

双向电泳分离大鼠胰液蛋白质

——一种简化制备梯度聚丙烯酰胺凝胶的方法

吴 宏 贺新军 周 辉 王世真

(北京协和医院核医学科)

等电聚焦和 SDS 聚丙烯酰胺凝胶双向电泳已成为广泛应用的蛋白质分离技术^[1]。在等电聚焦电泳中应用稳定的两性电解质以及在 SDS 电泳中采用浓度梯度胶系统是维持双向电泳高分辨率的重要因素。近年来,国内也有不少有关应用双向电泳技术分离蛋白质的报道,但在 SDS 电泳向中,大多采用均一浓度的聚丙烯酰胺凝胶,使双向电泳的分辨率受到影响。这可能与浓度梯度胶的配制较繁琐,重复性不易控制有关。我们根据密度梯度的原理,在 SDS 电泳中采用简易法配制浓度梯度胶系统,试用于大鼠胰液蛋白质的双向电泳分离,获得较满意的结果,现介绍如下。

一、材料和方法

1. 试剂 两性电解质 (Ampholine pH5~7, LKB); 两性电解质 (Ampholine, pH3~9, 上海试剂二厂); SDS (Serva); 标准蛋白质 (Serva); 胰蛋白酶抑制剂 (Soybean Trypsin Inhibitor, 简称 STI, Sigma)。

2. 纯胰液的采取 250g 雄性大鼠,按 Dagorn 的方法行胰管插管术,结扎胆管后收集纯胰液^[2], -25℃ 保存。

3. 等电聚焦凝胶柱配制 用 0.4cm×14cm 玻璃管,参照 O'farrell 的方法配胶^[3],并作以下修改: (1)两性电解质的浓度改用 1% Ampholine pH5~7、0.33% Ampholine pH3~9。 (2)凝胶混合液中加上 2μgSTI/ml。

4. SDS 简易浓度梯度胶板的配制 (1)垂直板灌胶框架的制作。准备两块 20cm×20cm×0.3cm 玻璃板,其中一块顶部呈凹形,凹陷部分

深 4cm, 宽 16cm。两块玻璃板间的底部和两侧各用一条 20cm×2cm×0.1cm 的有机玻璃条间隔,用白蜡封住框架底部及两侧,并用铁夹固定。(2)梯度分离胶的制备。如图 1 所示,先在凹形玻璃板上划出四条间距为 3cm 的横线作为灌胶的刻度。按 O'farrell 的基本配方^[3],分别配制 12%、15%、18% 和 21% 的四种凝胶混合液。将注射器上的 20cm 长针头插入框架内的底部,依次灌入四种凝胶混合液。每种凝胶混合液灌入时,必须将长针头插入框架底部后再灌入,这样使低浓度的胶液被依次上推,形成图 1 所示的凝胶梯度。(3)大孔胶的配制。采用 O'farrell 的方法进行,凝胶浓度为 4%;用前配制^[3]。

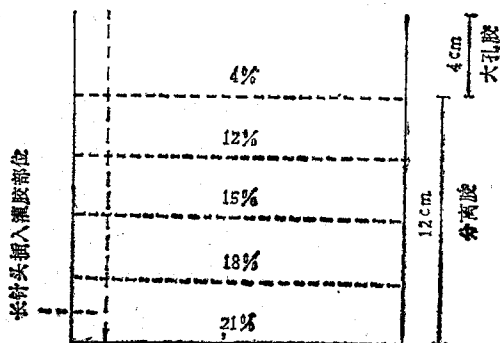


图 1 SDS 梯度胶配制示意图

5. 胰液样品的制备 按 Scheele 的方法制备^[4],样品液中含 4% Ampholine pH3~9、4M 的尿素。加样前配制。

6. 电泳 参照 O'farrell 的方法进行^[3]。(1)第一向为等电聚焦柱电泳,以 30mM 的氢氧化钠液为阴极电泳液,以 10mM 的磷酸液为阳极电泳液,在 8℃ 下进行电泳。先在 200 伏

