

经验交流

蛋白电泳铜染色后胶中生物活性 IL-2 的回收

徐明波 姚志建

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

关键词 制备电泳, 铜染色, 白细胞介素-2

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)已广泛用于蛋白质样品组分分析。通常的方法染色后蛋白质和肽即固定在凝胶上, 尽管凝胶用 SDS 平衡后可对蛋白质进行洗脱或转移, 但由于回收率低、耗时, 同时回收的蛋白只能保存其抗原性而生物活性丧失, 因而限制了 SDS-PAGE 在蛋白质回收领域中的应用。最近 Lee^[1] 等报告了一种快速而灵敏的 PAGE 胶负染色法, 由于未经固定, 因而可对感兴趣的蛋白进行洗脱回收。本文介绍一种自制备 SDS-PAGE 胶中回收生物活性蛋白白细胞介素-2(IL-2)的程序。

材料及方法

一、样品的制备 发酵的高效表达 IL-2 的大肠杆菌液经 3500r/min 离心收菌, 用 50mmol/L 的 Tris-HCl (pH8.3) 洗涤三次后, 超声破碎, 12000r/min 离心回收沉淀(含包涵体), 沉淀用 4mol/L 尿素洗一次, 用含 2%SDS, 10mmol/L 二硫苏糖醇(DTT)的 50mmol/L 磷酸缓冲液(pH6.8)裂解包涵体, 12000r/min 离心回收上清做进一步分离。

二、电泳、铜染色及蛋白洗脱 SDS-PAGE 按 Laemmli^[2] 方法, 分离胶为 12.5%, 浓缩胶为 7.5%, 上述样品加少量蔗糖和溴酚蓝经 90℃, 3min 处理后上样。铜染色基本按照 Lee 等的方法进行。染色后将 MW 为 15.5kD 的 IL-2 区带切下, 浸入含 50mmol/L EDTA, 0.1%SDS 的 20mmol/L PB(pH8.0)中, 振荡洗脱。多余的铜离子可用透析和超滤的方法去除。

三、回收 IL-2 的纯度及活性测定 回收的 IL-2 经 12.5%SDS-PAGE, 考马斯亮蓝鉴定纯度。IL-2 活性测定用 MTT-CTLL 方法^[4], IL-2 标准为 Sigma 公司产品。

结果与讨论

经铜染色后的凝胶洗脱 4, 8, 16, 24h 的回收率分别为 20%, 43%, 71% 和 80%, 再延长洗脱时间回收

率不再增加。洗脱 24h 后的凝胶用考马斯亮蓝复染, 蛋白在凝胶上无残留。用 10×0.8×0.2cm 的制备样品槽经一次制备电泳可从 0.3ml 原液中回收 IL-2 200μg。

将去除铜离子的洗脱液经 12.5% SDS-PAGE, 考马斯亮蓝染色可见只有 15.5kD 和 31kD 两条带出现, 其中 15.5kD 的蛋白是 IL-2 单体, 少量的 31kD 的蛋白是 IL-2 二聚体(图 1)。回收的 IL-2 经 MTT 法测定其活性达 $(2.0 \pm 1.1) \times 10^6 \text{U/mg}$ 。

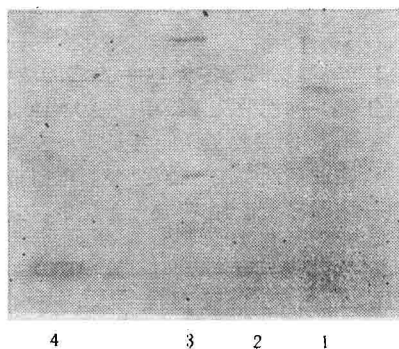


图 1 回收 IL-2 的纯度鉴定

1 为制备电泳前的样品; 2, 4 为洗脱回收 IL-2; 3 为标准分子量蛋白(MW 自上而下分别为 94, 67, 45, 30, 17.5kD)

