

讲 座

电泳滴定曲线及其应用

陈 枢 青

(浙江医科大学生化教研室, 杭州 310006)

提 要

电泳滴定曲线法是一种双向电泳法, 第一向等电聚焦, 以获得固定的 pH 梯度; 然后加样, 进行第二向电泳, 得到的电泳滴定曲线图, 直接反映了在各种 pH 下, 各蛋白质组分之间在迁移率上的差异。该法在选择蛋白质分离纯化的最佳条件; 研究蛋白质的突变; 研究分子间相互作用等领域, 已表现出广阔的应用前景。

关键词 蛋白质, 电泳滴定曲线, 电泳滴定曲线法应用

概 述

制备蛋白质的电泳滴定曲线 (electrophoretic titration curve) 是近年发展起来的一项新技术。自 1977 年 Rosengren^[1] 提出以来, 该技术已在许多领域得到成功的运用和发展, 展示了广阔的前景。

蛋白质是多聚电解质, 它所含氨基酸的数目和类型, 直接影响它的物理特性。二十世纪初, 人们曾经用酸碱滴定法研究蛋白质^[2]。该法需要足够量的纯蛋白质, 而且滴定也非常困难。后来, 人们发现蛋白质的电泳迁移率和其在该 pH 下所带电荷有关, 故测定一系列 pH 下的电泳迁移率, 也可得到类似于酸碱滴定法得到的信息^[3]。然而, 此法非常繁琐, 通常无人采用。直到近年, Rosengren^[1], Bosisio^[4], Ek 和 Righetti^[5] 发展了电泳滴定曲线法, 才使该领域的研究得到根本的改观。

所谓电泳滴定曲线法, 实际上是一种双向电泳法。通常用正方形 (100mm × 100mm × 2mm) 凝胶板, 含有两性电解质载体。第一向, 不加样品, 15W, 500Vh (伏特 × 小时), 形成可

以稳定两小时的 pH 梯度。凝胶板的中间, 沿 pH 梯度, 预制一条槽 (1.0mm × 1.5mm × 90 mm), 将样品加入此槽。垂直于 pH 梯度, 进行第二向电泳, 15W, 750Vh。电泳毕, 经染色, 就得到一张电泳滴定曲线图。它以 pH 为横坐标, 迁移率为纵坐标。恰恰反映了不同 pH 时, 各种蛋白质的迁移率。该法样品耗量少, 不需要提纯, 应用广泛。

用于选择蛋白质分离纯化的条件

电泳滴定曲线能够提供被分离蛋白质的电荷情况, 故凡是依据蛋白质电荷差异进行分离纯化的方法, 均可应用电泳滴定曲线法选择最佳纯化条件。如: 电泳法, 离子交换层析法等。

(1) **电泳法** 从一组混合蛋白质组分的电泳滴定曲线图上, 可以很容易地看到在哪个 pH 条件下, 各组分间电荷差异最大。也就是说各条曲线间距最宽, 在该 pH 条件下进行电泳, 分离效果一定最佳^[1]。

(2) **离子交换层析法** 1983 年, Fågestam 等^[6] 提出了利用电泳滴定曲线法选择离子交换剂的类型以及分离最佳 pH 条件的基

原理(图 1), 并用碳酸酐酶证明了该理论的正确性(图 2)。同年, Haff^[7] 等将电泳滴定曲线应用于选择蛋白质高效离子交换层析的最佳层析条件。他们将牛乳酸脱氢酶的电泳滴定曲线与不同 pH 下牛乳酸脱氢酶在强碱性阴离子交换柱上的保留体积进行比较, 认为蛋白质在离子交换层析中的保留体积正比于蛋白质的电荷密度, 而蛋白质的电荷密度又紧密地与低浓度胶的电泳迁移率相关。进一步研究发现, 蛋白质电荷的不对称分布可影响这种正比关系。也是同年, Lindblom^[8] 用高效离子交换层析研究尿蛋白, 电泳滴定曲线法成功地为他选择了

