

Lyphogel 浓缩剂的制备及其性能的鉴定*

樊汝恭 刘尔翔

(中国医学科学院基础医学研究所)

浓缩生物大分子溶液,常用冷冻干燥、透析、超滤膜过滤、电风扇吹等方法,而这些方法都需要较长的时间并具备一定的设备。尤其对小量样品,上述几种方法,都不同程度地存在一些缺点。因而 Lyphogel 的问世,就为浓缩工作带来很大的方便,1977年,我们参照关于 Lyphogel 性能的说明书及聚丙烯酰胺凝胶的各种聚合方法^[1,2,3],开始试制了 Lyphogel 浓缩剂现将浓缩剂的制备方法及其性能的鉴定结果介绍如下:

一、浓缩剂的制备

1. 材料

(1) 15% 丙烯酰胺浓缩剂 丙烯酰胺 90 克, N, N 亚甲基双丙烯酰胺 0.75 克, 四甲基乙二胺 0.172 毫升, 过硫酸胺 0.42 克, 加水到 600 毫升。

(2) 25% 丙烯酰胺浓缩剂 丙烯酰胺 150 克, N, N 亚甲基双丙烯酰胺 1.25 克, 四甲基乙二胺 0.172 毫升, 过硫酸胺 0.42 克, 加水到 600 毫升。

2. 方法

先用少量蒸馏水将丙烯酰胺及 N, N 亚甲基双丙烯酰胺溶解, 再加入四甲基乙二胺及过硫酸胺, 最后加蒸馏水到 600 毫升。然后将配好的上述溶液倾入一平底容器内, 置室温下或加温聚合。聚合后再老化数小时或过夜 (注意避免水份蒸发), 然后将聚丙烯酰胺凝胶切成小块, 放入底部有一定目数金属网的不锈钢加压筒内, 从金属网上面给予压力。凝胶被挤入水 (或 70% 酒精) 中, 分散成型。最后按下述不同方法处理:

(1) 直接干燥 不经任何处理直接干燥。

(2) 处理后干燥 处理方法有二, 第一种是流动水冲洗 24 小时后再用蒸馏水浸泡 24 小时 (中间换水数次), 第二种是挤入 70% 酒精中的凝胶经 80%、95% 及纯酒精各处理 2 小时。

经上述不同方法处理的凝胶放入 65℃ 烤箱内烤干。

二、浓缩剂性能的鉴定

1. 吸水性能的测定

我们首先对本组自己制作的浓缩剂进行了吸水性能的测定。方法是取 pH7.2 的磷酸缓冲液 (或蒸馏水) 3 毫升加 0.1 克浓缩剂, 置室温下, 30 分钟、1 小时、2 小时、4 小时、8 小时及 24 小时取样。每组各 3 管, 测量水量。对 6 种不同方法制备的浓缩剂进行了吸水量的测定, 结果见图 1 及图 2。

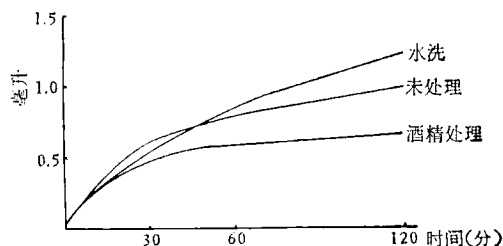


图 1 0.1 克不同方法处理的 15% 浓缩剂的吸水量

从图 1 可以看出, 用不同方法处理的丙烯酰胺浓度均为 15% 的浓缩剂, 吸水性能有差别。经流动水冲洗处理的浓缩剂, 吸水性能最大, 0.1 克浓缩剂 2 小时可以吸水 1.21 毫升。直接干燥的浓缩剂次之, 2 小时吸水量为 0.99 毫升。

