聚焦电泳筛选异常 Hb[1]，由于等电聚焦电泳在蛋白质的分离上具有高度分辨力，可提高异常 Hb 的检出率，故值得推广应用。

三、小　结

聚丙烯酰胺凝胶等电聚集电泳分离血红蛋白具有高度分辨力，并有不染色能直接观察电泳行为，扫描，测定等电点等优点。

本文首次应用国产两性载体（Ampholine）分离血红蛋白获得满意效果。

本文异常血红蛋白样品系与南昌青云谱区妇幼保健所协作筛选中获得。江西医学院张和凯同志摄影，特此致谢。

参考文献

[1] Basset, P. et al.: *Blood*, 51, 4, 1978.
[2] Jeppson, J. O.: *Detection of abnormal hemoglobin by analytical thin-layer electrofocusing in Polyacrylamide gel*, LKB: 1977. 1—5.
[3] Brock, D. J. H. et al.: *Biochemical Genetic of Man*. 1972, 39—519, Academic Press, London, New York.
[4] 王继贵等编：《临床生化检验》湖南科学技术出版社，185，1981 年。

［本文于 1983 年 3 月 16 日收到］

组蛋白 H1⁰ 的制备凝胶电泳分离

张 绍 斌　　常 金 珍
（中国科学院生物物理研究所，北京）

组蛋白 H1⁰ 是一种富赖组蛋白[1,2]。它在细胞分裂不旺盛的哺乳动物组织中才含有，在 DNA 合成活跃的胸腺及培养的肿瘤细胞中却没有或很少。传代细胞经丁酸钠等诱导药物作用后可使 H1⁰ 出现[3]。目前多推测 H1⁰ 通过阻断 DNA 合成参与基因调控作用[4]。H1⁰ 这一不寻常的性质正日益受到重视，已发现某些组织和细胞的 H1⁰ 含有两个分子量十分接近的亚部，为探求其精确的结构和功能，需将它们完全分离。Pehrson[5] 等用 Bio-Gel P-100 连续两次柱层析未能将 H1⁰ 的两亚部分开，而 Smith[6] 和 D'Anna[7] 等用 Bio-Rex70 离子交换树脂将 H1⁰ 的两个亚部 $H1^0_a$ 和 $H1^0_b$ 基本分开。但从 Smith 的洗脱图看，$H1^0_a$ 和 $H1^0_b$ 两峰有明显的交叉。我们在丁酸钠诱导肿瘤 H1⁰ 的研究中，建立了能将猪肝 H1⁰ 两个亚部完全分开的分辨率高的简易制备凝胶电泳方法

一、材料与方法

1. 材料　丙烯酰胺、尿素等药物均为国产化学纯或分析纯。Bio-Gel P-100 为美国 Bio-Red 实验室制品。猪肝富赖组蛋白（以下称 LRH，含 H1 和 H1⁰）是本实验室所制。

2. 立式平板醋酸尿素聚丙烯酰胺凝胶制备电泳　电泳仪为北京科学仪器修配厂制品，电泳槽是本所工厂制。

（1）制胶　胶槽大小为 20×20×0.3 厘米。在两玻板间左、右，下三边垫以 0.3cm 厚 1cm 宽的玻璃条，间隙均涂以胶水，夹子夹紧 4 小时，胶水干固胶槽即成，凝胶体系主要按 Panyim 和 Chalkey[8] 法配制，用前将 A、B、C 三液混合于三角瓶中（凝胶终浓度为 12%，尿素 2.5 *M*），用水泵在充分振摇下抽气 2 分钟，然后胶液倾入胶槽并快速将胶槽放入水深稍低于胶槽高度

的水桶内(这可防止万一出现的滴漏,并在聚合后底边的玻条也易取出),胶面小心加水覆盖。

(2) 点样及电泳　猪肝组蛋白 LRH 5mg 溶于 15% 蔗糖-0.9*M* 醋酸溶液中,内加 1 滴次甲基蓝。样品槽深 1.5cm、内充以电极缓冲液 0.9*N* 醋酸,沿胶面小心注入样品液,滤纸搭桥,上正极下负极,电流 32 mA,共电泳 24 小时。