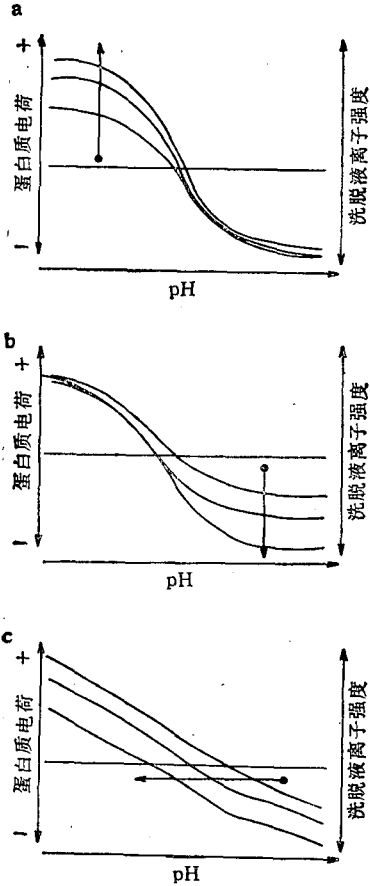


图 1 三种典型的电泳滴定曲线模式图

- (a) 在低 pH, 沿箭头方向增加离子强度, 三种蛋白质依次洗脱, 分离较好。适宜于阳离子交换层析。
- (b) 在高 pH, 沿箭头方向增加离子强度, 三种蛋白质分离较为理想。适宜于阴离子交换层析。
- (c) 阳离子交换层析或阴离子交换层析均能用于该组分的分离, 改变 pH, 分离度一样。但用层析聚焦法效果更好。在恒离子强度下, 用 pH 梯度进行洗脱, 被分离组分按 pI 高低依次洗脱

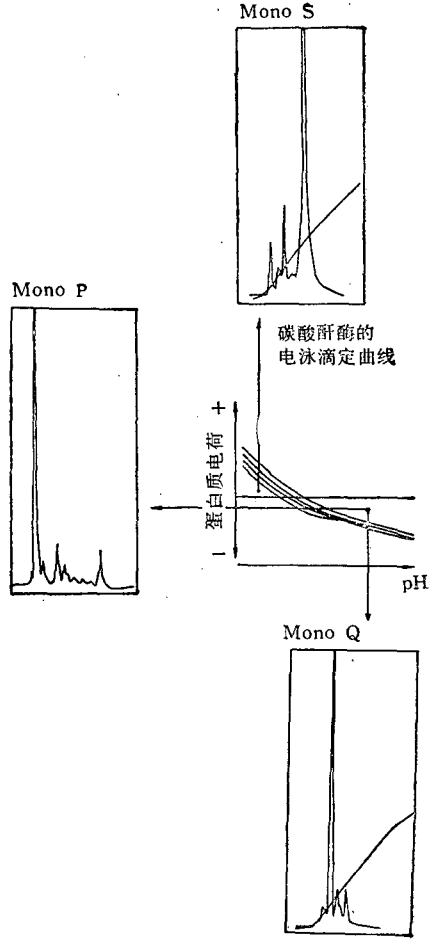


图 2 碳酸酐酶的滴定曲线与其三种离子交换层析洗脱曲线的相应关系

- Mono S: 阳离子交换柱。
- Mono Q: 阴离子交换柱。
- Mono P: 弱阴离子交换柱(用于层析聚焦)

层析柱和层析条件。继而他又报告^[9] 在相同的离子强度梯度下, 改变 pH, 将得到的尿蛋白洗脱曲线与其电泳滴定曲线进行对照, 也发现了它们之间极好的相关性。后来, Britton 等^[10] 也利用电泳滴定曲线法成功地选择了分离牛小肠碱性磷酸酶的离子交换层析条件。1984 年, Einarsson 等^[11] 又将该法成功地运用于选择叮蜚昆虫毒素的离子交换层析条件。