下预电泳 1 小时后,加入含有 400 μ g 胰液蛋白质的样品液至各管,然后在恒压 500 伏下电泳 15 小时。(2)平衡:第一向电泳结束后,取出凝胶柱,置于 1% SDS-50mM Tris-HCl pH6.8 的缓冲液平衡 10 分钟。(3)第二向电泳为 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳。将平衡后的第一向电泳的凝胶柱置于 SDS 凝胶板顶部,以琼脂固定。在电泳槽加入 0.1% SDS-0.192M 甘氨酸-0.025 M Tris 电泳液后,在冰块持续降温下,按 25mA/板的条件进行 SDS 电泳。约 7 小时,指示剂移至末端时终止电泳。

7. 染色与脱色 用 0.06% 的考马斯亮蓝 G-250 染色液染色过夜后,再用乙醇-乙酸液在加热 60 $^{\circ}$ C 下脱色 1 小时。

二、结果和讨论

1. 双向电泳的分辨率 我们在电泳分离大鼠胰液蛋白质时,用单向等电聚焦柱电泳可分出 12 条区带,用单向 SDS 聚丙烯酰胺浓度梯度凝胶电泳可分为 14 条区带,而用双向电泳则可分出 20 多个蛋白点,分辨率明显高于单向电泳(图 2)。Scheele 用两向平板电泳(等电聚焦和 SDS 聚丙烯酰胺浓度指数梯度凝胶双向电泳)分离人和多种动物的胰液蛋白质,分离出 20 种左右的主要成份^[4-6]。我们以简易法配制的梯度胶代替指数梯度胶后,仍然获得了满意的双向分离效果。

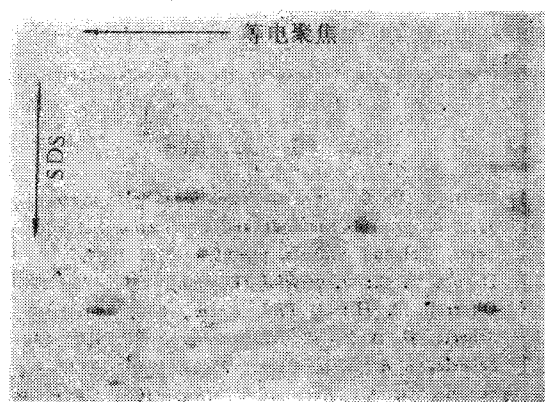


图 2 大鼠胰液双向电泳蛋白质图谱

2. 关于 SDS 聚丙烯酰胺浓度梯度凝胶电泳的分辨率 Tartakoff 等用 13% 的均一浓度

凝胶进行 SDS 电泳,可将胰液蛋白质分出 8 条区带^[7]; Scheele 用 12—17% 的指数梯度凝胶进行 SDS 电泳可分出 15 条区带^[4]; 用本法则可分出 14 条区带,说明本法的分辨率与指数梯度胶是相似的,明显优于均一浓度胶的分辨率。图 3 显示出 5 种标准蛋白质(白蛋白, MW 67,000; 卵清蛋白, MW 45,000; 胰凝乳蛋白酶, MW 25,000; 肌球蛋白, MW 17,800; 细胞色素 C, MW 12,300) 的分子量对数值与相对迁移率(Rf 值)呈线性关系。

