,才能采用(表 2)。高能 β 粒子的放射自显影可以直接在凝胶上进行,若为 ^{14}C 则宜先将凝胶干燥,以减少自吸收。凝胶厚度不要超过 0.4mm,否则底层的 β 粒子不能到达 X 线胶片。 ^{32}P 曝光数小时即可, ^{14}C 须几天或几周。短时间曝光可在室温下进行,长时间曝光则应在 -70℃ 完成,以减少样品扩散。干燥凝胶勿须低温曝光。

直接放射自显影的灵敏度较高,曝光 24 小时能检测到 6000dpm 的 ^{14}C 或 ^{35}S , 575dpm 的 ^{32}P , 1600dpm 的 ^{125}I 斑点(表 3)^[11]。

2. 间接放射自显影

^{32}P 和 ^{125}I 发射的高能 β 粒子和 X 射线,不仅可直接使 X 线胶片感光,也能穿过胶片。若在胶片背面放置增感屏,这些穿透胶片的射线

表 2 标记蛋白质凝胶电泳放射照相方法的选择

同位素	放射性强度*	直接放射自显影	间接放射自显影	荧光照相
^3H		—	—	必须
^{14}C	低 (400dpm) 高	— 可用	— 无价值	最佳 最好但非必须
^{32}P	低 (50dpm) 高	— 可用	最佳 最佳	— —
^{35}S	低 (400dpm) 高	— 可用	— 没价值	最佳 最好但非必须
^{125}I	低 (100dpm) 高	— 可用	可用 最佳	最好但非必须 —

* 指曝光 24 小时每 cm^2 区域内的 dpm

表 3 凝胶电泳放射照相法的相对灵敏度和最低检测量

同位素	直接放射自显影	间接放射自显影	荧光照相
^3H	—	—	$> *1000(8000^+)$
^{14}C	1(6000)	—	15(400)
^{32}P	1(575)	10.5(50)	—
^{35}S	1(6000)	—	15(400)
^{125}I	1(1600)	16(100)	?

* 以直接自显影为 1 的相对灵敏度

† 曝光 24 小时每 cm^2 所需的最低放射性强度 (dpm)

在荧光屏上可产生光子,光子也能使胶片感光,于是使原来的信号增强,此即所谓间接放射自显影。为达到最佳效果,胶片需预闪并且在 -70°C 曝光^[11]。

胶片预闪指在曝光前使胶片预曝光。预闪可以普通电子闪光灯作光源,曝光距离为 70—100cm,曝光时间须小于 1ms。预闪胶片不宜保存,应临用前预闪。将预闪胶片的雾化面(预闪时对着光源的那一面)贴着增感屏,干燥凝胶放在胶片另一侧,使成为凝胶:胶片:增感屏“三合板”。也可用两块增感屏,即增感屏:凝胶:胶片:增感屏“四合板”。外面加玻板后捆扎,或用 X 线胶片匡夹起来,在 -70°C 曝光。

由于 β 粒子或 γ 射线的轨迹并不总是与凝胶垂直,而且 X 线胶片位于增感屏与凝胶之间,增感屏的使用可减低影象分辨能力,不过问题

并不严重。从表 3 可以看出,间接放射自显影的灵敏度比直接放射自显影有明显提高。

3. 荧光照相

从表 2 可知,放射自显影不能用于 ^3H 和低水平 ^{14}C 、 ^{35}S 的分析。为解决此问题,1974 年 Bonner 和 Laskey^[12] 创造了荧光照相术。把荧光体引入凝胶,使与标记蛋白质直接接触, β 粒子通过与邻近的荧光体相互作用将能量转变为光能,而使胶片感光成象。基本步骤为:电泳 $\rightarrow$ 固定 $\rightarrow$ 掺入荧光体 $\rightarrow$ 干燥 $\rightarrow$ 曝光。

现今可选用的荧光体有: PPO、水杨酸钠、EN³HANCETM 和 ENLIGHTNINGTM (后两种是 New England Nuclear 产品) 四种。其中以二甲基亚砜为溶剂,以 PPO 为荧光体的配方分辨力最好,其他三种都有使放射性影象变宽的缺点。但掺入 PPO 需较长时间(约 5 小时),且属致癌剂。二甲基亚砜又可迅速由皮肤吸收,操作时须极小心^[12]。可用冰乙酸代替二甲基亚砜^[13]。掺入水杨酸钠的灵敏度与 PPO 相当,但分辨力较差^[14]。其优点是操作时间较短(1 小时),比较安全,且价格便宜。后两种荧光体比较贵,但灵敏度较高且无毒性,尤其是最后一种新产品,其制备仅需 15—30 分钟。