(3) 短暂染色　电泳毕,取下凝胶板块,浸入 0.1% 考马斯亮蓝 R_{250} 甲酸:醋酸:水(V:V:V = 50:10:40)染色液中染色约 1 分钟蛋白带即现,取出并洗去浮色,沿边界以刮胡刀小心分别切下 H1、$H1^0_a$ 和 $H1^0_b$ 三条胶带。

3. 电泳洗脱和样品透析　电泳洗脱装置主要分三部分,即上槽、下槽和电泳洗脱管。将 H1、$H1^0_a$ 和 $H1^0_b$ 胶条均截成 3 厘米左右长,分别装入电泳洗脱管,再将管注满凝胶液(配方同制备电泳),使样品胶条同胶液聚合成一体。聚合后,管下端扎以装有 1ml 电泳缓冲液的透析袋,并把扎紧的下口离开槽中缓冲液面 1cm,管上口扎以透析膜。以 8mA/管的电流电泳 8 小时,取下透析袋,开口端折迭扎紧,于三蒸水中放 4° 冰箱透析 48 小时,中间换水三次。

所得 H1、$H1^0_a$ 和 $H1^0_b$ 之中性蛋白水溶液在 751 型紫外分光光度计上测光密度。按公式

蛋白质浓度 (μg/ml) = 144 (OD_{215} − OD_{225})[9] 计算三个蛋白质的得量。此溶液可直接用来作荧光和圆二色光谱分析,冻干样品可用作电泳分析。

4. 盘状分析电泳　凝胶体系基本同制备电泳,只是尿素为 6.0*M*。电泳管 0.6×11 cm,预电泳 3 小时,电流 1.5mA/管电泳 5 小时。染色液同制备电泳,染色 1 小时,用醋酸-甲酸-水(10:10:80)扩散脱色。

5. Bio-Gel P-100排阻层析　层析柱1.8×150cm,以 0.01*N*HCl 平衡洗脱,上样品 12 mg。

二、结果和讨论

1. 制备电泳短暂染色图谱如图 1 所示、蛋白带清晰可见,H1,$H1^0_a$ 和 $H1^0_b$ 三条带边界清楚。

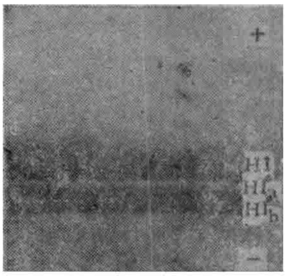

图 1　猪肝组蛋白 LRH 制备凝胶电泳图谱
(电泳条件见正文)

2. 图 2 是用本制备电泳方法得到的三个组蛋白的分析电泳图谱。可以清楚地看出,组蛋白 H1,$H1^0_a$ 和 $H1^0_b$ 均呈均一的电泳带,三者彼此没有交叉污染。表明确已达到完全分离。图 3 是猪肝 LRH 用 Bio-Gel p-100 排阻层析得到的两个峰(H1 和 $H1^0$)的分析电泳图谱。显然,H1 和 $H1^0$ 已被完全分开,而 $H1^0$ 的两个亚部则未能分离。

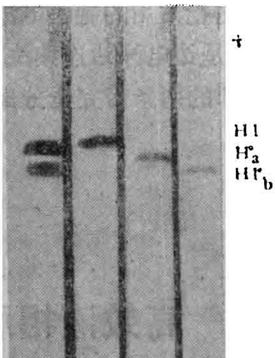

图 2　制备电泳产物的分析电泳图谱
1. 制备电泳前的待分离样品 LRH　2. 产物组蛋白 H1
3. 产物组蛋白 $H1^0_a$　4. 产物组蛋白 $H1^0_b$