* 承蒙北医附属人民医院检验科赠送 Lyphogel, 在此表示感谢。

经酒精处理的吸水量最小,为 0.66 毫升。

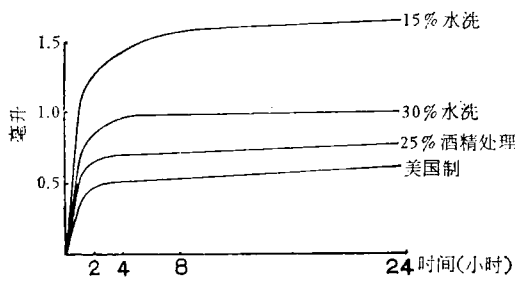


图 2 0.1 克不同浓缩剂的吸水量

从图 2 可以看出, 丙烯酰胺浓度不同的浓缩剂, 在相同的时间内, 吸水量也不同。从图 2 还可以看出, 同一浓缩剂, 随着使用时间的延长吸水量有所增加。但实验所用几种浓缩剂都有一个共同的趋势, 在加入浓缩剂后的最初 2 小时, 吸水较快, 此时浓缩剂基本达到饱和, 再延长时间, 吸水量不甚增加。

2. 释放物质质量的测定

我们发现, 浓缩剂的浸泡液, 在 280 毫微米时, 有紫外吸收峰, 这种物质是由浓缩剂释放到溶液中的。于是我们又作了下面的实验。取 pH 7.2 磷酸缓冲液(或蒸馏水) 3 毫升, 加入 0.1 克浓缩剂, 2 小时后取出浓缩剂, 用 pH 7.2 磷酸缓冲液(PB)或蒸馏水补足失去的水量。然后取此溶液测 280 毫微米的光密度。实验共用了 8 种不同的浓缩剂, 结果见图 3。

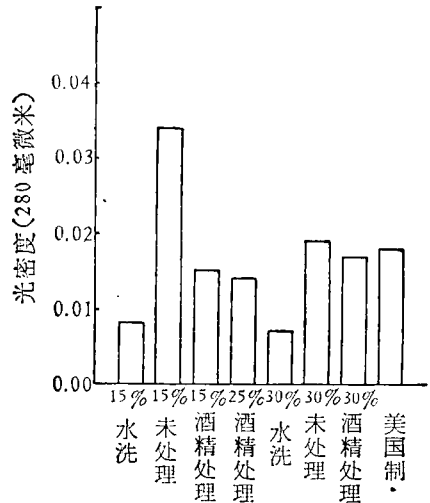


图 3 各种浓缩剂吸 PB 后, PB 的光密度测量结果

从图 3 可以看出, 同一浓度的浓缩剂经不同方法处理后, 释放物质的量不一样。丙烯酰胺浓度为 15% 或 30% 的浓缩剂, 在制备过程中, 经流动水冲洗后, 干燥所得浓缩剂, 释放物质的量最少。前者 280 毫微米波长光密度为 0.008, 后者为 0.017。经酒精处理的略高, 不经任何处理直接干燥的浓缩剂释放量最多, 为 0.034。

3. 吸收蛋白质质量的测定

我们选用了不同分子量的 5 种蛋白质 (见表 1), 对本组自制的浓缩剂进行了浓缩剂吸收蛋白量的测定。测定方法是, 取上述不同分子量的蛋白质, 用 pH 7.2 磷酸缓冲液(或蒸馏水) 分别配成一定浓度的溶液, 作为测试液。将 0.1 克各种类型的浓缩剂, 分别加于 3 毫升各种测试液中, 每组重复 3 管, 置室温下放置 2 小时后, 取出浓缩剂, 用 pH 7.2 磷酸缓冲液(或蒸馏水)补足失去的水量, 然后测 280 毫微米的光密度。根据所得结果按下述简化了的公式计算: $\{[\text{粘水量} \div (3 - \text{吸水量}) - 1] \times \text{对照 O. D.} + \text{实验 O. D.}\} \div \text{对照 O. D.}$ 。计算结果见表 1。

从表 1 可以看出不同浓度的浓缩剂吸入分子量不同的蛋白质。丙烯酰胺浓度为 15% 及 30% 的经流动水冲洗处理的浓缩剂, 均可将分子量 16 万的 IgG 及分子量 6.9 万的牛血清白蛋白排阻在外。而分子量小于 6.9 万的其它几种蛋白则不同程度的进入浓缩剂内。而丙烯酰胺浓度为 25% 经酒精处理的浓缩剂及美国生产的浓缩剂, 使分子量 2.6 万的本周氏蛋白 (K 型) 不能进入浓缩剂内。而分子量小于 2.6 万的蛋白可有部分进入浓缩剂内。