研究蛋白质的突变

对于一族蛋白质, 在恒定的实验条件下, 其在任何一定 pH 值时的电泳迁移率与蛋白质失

研究分子间相互作用

去或得到的质子相关。将正常蛋白质和突变后的蛋白质一起做电泳滴定曲线,从曲线的形状可以看出是哪个带电荷的氨基酸被取代了。如碱性氨基酸 Lys 被中性氨基酸取代后的蛋白质,其滴定曲线在 $\text{pH} > 10$ 和原蛋白质的滴定曲线重合。但在 $\text{pH} < 9$ 时,变成两条平行曲线。这是因为当 $\text{pH} > 10$ 时, Lys 的氨基被滴定,从而显示不出由于 Lys 存在所造成的差别。而在 $\text{pH} < 10$ 时, Lys 的存在使蛋白质的电荷具有明显不同。反之,如果 Asp 或 Glu 被中性氨基酸取代,它们的滴定曲线在 $\text{pH} < 3$ 时重合,因为其羧基被质子化了。在 $\text{pH} > 5$ 时,两条滴定曲线保持平行,显示了 Asp 或 Glu 存在时蛋白质电荷的差异。当 Arg 被中性氨基酸取代时,滴定曲线一直保持平行。因为只有在 $\text{pH} > 10.5$ 时, Arg 才可能被滴定。而常用的两性电解质载体,在 $\text{pH} > 10.5$ 时不可能保持稳定的 pH 梯度。当碱性氨基酸被酸性氨基酸取代后,在 $\text{pH} 5 \sim 9$, 两曲线间的距离会两倍于单电荷取代,但在 $\text{pH} < 3$ 或 $\text{pH} > 11$ 时,两曲线间的距离约等于单电荷取代。这是因为在这两种情况下,总是有一个氨基酸(酸性的或碱性的)被滴定(图 3)。1978 年, Righetti 等^[12]利用电泳滴定曲线法对 HbA 和 HbS ($\alpha_2\beta_2^{6(A_3)\text{Glu}\rightarrow\text{Val}}$), HbA 和 HbG philadelphia ($\alpha_2^{68(E_{17})\text{Asn}\rightarrow\text{Lys}}\beta_2$), HbSuresnes ($\alpha_2^{141(\text{HC}_3)\text{Arg}\rightarrow\text{His}}\beta_2$) 及 HbA 和 HbC 进行比较,完全与上述基本原理吻合。

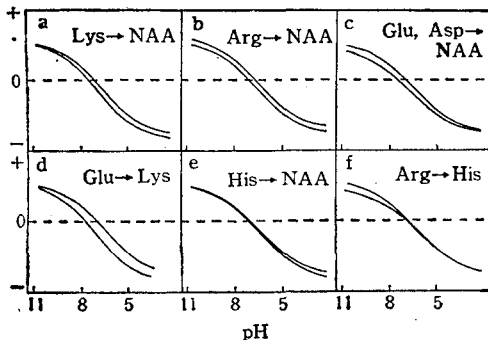


图3 血红蛋白和其被某些氨基酸取代后的突变蛋白的理论滴定曲线

NAA: 中性氨基酸

(1) 蛋白质-配基相互作用 蛋白质-配基相互作用很难用电泳法来阐明,因为在电场中,复合物会很快解离,解离速度与所加电压的平方成正比^[13]。近年来有人运用电泳滴定曲线法研究蛋白质-配基相互作用。测定复合物的半寿期;复合物稳定的 pH 范围;研究蛋白质-配基在复合物中的分子比;比较复合物与单体的电泳滴定曲线,还能够估计出配基结合在蛋白质的哪个氨基酸上。1978 年, Krishnamoorthy 等^[14]用电泳滴定曲线法研究了成人血红蛋白和 6-磷酸葡萄糖结合的复合物,发现在达到平衡时,游离成人血红蛋白与成人血红蛋白-6-磷酸葡萄糖复合物之比为 7:3。复合物在有氧、且无过量 6-磷酸葡萄糖存在的情况下,在 $\text{pH} 3.5 \sim 10$, 电泳 20 min 无解离。说明 6-磷酸葡萄糖与成人血红蛋白是共价结合的,四氢硼钠 (NaBH_4) 还原并不改变图谱的形状,只是达到平衡时,游离成人血红蛋白与成人血红蛋白-6-磷酸葡萄糖复合物之比从 7:3 变到 3:7。同时,他们还研究了成人血红蛋白-磷酸吡哆醛复合物,正铁血红蛋白-六磷酸肌醇复合物及成人血红蛋白-2,3-二磷酸甘油复合物,都说明电泳滴定曲线法能成功地应用于蛋白质-配基相互作用的研究。

(2) 蛋白质-蛋白质相互作用 一般来说,如果蛋白质-蛋白质复合物结合足够牢固,用普通电泳法就可检出两种蛋白质混合物中产生的一条新谱带。但要知道在各种 pH 下,复合物的稳定性如何,以帮助理解两种蛋白质相互作用的机理,电泳滴定曲线法将是最方便的手段。将两种单体蛋白质及其混合物分别做电泳滴定曲线,如果两种蛋白质能相互作用,混合物的电泳滴定曲线就会不同于单体的电泳滴定曲线,两条曲线靠得最近处所示的 pH,就是复合物最稳定时的 pH。Righetti 等^[15]利用电泳滴定曲线法,发现正铁血红蛋白 (Met-Hb) 与细胞色素 $b_5(\text{Cytb}_5)$ 在 $\text{pH} 8.0 \sim 8.3$ 时最稳定。这是由于正铁血红蛋白的赖氨酸与细胞色素 b_5

