

垂直板型凝胶制备电泳及其在分离红曲霉葡萄糖淀粉酶中的应用

中国科学院微生物研究所酶结构与功能研究组

红曲霉葡萄糖淀粉酶 (Glucoamylase, EC 3.2.1.3) 可用于由淀粉生产葡萄糖^[1]。为了解决生产中的一些问题,有必要对酶的作用原理进行较深入的研究。但是,红曲霉葡萄糖淀粉酶具有多形性,在聚丙烯酰胺凝胶电泳上表现为几个很近的区带,性质极为相似,比移值 (R_m) 相差只有 0.04 左右,给分离工作带来很大困难^[2]。我们利用垂直板型凝胶制备电泳的方法,将红曲霉葡萄糖淀粉酶的两个主要成份——带 3 和带 4 分离成聚丙烯酰胺凝胶电泳均一的样品。

我们使用的电泳槽是在本所工厂的协助下制成的。垂直板型聚丙烯酰胺凝胶电泳具有高分辨能力,大多用于分析样品。我们参考了一些资料^[3,4,5,6],加以改进,以适合制备要求。装置的特点是电极缓冲液直接与凝胶接触而不用滤纸桥和在电极槽内通冷却水降温。经一年多来在本实验室使用效果尚好,分辨率高,结构简单,操作方便。每次制得凝胶电泳一条带的样品为 1 毫克左右。这个方法对于难分离的样品,需要少量高纯度组分的情况,是比较适用的。

本文介绍聚丙烯酰胺垂直板型凝胶制备电泳装置的结构、具体操作以及在分离红曲霉葡萄糖淀粉酶中的应用。

一、仪器装置

1. 电泳槽

电泳装置如图 1 所示。上部是阴极槽,下部是阳极槽,具体结构示于图 2。这两个槽分别有蛇形玻璃冷却水管。冷却水的进出口在电泳槽的左侧。电泳槽的右侧是电源接线柱。在

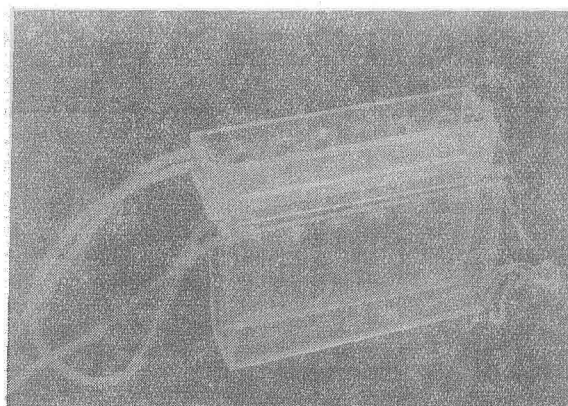


图 1 垂直板型凝胶制备电泳装置

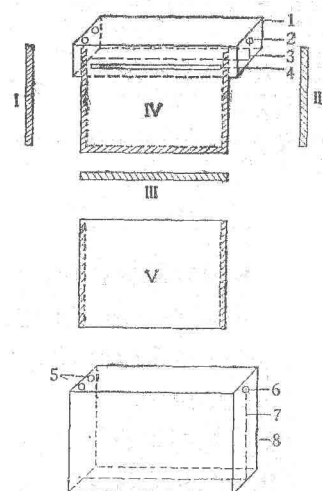


图 2 阴极槽和阳极槽结构图

I. II. 为 $10 \times 140 \times 2$ 毫米或 $10 \times 140 \times 3$ 毫米的玻璃条两面磨砂(图中画斜线的部分,下同) III. $190 \times 10 \times 4$ 毫米或 $190 \times 10 \times 5$ 毫米的玻璃条,两面磨砂 IV. 镶在阳极槽前边的玻璃板,厚 3 毫米,槽以下部分为 190×100 毫米,两侧和下边 10 毫米宽磨砂 V. $190 \times 140 \times 2$ 毫米的玻璃板,两侧 10 毫米宽磨砂 1. 阴极槽 $210 \times 40 \times 40$ 毫米; 2. 阴极接线柱; 3. 阴极; 4. 电极缓冲液流出狭缝 170×5 毫米; 5. 冷却水管进出口; 6. 阳极接线柱; 7. 阳极; 8. 阳极槽 $210 \times 40 \times 130$ 毫米

阴极槽的前部有一个 170×5 毫米的电极缓冲液流出狭缝,电泳时缓冲液从阴极槽通过这个狭缝直接与凝胶面相连接。阴极用铂丝或银丝做成,与电极液流出狭缝平行,两端固定在槽的底部。阳极槽的底部中央装有铂丝阳极,与凝胶板平行,从底部到阳极接线柱的引线外套绝缘套管。