4. pH 及离子强度的测定

直接用 pH 计及电导率仪测量用浓缩剂浓缩过的磷酸缓冲液, 其 pH 值及离子强度无变化。

5. 对蛋白活性的影响

在上述实验的基础上, 到目前为止, 自制的浓缩剂已试用于乙型肝炎表面抗原, 乙型肝炎表面抗体, e 抗原, e 抗体, 抗 IgE 抗体, 大白鼠肾上腺多巴胺-β-羟化酶, 电鳗乙酰胆碱酯酶,

表 1 各种浓缩剂吸收不同蛋白的情况

浓 缩 剂 种 类	蛋 白 质		光 密 度		吸水量 (毫升)	粘水量 (毫升)	蛋白丢失 %	蛋白能否 进入*
	种 类	分子量	对照	实验				
15%丙烯酰胺酒精处理	IgG	16 万	0.59	0.542	0.76	0.15	1.43	—
	牛血清白蛋白	6.9万	0.31	0.294	0.76	0.15	1.53	—
	本周氏蛋白 (K型)	2.6万	0.64	0.58	0.67	0.1	5.08	+
	胰蛋白酶	2.3万	0.362	0.32	0.73	0.11	6.75	+
	细胞色素 C	1.1万	0.365	0.27	0.73	0.11	21.18	+++
15%丙烯酰胺流动水洗	IgG	16 万	0.59	0.542	0.947	0.2	2.46	—
	牛血清白蛋白	6.9万	0.31	0.273	0.947	0.2	2.19	—
	本周氏蛋白 (K型)	2.6万	0.64	0.521	1.13	0.2	7.9	+
	胰蛋白酶	2.3万	0.28	0.181	1.13	0.25	15.67	++
25%丙烯酰胺酒精处理	本周氏蛋白 (K型)	2.6万	0.663	0.628	0.66	0.092	1.34	—
	胰蛋白酶	2.3万	0.377	0.322	0.66	0.092	10.65	++
	细胞色素 C	1.1万	0.455	0.399	0.66	0.092	8.37	+
美 国 生 产	本周氏蛋白 (K型)	2.6万	0.663	0.626	0.5	0.1	1.58	—
	胰蛋白酶	2.3万	0.329	0.297	0.5	0.1	5.72	+
	细胞色素 C	1.1万	0.465	0.406	0.5	0.1	8.68	+

* 5%以下为 —, 5%—10%为 +, 10%—15%为 ++, 15%以上为 +++。

巨噬细胞移动抑制因子等的浓缩试验。结果良好,没有发现浓缩剂对蛋白的活性有何影响。

三、讨 论

1. 浓缩剂的制备方法与吸水量的关系

各种浓缩剂的吸水量并不相同,决定因素是浓缩剂本身的孔径大小。除丙烯酰胺浓度及交联剂的多少可决定其孔径大小外,在制备浓缩剂的过程中,同一配方使用不同的处理方法,吸水量也不同。之所以如此,可能是由于丙烯酰胺聚合后再经较长时间流动水冲洗,浓缩剂进一步吸水使体积膨胀,因而增大了原来的孔径。虽然经过干燥,体积回缩,但浓缩剂充分吸水后仍可恢复到干燥前的体积,所以吸水量增大。经酒精处理的浓缩剂,在酒精处理的过程中,酒精引起浓缩剂的收缩,同时也起到固定作用,所以当酒精处理的浓缩剂干燥后再吸水时,其体积只能恢复到酒精处理时的大小。又因固定作用,浓缩剂不能再膨胀,因而吸水量较小。而不

经任何方法处理,直接干燥的浓缩剂吸水后其体积与聚合时基本相同,或稍有膨胀。所以吸水量居于二者之间。因此,丙烯酰胺聚合后的处理方法,对吸水量的大小,有重要影响。

2. 不同浓度及不同处理方法的浓缩剂的使用范围

浓缩的目的,在于使溶液中的某种成分保留,而使溶媒或无关成分被吸去,因此浓缩物的分子量与选用浓缩剂的种类有密切的关系。不同浓度或不同方法处理的浓缩剂吸收蛋白的分子量大小有差别,这种差别与浓缩剂本身的孔径有关。浓缩剂中丙烯酰胺浓度低时则孔径大,反之则孔径小。聚合后处理方法的不同,也可以影响浓缩剂的孔径。根据表 1 的结果,我们试把浓缩剂分为二类。一类是适用于浓缩分子量 7 万以上的蛋白溶液。使用这类浓缩剂时,分子量在 7 万以上的各种物质均可排阻于浓缩剂之外。分子量小于 7 万的各种物质均可部分进入浓缩剂内。如丙烯酰胺浓度为 15%