象间接放射自显影一样,荧光照相欲取得最佳效果,须用预闪胶片,在 -70°C 曝光。荧光

照相法的适用范围和检测灵敏度见表2和表3。

上述三种放射照相技术,最后都是获得一张分布着浓淡不一斑点的胶片。这胶片的定量分析可在扫描显微密度计上完成^[5]。

高灵敏度放射性同位素检测技术与高分辨力蛋白质电泳分离技术的结合,为蛋白质的研究及其生物学应用提供了犀利武器,使人们有可能彻底弄清组成人体的全部蛋白质,对分子解剖学、分子病理学和分子诊断与治疗学研究会有极大的促进作用。

参 考 文 献

- [1] O'Farrell, P. H.: *J. Biol. Chem.*, **250**, 4007, 1975.
- [2] Markwell, M. A. K.: *Anal. Biochem.*, **125**, 427, 1982.
- [3] Parsons, R. G. and Kowal, R.: *Anal. Biochem.*, **95**, 568, 1979.
- [4] Bolton, A. E. and Hunter, W. M.: *Biochem. J.*, **133**, 529, 1973.
- [5] Chafouleas, J. G. et al.: *J. Biol. Chem.*, **254**, 10262, 1979.
- [6] Finger, J. M. and Choo, K. H.: *Biochem. J.*, **193**, 371, 1981.
- [7] Christopher, A. R. et al.: *Anal. Biochem.*, **85**, 404, 1978.
- [8] Zapolski, E. J. et al.: *Anal. Biochem.*, **123**, 325, 1982.
- [9] Brinster, R. L. et al.: *J. Biol. Chem.*, **254**, 1927, 1979.
- [10] Kruppa, J.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **113**, 703, 1983.
- [11] Laskey, R. A.: *Methods Enzymol.*, **65**, 363, 1980.
- [12] Bonner, W. M. and Laskey, R. A.: *Eur. J. Biochem.*, **46**, 83, 1974.
- [13] Pulleyblank, D. E. and Booth, G. M.: *J. Biochem. Biophys. Methods*, **4**, 339, 1981.
- [14] Chamberlain, J. P.: *Anal. Biochem.*, **98**, 132, 1979.
- [15] Bossinger, J. et al.: *J. Biol. Chem.*, **254**, 7986, 1979.

[本文于1985年2月18日收到]

Q β 复制酶与 RNA 重组技术

陈 建 华

(同济大学医学系,上海)

以往的遗传工程主要是设计生物的基因蓝图,转移 DNA 的过程,其关键是 DNA 的重组操作。自1983年哥伦比亚大学的 Kramer, Mills 和 Miele^[1] 建立 RNA 重组技术以后,人们认为遗传工程的内容必将极大地丰富起来。

一、Q β 复制酶和 MPV-1 RNA

RNA 重组技术是在需求大量 RNA 的刺激下发展起来的。细胞内的 RNA 是 DNA 的转录产物,而转录要求一定的条件,进行的规模也很有限。即使在转录活跃的情况下,一个 DNA 分子一次产生一个 RNA 分子, RNA 分子的量只能按算术级数增长。因此要想得到足

够用于 RNA 研究的量是较困难的。在类病毒 RNA 的研究中,这一问题更为突出。这些类病毒的 RNA 一般为270—380个核苷酸,无论在经济上还是在科学研究方面都有很重要的意义,然而却很难得到足够的量。因此,类病毒的研究进展缓慢。

人们早就发现噬菌体 Q β 的 RNA 能以较快的速度复制,能在较短的时间内积累大量的 RNA 产物。这一点并不难理解。因为 Q β 的 RNA 复制是从 RNA 到 RNA,第一次复制以后,就出现了二个 RNA 模板,第二次复制则产生四个 RNA 模板,如此复制下去, RNA 分子的量即按几何级数增长。1965年 Haruna 和