的酸性氨基酸相互作用的结果。所以,复合物在 $\text{pH} > 10$ 或 $\text{pH} < 3.5$ 时,会很容易解离。因为 $\text{pH} > 10$, 赖氨酸被去质子化。 $\text{pH} < 3.5$ 时,谷氨酸和天门冬氨酸被质子化。他们还认为细胞色素 b_5 与血红蛋白亚基是 1:1 结合的。否定了 Gacon 等^[16]用比浊法测出的 2:1 的结果。从生理角度讲,红细胞中细胞色素 b_5 的浓度 ($8 \times 10^{-7} \text{mol/L}$) 比正铁血红蛋白的浓度 ($2 \times 10^{-4} \text{mol/L}$) 低得多,似乎 1:1 形成复合物更为合理。

测定 pK 值

Righetti 等^[17]应用数学理论,发展了一个公式,从电泳滴定曲线的形状可以直接测定可解离基团的 pK 值,首先假设:

a. 单价两性分子的电泳迁移率与其解离度成正比。

b. 在整块电泳胶上,聚丙烯酰胺的聚合度和粘度是一致的。

c. 在电泳胶各区段上的导电性一致。

d. 在 $\text{pH} 3 \sim 10$ 梯度中,分子不改变形状和大小。

则下式成立:

$$M_i = h \cdot \frac{10^{(\text{pK}_c - \text{pH})} - 10^{(\text{pH} - \text{pK}_a)}}{1 + 10^{(\text{pK}_c - \text{pH})} + 10^{(\text{pH} - \text{pK}_a)}} \quad (1)$$

K_c 和 K_a 分别为阳离子和阴离子解离常数, h 是比例系数。当 $\text{pH} = \text{pI}$ 时,电泳迁移率为零 ($M_i = 0$) 即:

$$\text{pI} = \frac{\text{pK}_c + \text{pK}_a}{2} \quad (2)$$

这就是计算单价两性电解质等电点的公式。

测定阴极或阳极方向二分之一时的 pH , 即

$\text{pH}_{\frac{1}{2}}$, 此时 $M_i = \frac{1}{2}$, 以 $\text{pK}_a = 2\text{pI} - \text{pK}_c$ 代

入(1)式,得:

$$\text{pK}_c = \text{pH}_{\frac{1}{2}} - \lg(1 - 3 \times 10^{-2(\text{pI} - \text{pH}_{\frac{1}{2}})}) \quad (3)$$

如果两个 pK 值之差大于 1.5, 比例系数 h 可被忽略, (它的影响常小于 0.02 pH)。例如阿霉素^[18], 从其电泳滴定曲线上首先测出其等电

点 $\text{pI} = 8.76$ (曲线与样品槽交叉处), 再测出 $\text{pH}_{\frac{1}{2}} = 7.92$ 。即可算出 $\text{pK}_c = 7.95$, $\text{pK}_a = 9.57$ 。

其 它

对于电泳滴定曲线法,可以说没有两种蛋白质会形成完全重叠的滴定曲线, 尽管它们的氨基酸组成十分相似, 故有很高的区分能力。这在研究蛋白质电荷情况时非常有用。1989 年, Suttner 等^[19]将电泳滴定曲线应用于人血液中维生素 K 依赖蛋白质和棱鳞矛头蝮蛇 (*Bothrops Asper*) 毒蛋白的研究, 并发现了凝胶中两性电解质载体能与某些蛋白质发生相互作用, 使电泳滴定曲线发生扭曲, 血清吸收和超滤法可以除去其中的影响成分。

综上所述, 电泳滴定曲线法有以下优点:

(1) 电泳滴定曲线可以在一次实验中完成, 相当于其它电泳法 20—30 次实验。(2) 制备电泳滴定曲线, 不需要高纯蛋白质。(3) 随着酶谱技术的发展, 在蛋白质分离纯化的最初, 通过分析蛋白质提取液的电泳滴定曲线, 便能选择依赖于电荷差别的纯化方法之最佳条件。(4) 研究分子间相互作用时, 在一次实验中, 就可测定复合物中结合物的分子比, 复合物的半寿期, 复合物稳定的 pH 范围以及结合基团等。(5) 在研究遗传突变时, 可大约知道突变的氨基酸, 也可测出在某一 pH 值下, 突变引起的质子数变化。该技术的主要缺陷是目前尚无分析如此复杂的电泳滴定曲线之基本理论, 但建立这样的理论是有可能的。近年, 人们将计算机技术应用于双向电泳图谱的分析^[20, 21], 已为该理论的建立奠定了良好的基础。