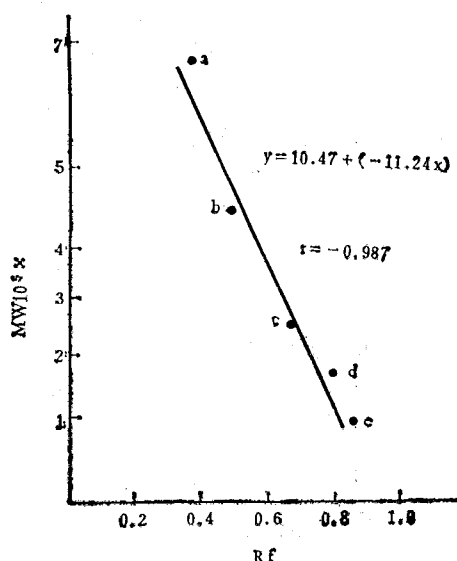


图 3 分子量对数值与 Rf 的关系

a. 白蛋白; b. 卵清蛋白; c. 胰凝乳蛋白酶
d. 肌球蛋白; e. 细胞色素 C。

3. 重复性的控制 双向电泳的重复性取决于两个单向电泳各自的重复性。我们认为,在等电聚焦柱电泳中,除了控制试剂、电泳条件、温度以及灌胶柱长短的一致性以外,防止气泡的出现十分重要。仅仅通过凝胶混合液的抽气是不够的,还应注意以下二点: (1)在灌胶中用长针头从管底部起灌,不断地以手指轻弹管壁,从下至上,将肉眼不易看到的小气泡驱出胶外。(2)电泳液应尽可能地完全浸泡凝胶管,避免在电泳中因温差而产生新的气泡。在 SDS 电泳中,凝胶梯度的稳定性主要与聚合时间有关。应在接近的温度范围内聚胶才能保证凝胶梯度的重复性。此外,由于胰酶激活而引起的

微量蛋白质的快速测定

——Lowry 法的改进

薛政国 陈世铭

(军事医学科学院药理毒理研究所)

随着生化技术的发展,含量微少的蛋白质的提纯不断取得成功。但在所得的蛋白量极少时(如高度纯化的骨骼肌胆碱能受体),不易定量,这就要求测定技术微量化,以减少样品消耗,提高敏感性和能避免干扰。Lowry 的酚试剂法是用得最多的方法,精密度好,对多个样品同时测定较为方便^[1]。但试剂与操作步骤仍嫌复杂,而且费时,干扰物质较多,敏感性仍嫌不足,一般只能测定 10 μg 以上的蛋白质样品,对于不溶性蛋白或膜结合蛋白必先进行预处理,步骤繁杂。本方法吸收多种 Lowry 改良法的优点^[2],对试剂及操作作进一步改进,微量化,利用现代化仪器,使之操作简便、快速、减少干扰,提高敏感性,便于大批样品同时测定。

材料和方法

1. 牛血清白蛋白(BSA),电泳纯,北京生化

自身消化也可导致双向电泳重复性的改变(蛋白质点消失现象)。我们参照 Scheele 的方法,在凝胶混合液中加入胰蛋白酶抑制剂和尿素;在样品液中加尿素;在低温下进行电泳,以减少因胰酶激活而产生的自身消化现象^[4]。

4. 我们认为,简易法制备的浓度梯度胶具有操作简便,重复性容易控制,分辨率高和梯度线性好等优点,无论是在聚丙烯酰胺凝胶电泳中还是在双向电泳中都具有实用价值。

制品厂出品。十二烷基硫酸钠(SDS),化学纯,上海牙膏厂产品。硫酸铵,乙二胺四乙酸二钠(EDTA),化学纯,北京化工厂生产。蔗糖,化学纯,广州化学试剂厂出品。Folin-酚试剂根据文献^[3]配制。

2. 试剂甲

(1) 含 4% 碳酸钠及 0.2% 酒石酸钠($\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)的 0.2N 氢氧化钠溶液,添加 1% SDS (在没有干扰物质或测定一般可溶性蛋白时可不加 SDS)。

(2) 4% 硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)水溶液。将(1)和(2)按 100:1 的比例混合均匀,即为试剂甲,一天内使用。

试剂乙(Folin-酚试剂)浓度为 2N, 4℃ 冰箱保存,用前稀释 1 倍。

3. 仪器 微量多道扫描光密度计 Titertek

Multiskan 及 96 孔培养板原用于 ELISA。测定

参 考 文 献

- [1] Celis, J. E. et al.: *Two-dimensional gel electrophoresis of proteins methods and applications*, Academic press, Orlando Florida, pp 194—413, 1984.
- [2] Dagorn, J. C.: *J. physiol* (London), **280**, 435, 1978.
- [3] O'farrell, P. H.: *J. Biol. Chem.*, **250**, 4007, 1975.
- [4] Scheele, G. A. et al.: *Gastroenterol*, **80**, 461, 1981.
- [5] Scheele, G. A.: *Clin. Chem.*, **28**(4), 1056, 1982.
- [6] Scheele, G. A.: *Excerpta Medica*, (ICS) **642**, 89, 1984.
- [7] Tartakoff, A. et al.: *J. Biol. Chem.*, **249**, 7420, 1974.

[本文于 1986 年 1 月 22 日收到]