SDS-PAGE 后活性蛋白的回收一直是人们所感兴趣的问题, 一般认为蛋白经 SDS-PAGE 后活性即丧失。包涵体蛋白较为特殊, 通常以无活性、不溶解的形式存在。要对其进行回收首先要将其变成可溶的形式, SDS 是一种离子型去垢剂, 可将包涵体内的蛋白(IL-2)变成可溶解的变性形式, 并可直接用于 SDS-PAGE 分离。洗脱后的 IL-2 可用透析或超滤的方法去除变性剂、还原剂和其它小分子物质, 在适当的 pH 下, IL-2 可自然复性, 但由于分子内有一游离的半胱氨酸巯基, 因而复性过程中可有一定量的二聚体形成。

一种简易的聚丙烯酰胺凝胶干胶制作法

吴俊辉 舒煦

(四川省肿瘤研究所, 成都 610041)

关键词 聚丙烯酰胺凝胶, 干胶

在聚丙烯酰胺凝胶电泳中经常遇到凝胶干胶制作不好的问题, 即使在有干胶机的实验室也常发生凝胶裂开、皱缩、电泳条带扩散、干胶质量不理想的情况, 一些文献^[1,2]介绍的方法也常发生类似问题。我们在干胶的方法上作了一些摸索和改进, 总结出一种简易的、成功率高的干胶方法, 所制的干胶光亮平整, 透明度高, 反差增大, 可直接用于投影仪或作底片翻制照片, 不需特殊保护即可长期保存。此法简便、经济, 现介绍如下。

1. 将染色后的凝胶直接浸泡在洗脱液(30%乙醇-5%冰乙酸)中脱色至背景清晰为止; 或将在甲醇-冰乙酸溶液中脱色后的凝胶置以上洗脱液中浸泡 3 小时以上。

2. 将 2 张比凝胶两向各长 1cm 左右的玻璃纸置浸泡凝胶的乙醇-冰乙酸洗脱液中浸湿 1min 左右, 先铺一张在玻璃板(比凝胶板两向各长 3cm 左右)上, 抚平, 将凝胶铺在玻璃纸中央, 排尽气泡, 再铺第二张玻璃纸(与前一张同样大小)在凝胶上, 抚平, 去气泡。

实验比较表明本方法较 Hager^[3]和 Higgins^[4]的回收方法好。它不仅对蛋白的回收率高, 保存了 1L-2 的生物活性, 并且可进行一定规模的放大, 回收的蛋白可用于蛋白质理化指标的分析 and 生物学功能的研究, 再经一次不同机理的色谱分离可对蛋白进行肽谱分析和顺序分析。该法操作简便、周期短, 是一种有效的蛋白质化学研究手段。

参 考 文 献

1 Lee C *et al.* *Anal Biochem*, 1987; 166: 308

3. 用吸水纸轻按玻璃纸边缘, 去除多余液体, 室温平放, 稍干后, 用不干胶带纸(不透明)按凝胶四周边缘紧贴于玻璃纸和玻璃板上。

4. 封好的凝胶可立放在室温阴暗处, 自然干燥 2 天左右, 待胶干硬后, 撕下胶带纸, 剪去边缘多余的玻璃纸, 即制成凝胶干片。

注意事项: (1)在乙醇-冰乙酸混合液中浸泡的时间要充分, 否则易裂开。(2)封胶时尽量排除气泡。(3)胶带纸要贴牢在玻璃板上, 否则易发生皱缩或裂开。

我们在聚丙烯酰胺凝胶电泳、聚丙烯酰胺-SDS 凝胶电泳、同功酶分析凝胶电泳上用此法已制取数十块干胶, 均获得满意的结果。

参 考 文 献

- 1 严育东. 生物化学与生物物理进展, 1986; (6): 70
- 2 周本正. 实用电泳及免疫电泳技术. 湖北, 湖北科学技术出版社, 1988: 56

[本文于 1990 年 5 月 10 日收到, 6 月 27 日修回]

- 2 Gillis S. *Recombinant Lymphokine and their receptor*. New York: Academic Press, 1987: 10-19
- 3 Laemmli UK. *Nature*, 1970; 227: 680
- 4 Tada H *et al.* *J Immun Meth*, 1986; 93: 157
- 5 Hager DA *et al.* *Anal Biochem*, 1980; 109: 76
- 6 Higgins RC *et al.* *Anal Biochem*, 1979; 93: 257

[本文于 1990 年 6 月 25 日收到, 8 月 30 日修回]