水洗的浓缩剂即属于这一类。另外一类，是适用于分子量在 2.6 万以上的蛋白溶液，使用这类浓缩剂时，只有分子量大于 2.6 万的各种物质可排阻于浓缩剂之外，从而达到浓缩目的。丙烯酰胺浓度为 25%，经酒精处理的浓缩剂即属于后一类。

3. 浓缩剂的释放物质问题

不同方法处理的浓缩剂，都可释放出一些吸收紫外光的物质。这种物质可能是丙烯酰胺聚合过程中，没有完全聚合的丙烯酰胺，或是虽已聚合，但仍有极少的丙烯酰胺可溶于溶液中。作为一般临床检查或浓缩来说，这种物质的存在，对结果没有什么影响。此外，用流动水冲洗或酒精处理均还可使释放物质的量减少。

4. 对浓缩剂的评价

目前国内实验室常用的浓缩方法是高渗透析。由于用透析方法进行浓缩时，溶液中盐类的浓度也相应增高，因此在浓缩后还需要进行平衡。用透析法至少需要两天。在透析过程中，样品还要被透析袋粘去很多。如样品量很小时，则根本不能用透析袋来浓缩。如使用其它方法，则需要具备一定的设备条件。而使用浓缩剂时，则不需要任何设备。因为浓缩剂的量与吸水量成正比，所以只要按溶液需要浓缩的量，称取一定量的浓缩剂，放入需要浓缩的溶液中，2 小时取出即可。其次在浓缩过程中，溶液中的盐类随着水份一同进入浓缩剂内，所以

浓缩后，溶液中盐类的浓度不会增高，因此也就不需要再进行平衡。同时浓缩剂吸水饱和后，不再膨胀吸水，所以加入浓缩剂后，可静置过夜或更长时间，不影响浓缩的效果。另外浓缩剂还有选择性，可选用不吸 2.6 万或 7 万以上分子量的蛋白及其它物质的浓缩剂。溶液浓缩前后 pH 及离子强度也没有变化。从我们试用的情况来看，经过浓缩后，溶液中蛋白的活性没有受到破坏。浓缩剂经高压灭菌后，并不影响浓缩剂的性能。因此对于需要进行灭菌浓缩的溶液就很方便。对于需要浓缩的小量样品，如小于 1 毫升至数十毫升的样品最适用，大量样品也可使用。因为浓缩后取出浓缩剂时，浓缩剂表面要粘附一部分溶液，所以仍会丢失少量样品。

我们将美国生产的浓缩剂与本组自制的浓缩剂进行了比较。本组自制浓缩剂在吸水量、释放物质量、吸收蛋白的分子量大小及浓缩剂本身的韧性等方面，均与美国生产的相似，或优于美国生产的浓缩剂。

参 考 文 献

[1] 北京医学院微生物教研组：《免疫学与免疫化学技术》，1976。
[2] 袁静明：《凝胶层析法及其应用》，科学出版社，1975。
[3] Maurer, H. R.: Disc electrophoresis and related techniques of polyacrylamide gel electrophoresis. Second revised and expanded edition. 1971.

[本文于 1978 年 8 月 9 日收到]

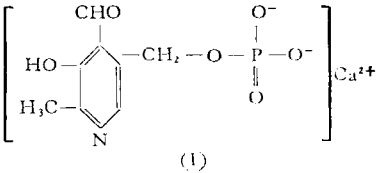
5-磷酸吡哆醛钙盐的合成*

方 丁 张 富 荣

(河北新医大学生化教研组)

5-磷酸吡哆醛钙盐 (Ca-PLP) 的化学名是 2-甲基-3-羟-4-甲酰-5-羟甲基吡啶 磷酸 钙盐 (I)，其结构式如右。

5-磷酸吡哆醛在生物体内是许多氨基酸脱氨酶和脱羧酶的辅酶，也是催化氨基酸转氨基作用的转氨酶的辅酶。近年来，不少作者报告，



* 刘广志，王淑凤两位同志参加部分实验。