电泳槽的凝胶板面积为 170×100 毫米。凝胶厚度可根据需要决定,我们使用的为 2—3 毫米。

电极槽是用 4.5 毫米厚的有机玻璃板制成,用二氯甲烷粘合。阴极槽前部的玻璃板与槽的连接用环氧树脂做粘合剂。为粘得牢些,所有粘合面均用砂纸或金刚砂磨粗糙。

2. 凝胶板框的制作

将制作凝胶板框的玻璃板用去污剂清洗干净,再用蒸馏水冲洗,直立干燥。洗净的玻璃板面不要用手指接触。用市售的 101 熊猫牌树脂胶(上海胶粘剂厂生产)粘凝胶板框。在阴极槽的板 IV 两侧粘上玻璃条 I、II。在板 IV 下边与边平行粘玻璃条 III。玻璃条 I、II 的下端应与玻璃条 III 靠紧。粘上用夹子夹紧。过 20 分钟左右稍干时,去掉夹子,在玻璃条 I、II 上边粘上玻璃板 V。玻璃板 V 的下边与玻璃条 III 靠紧,用树脂胶把缝隙填满。这时再用夹子夹紧。室温高时,粘后 4 小时即可使用。一般下午粘好,第二天上午使用。

3. 电源

我们用的是北京科学仪器修配厂生产的 DYN-1 型直流电源。电压 0—600 伏,电流 0—150 毫安。

二、具体操作

1. 凝胶的制备

我们采用不连续的凝胶系统。分离胶浓度为 7%。制备一块 2 毫米厚 7 厘米高的凝胶板需配制分离胶溶液 32 毫升,间隔胶溶液 8 毫升。

将凝胶板框的粘缝边缘刷上熔化的石蜡,以堵塞个别小漏洞。然后将蒸馏水注入凝胶板框,证明不漏以后,倒掉蒸馏水。再将 1/1000

(V/V) 的脱温(Tween)溶液(一种表面活性剂)注入板框,沾匀后倒出。用脱温处理是为了降低表面张力,使胶面水平。倒立板框,空干脱温溶液后,将板框架在阳极槽上。用注射器将混合好的凝胶液注入板框。小心不要产生气泡。制备好的凝胶一般当日电泳较好。时间长了,板框不易打开。

2. 电泳

用刀子将凝胶板框下边的玻璃条 III 取下。将阴极槽放在阳极槽上,接好冷却水管和电源引线。将预冷的电极缓冲液加满阳极槽,阳极缓冲液可用已用过的阴极缓冲液重复用一、二次。

样品预先透析脱盐,再对稀释 8 倍的间隔胶缓冲液透析,以使样品电导低于分离凝胶的电导。样品中加入一滴 0.04% 溴酚兰作为示踪染料。再加入适量蔗糖,一般使样品中蔗糖浓度达到 20% 左右。用注射器将样品均匀加在胶面上,上面再加电极缓冲液(注意不要扰乱界面),充满凝胶板框,然后将阴极槽加满电极缓冲液。加样量一般 5 毫克左右,多至 10 毫克。

电泳过程中,通过调节电压控制电流,示踪染料在间隔胶时 40 毫安。在分离胶时 60 毫安。

3. 切片

当示踪染料走到接近胶的下缘时,停止电泳。电泳时间 1—1.5 小时。倾出电极缓冲液,用小刀取下玻璃板 V 和玻璃条 I、II。

切片时用一把长 20 厘米的不锈钢刀,或用钢锯条磨制也可,刀刃要平。刀要与胶面垂直下切。先从凝胶的两侧各切下 5 毫米宽的一条,放在 30% 三氯乙酸中固定,约过 10 分钟就会在凝胶上出现蛋白质带。再将这两条凝胶放回原处,上下对齐。按已显示的蛋白质带的位置,将凝胶切片。为防止带间相混,可先切去两带之间的部分。红曲霉葡萄糖淀粉酶每条带宽 1 毫米左右,两带之间间隔 1 毫米。如果示踪染料走得不直,蛋白质带也会相应不直,可在带的转弯处再切下一小条凝胶,用三氯乙酸显色,然后将整个凝胶板分两部分切片。