3. 此方法的主要特点在于短暂染色显带,迅速精确切带,然后电泳洗脱。短暂染色的好处是既达到显示蛋白位置的目的,又没使大部分蛋白着色。电泳洗脱时只泳出未与染料结合的蛋白质(着色的蛋白可能与染料形成中性的复合物,在电场中不动),所以染色时间不能过长,以刚刚能看出蛋白带的位置为宜,所谓迅速

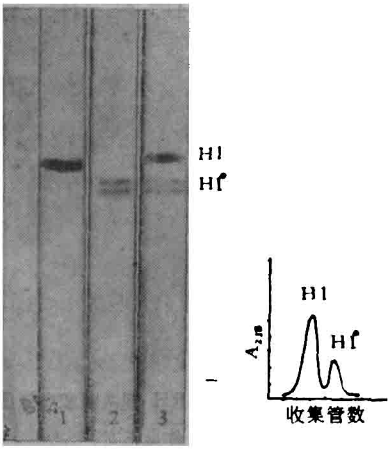

图 3 通过 Bio-Gelp-100 分离 LRH 洗脱峰（右下图）**和两峰的分析电泳图谱**（左图）

1. 第 1 峰 H1，2，第 2 峰 H1°（两亚部未分开）

3. 排阻层析前的 LRH。

精确切带是指在染色带显现后，马上小心地以薄刀片从带的间隙将三个带分别切下。这在原则上可以完全分离任何两个在凝胶电泳中十分接近的蛋白质。也就是说，聚丙烯酰胺凝胶电泳的分辨力有多高，本制备电泳方法的分离能力就有多大。这在常用的制备电泳仪[10]是难以做到的，因为它是边电泳边连续洗脱，这样，将电泳中紧密相邻的两条带完全分离显然是不可能的。

分辨率高，简单和不需复杂的设备是本方法的优点；不足之处是由于染色显带等原因造成的回收率偏低些（40—50%）。但所得分离样品通常作为氨基酸分析和光谱分析是够用的。

参 考 文 献

[1] Panyim, S. et al.: *Biochem. Biophys. Res, Comm.*, **37**, 1042, 1969.

[2] Pieler, C. et al.. *Eur. J. Biochem.*, **115**. 329, 1981.

[3] D'Anna, T. A. et al.: *Biochemistry*, **19**, 4331, 1980.

[4] Smith, B. T. et al.: *FEBS Letters*, **112**. 42, 1980.

[5] Pehrson, J. R. et al.: *Biochemistry* **20**, 298, 1981.

[6] Smith, B, J. et al.: *FEBS Letters*, **110**. 20. 1980.

[7] D'Anna. J. A. et al.: *Biochemistry*, **20**, 4501 1981.

[8] Panyim, S. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **130**, 337, 1969,

[9] Schleif, R. F. et al.: *Practical Methods in Molecular Biology*, 74, 1981, Springer-Verlag, New York.

[10] Macpherson, A. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **104**, 574, 1965.

［本文于 1983 年 3 月 16 日收到］

高效液相层析（HPLC）用乙腈的纯化

俞 鹤 年 徐 佐 杰

（中国科学院上海生化所，上海）

近年来迅速发展起来的高效液相层析新技术，具有准确、快速、超微量等优点。乙腈作为流动相和其他优良的固定相（担体）一样对于提高和发挥高效液相层析效能起着关键性的作用。由于商品乙腈含杂质较多，限制了它的应用范围，文献资料介绍的近三十种纯化乙腈的方法[1-3]，除了经济、纯度及产率诸方面原因外，限于国内仪器和试剂条件，尚没有一种方法适应我们制备 HPLC 规格的乙腈供使用。

本文全部采用国产试剂级乙腈作原料，经过活性炭和酸性氧化铝为主的吸附法可得气相色谱纯的产物。其紫外吸收透光率在 200—300nm 波长时与西德 E.Mecck. for Chromatography Lichrosolv® 产品相当。总产率约 42—48%。用这种方法纯化的乙腈已成功地应用在实验室分离分析多种有机化合物。