参 考 文 献

- 1 Rosengren A, Bjellqvist B, Gasparic V. In: Radola B J. Graesslin D eds, *Electrofocusing and Isotachopheresis* Berlin: De Gruyter, 1977: 165
- 2 Edsall J T. In: Cohn E J, Edsall J T eds. *Proteins, amino acids and peptides*, New York: Hafner, 1965: 447
- 3 Alberty R A. In: Neurath H, Bailey K eds. *The proteins*, Academic Press, 1953: 505
- 4 Bosisio A B, Locherlein, C, Snyder R S et al. *J Chromatogr.* 1980; 189: 317

一种新的生物组织固定方法

——微波辐射固定

赵 敏

(第三军医大学野战外科研究所, 重庆 630042)

提 要

微波辐射使生物组织均匀产热, 灭活酶, 可以广泛用于光镜、电镜、常规染色、各种特殊染色及免疫组化研究中组织标本的固定。固定液浸泡微波固定的方法可用于大块组织的快速固定, 且染色效果更好。是一种较为理想的固定方法。

关键词 微波辐射, 组织固定, 组织学, 超微结构

固定是组织结构及超微结构研究中制作切片的基础之一。固定能防止组织自溶及变性、凝固或稳定蛋白, 并能加强组织对随后制样过程的耐受力, 增强染色效果。目前, 多用化学方法及低温固定组织。尽管人们知道, 组织加热至 57℃ 时, 其自溶作用完全停止^[1], 但加热作为组织固定的方法并未能用于组织学及超微结构研究。以热传导的方式加热组织不能使大块组织内的温度均匀升高, 必然导致组织的自溶、变性。微波(MW)辐射可使含水组织快速而均匀产热, 一般认为这是微波辐射固定组织的主

要机制^[2]。近年来, 随着微波技术的发展及微波炉的普及, 微波作为一种新的组织固定方法, 引起了人们的注意。从 70 年代初到现在, 这一技术日趋完善。其具有快速固定较大组织块、方法简便、可靠、组织抗原性保存较好等优点。为此, 本文将简要介绍这一方法的原理及其应用。

微波固定的原理

MW 是一种高频电磁波, 频率范围: $3 \times 10^8 - 3 \times 10^{11}$ Hz, 波长 1—1000 mm。MW 按波

- 5 Ek K, Righetti P G. *Electrophoresis*, 1980; 1: 137
- 6 Fägerstam L, Söderberg L, Wahlström L et al. *Protides Biol Fluids*, 1983; 30: 621
- 7 Haff L A, Fägerstam L G, Barry A R. *J Chromatogr*, 1983; 266: 409
- 8 Lindblom H, Söderberg L, Cooper E H et al. *J Chromatogr*, 1983; 266: 187
- 9 Lindblom H, Axjö-Fredriksson U B, Cooper E H et al. *J Chromatogr*, 1983; 273: 107
- 10 Britton V J, Beadling L C, Barry A. *Liquid Chromatography*, 1983; 1: 176
- 11 Einarsson R, Renck B. *Toxicon*, 1984; 22: 154
- 12 Righetti P G, Krishnamoorthy R, Gianazza E et al. *J Chromatogr*, 1978; 166: 455
- 13 Ogston A G. *Nature*, 1946; 157: 193
- 14 Krishnamoorthy R, Bosisio A B, Labie D et al. *FEBS Lett*, 1978; 94(2): 319
- 15 Righetti P G, Gacon G, Gianazza E et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 1978; 85: 1575
- 16 Gacon G. 12th FEBS Meeting, Dresden, Abstr. 1978; 926
- 17 Righetti P G, Gianazza E, Bosisio A B et al. In: Frigerio A, McCamish M eds, *Recent developments in chromatography and electrophoresis* 10, Amsterdam. Elsevier, 1980: 89
- 18 Righetti P G, Menozzi M, Gianazza E et al. *FEBS Lett*, 1979; 101(1): 51
- 19 Suttner J, Dyr J E. *Electrophoresis*, 1989; 10(10): 704
- 20 Rowlands D G, Flook A, Payne P I. *Electrophoresis*, 1988; 9(12): 820
- 21 Booz M L. *BioPharm*, 1989; 2(1): 44

[本文于1990年3月5日收到, 8月7日修回]