4. 抽提

用扩散抽提法。将切下的凝胶条放在试管

中,加5毫升或10毫升蒸馏水,用玻璃棒将凝胶搅碎,在冰箱中浸出,一般24小时即可。用离心或过滤法除去不溶的凝胶部分。上清液即为含样品的抽提液。

5. 鉴定

抽提液的纯度在聚丙烯酰胺圆盘电泳上用 Davis 方法加以鉴定^[7]。分离胶浓度为7%,用考马斯亮蓝 R250 染色。将凝胶电泳均一的抽提液合并,即为制得的纯品。

6. 浓缩

抽提液的蛋白浓度一般为0.1至0.2毫克/毫升。为将样品浓缩,并除去抽提液中混有的凝胶杂质,我们将抽提液用 QAE-Sephadex A-50 离子交换柱(2.5×10厘米)浓缩。一般浓缩5倍以上,收率为70%左右。浓缩样品透析脱盐,可冷冻干燥成干粉。

三、红曲霉葡萄糖淀粉酶的分

应用上述垂直板型凝胶制备电泳方法将红曲霉葡萄糖淀粉酶的带3和带4分离。所使用的材料为无锡酶制剂厂生产的糖化酶酶制剂。生产菌种为红曲霉 (*Monascus* sp.) AS 3.978 的变异株 AS 3.2199,活力为每克2万单位。经 DEAE-纤维素 DE-11 柱层析得到两带样品(带3和带4),此为板型电泳的上样液^[2]。具体分离提纯结果如下。

1. 蛋白、酶活、收率

下表列出了一块凝胶板的分离结果。蛋白质测定用 Lowry 法^[8]。为了消除凝胶中杂质对测定的干扰,以空白凝胶的抽提液做为对照。酶活测定是取2%可溶性淀粉溶液5毫升(其中含 pH 4.5 醋酸缓冲液 0.1 M),加酶蛋白 50 至

70 微克,以水补足总体积为10毫升。在50℃水浴中保温10分钟。立即在沸水浴中煮沸10分钟停止反应。取反应液0.5毫升,用3,5-二硝基水杨酸比色测定还原糖^[9]。在所用条件下,每小时生成1毫克葡萄糖定为1酶活单位。收率是以带3和带4的总和与上样液的比。经几次测定,酶蛋白收率在50—60%。

2. 纯度鉴定

采用 Davis 聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳方法

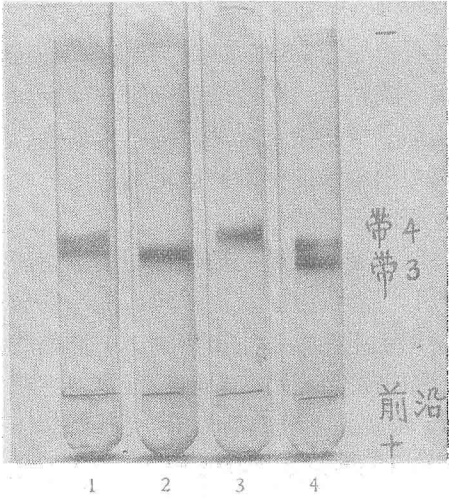


图3 板型电泳样品的聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳照片

1. 上样液; 2. 带3; 3. 带4; 4. 带3和带4混合。分离胶浓度7%,用考马斯亮蓝 R250 染色

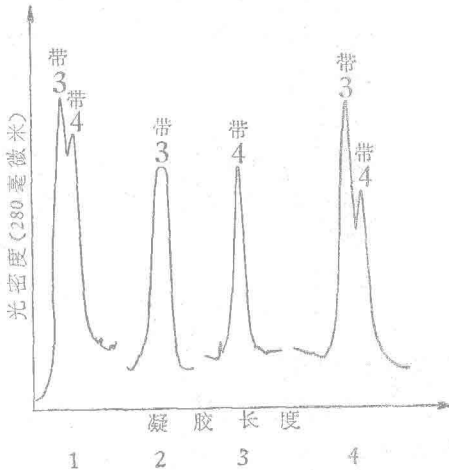


图4 板型电泳样品的凝胶圆盘电泳扫描图*

1. 上样液; 2. 带3; 3. 带4; 4. 带3和带4混合。分离胶浓度7%,在280毫微米扫描

* 凝胶扫描系我院生物物理研究所帮助做的,特此感谢

表 一块凝胶板的分离结果

样 品	蛋 白		酶 活		
	蛋白质 (mg)	收 率	酶 活 (u)	比 活 (u/mg)	蛋白收率
上 样 液	3.32	63%	2868	864	52%
分离的带3	1.22		844	693	
分离的带4	0.86		642	744	

鉴定^[7]。加样蛋白量为 60 微克。图 3 是圆盘电泳照片。从圆盘电泳计算得到比移值 (R_m , 即蛋白带泳动距离和溴酚蓝泳动距离之比)。带 3 的 R_m 值为 0.68, 带 4 的 R_m 值为 0.64。四个样品的 R_m 值相符, 且带 3 和带 4 为均一整齐的单带, 说明已将此二成分分离, 成为聚丙烯酰胺凝胶电泳均一样品。我们也曾用 Scan 400 型紫外光密度计 (Joyce LoebI 产品) 对电泳凝胶样品进行了扫描分析, 也说明带 3 和带 4 为均一单带(图 4)。将已分开的带 3 和带 4 再混合以后电泳, 结果与上样样品一致。

此外, 我们也做了酶作用产物的纸层析。当用带 3 和带 4 样品作用于淀粉时, 均只生成葡萄糖, 说明带 3 和带 4 都是葡萄糖淀粉酶。

四、讨 论

1. 我们制作的垂直板型凝胶制备电泳装置为适应制备样品的要求, 有三个特点: 一是阴极槽电极缓冲液到凝胶面之间不用滤纸或泡沫塑料桥, 而是通过与胶面平行的槽使电极缓冲液直接流下。这样可避免在滤纸桥上产生电压降, 以及缓冲液的升温 and 蒸发。这不仅降低了供电直流电压, 而且保证了缓冲系统的稳定。其次, 阴、阳极槽都有冷却水管, 使温度保持在 25℃ 以下。不加冷却时温度达 40℃ 以上。由于加了冷却水管, 尽管电泳过程中有较大电流, 仍可在室温下使用, 不致引起样品失活。充分冷却不仅防止失活, 还可使工作电压较高, 缩短电泳时间, 减少蛋白扩散, 分离效果好。如有必要, 还可以通入低温水或其它致冷液体, 温度还可再低。用水管冷却较金属板冷却的优点是可以对电泳过程进行观察, 制作也容易。第三, 凝胶全部浸在下槽缓冲液中, 这有助于冷却, 也

缩短了阴、阳极槽的液面差, 减少了对凝胶的压力及阴极槽的渗漏可能。此外, 在制备凝胶前用 1/1000 脱温处理胶槽, 对于胶面的水平很有作用。阴极材料我们试用银丝代替铂丝, 不影响性能。阳极不能用银丝, 有腐蚀。

2. 这套垂直板型凝胶制备电泳装置, 除用做制备外, 还可做为分析用, 只要在制作凝胶时加上样品槽模板即可^[4,10]。我们也曾试用过。

3. 从表中酶活结果看, 带 3 和带 4 的比活与上样液的比活基本一致, 但稍低些。这因为带 3 和带 4 都是葡萄糖淀粉酶, 通过分离只是把它们分开, 并不能提高比活。至于为什么比上样液的比活稍低, 我们曾考虑是否由于将这二组分分开后, 影响了它们的协同作用, 致使酶活降低。后来我们测定了带 3 和带 4 的混合样品比活, 与单个样品一致, 仍比上样液稍低。说明带 3 和带 4 之间没有协同作用。

参 考 资 料

- [1] 何秉旺等: 微生物学报, 第 13 卷, 1973 年, 第 2 期, 第 142—150 页。
- [2] 中国科学院微生物研究所酶结构与功能研究组: 微生物学报, 第 16 卷, 1973 年, 第 3 期。
- [3] 张树政等: 化学通报, 1973 年, 第 1 期, 第 30—38 页。
- [4] 中国科学院上海生物化学研究所代谢调节控制组: 生物化学与生物物理进展, 1974 年, 第 1 期, 第 52—55 页。
- [5] Roberts, R. M. et al.: *Anal. Biochem.*, **49**, 592—597, 1972.
- [6] Woodworth, R. C. et al.: *Anal. Biochem.*, **18**, 295—304, 1967.
- [7] Davis, B. J.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404—427, 1964.
- [8] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265, 1951.
- [9] G. L. Miller: *Anal. Chem.*, **31**, 426, 1959.
- [10] 莽克强等: 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 科学出版社, 1975 年。

(上接第 35 页)

6. 锰处理物候期高于对照和超声波处理组, 发芽率, 现蕾率较高而稳定, 但根生长量低于对照和超声波处理组。说明锰处理仍有可取之处, 是否可与超声波处理结合进行, 是一个值

得进一步研究的问题。

超声技术应用在中草药栽培中, 仅是开始, 还有许多问题需要进一步试验研究。但毕竟有了一个良好的开端, 并获得了可喜的苗头, 现予以整理报道, 希望能引起有关方面的重视。