

经验交流

膜蛋白研究中 Triton X-100 的置换

丰 美 福

(中国科学院北京动物研究所, 北京 100080)

关键词 膜蛋白, 亲和层析, Triton X-100 置换

在生物膜结构与功能的研究中, 经常会用到 Triton X-100, 它是一种强的表面活性剂, 其疏水端能插入膜脂内, 把膜脂与膜蛋白隔离开, 其亲水端能与膜蛋白结合, 从而使膜蛋白增溶溶解, 提取效果很好。但是, Triton X-100 本身很难除尽, 尤其是与膜蛋白紧密结合之后, 它残存在样品中, 会给下一步试验带来不良的影响。本文介绍用易透析的胆酸钠盐从吸附膜蛋白的层析柱上, 逐步置换掉 Triton X-100 的方法, 并经红血球凝血试验证明此法是简易有效的。

材 料 与 方 法

一、膜蛋白的提取, 亲和层析和超滤浓缩

1. 将约 10^8 小鼠淋巴瘤细胞在含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的磷酸盐缓冲液¹⁾ (PBS $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$, pH 7.0—7.4) 中洗 3 次后, 加入 4ml 冰冷溶膜介质: PBS $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$, 1% Triton X-100, 2 mmol/L PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride), 0.02% NaN_3 , pH 7.0—7.4, 于 4℃ 剧烈搅动 30min, 然后 100000g 离心 30min。收集上清, 按 Bradford 法测定蛋白含量^[1], 冻存于 -70℃。

2. 取 2ml 膜蛋白提取液, 加入 $10\mu\text{l}$ ^{125}I -ovalbumin (10^8 cpm/ml, 在 PBS $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ 中) 为内标, 进行放射性监测。二者混匀后加样于 ConA-Affi gel 15 (Bio-Rad) 柱上, 柱床体积为 4ml, 平衡液为 PBS $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$, 流速约为 20 ml/min。然后采用二种不同的方法处理柱子:

1) 用约 5 倍柱床体积的 PBS $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$, 1% Triton X-100 冲洗柱子, 去除未结合的游离膜蛋白, 流速为 1 ml/min。洗脱液为 300mmol/L α -甲基甘露糖苷 PBS $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$, 1% Triton X-100。分部收集每 0.5ml (各部分取 0.1 ml 监测 ^{125}I 含量)。最后用约 300ml 的 PBS $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$, 1% Triton X-100, 0.02% NaN_3 , 彻底冲洗柱子, 以除尽 α -甲基甘露糖苷。

2) 用约 3 倍柱床体积的 PBS $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$, 1% Triton X-100 冲洗柱子; 然后用相同量的 PBS $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$, 1:1 1% Triton X-100/0.2% 胆酸钠冲洗柱子; 再用相同量的 PBS $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$, 1:2 1% Triton X-100/0.2% 胆酸钠冲洗; 依次类推 1:3; 最后用 PBS $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$, 0.2% 胆酸钠冲洗。洗脱液为 300mmol/L α -甲基甘露糖苷, PBS $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$, 0.2% 胆酸钠。最后, 同上彻底冲洗柱子。

3. 合并从 ConA-Affi gel 15 柱上洗脱下来的高峰部分 (可冻存在 -70℃), 各用 Amicon YM 10 膜 (截留分子量为 1 万) 超滤浓缩约 30 倍。

二、含膜糖蛋白的人工脂质体的制备

采用透析法制备。即将 400 μg 磷脂酰胆碱, 150 μg 胆固醇溶于 100 μl 2:1 氯仿甲醇中, 在 N_2 下干燥后, 溶于 50 μl 10% 胆酸钠中, 分别加入 0.5ml 用上述不同方法从柱上洗脱下来, 并经超滤浓缩的膜蛋白样品。然后, 选用以下任一种方法制备脂质体。

1. 在 4℃ PBS $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$, 0.2% 胆酸钠中透析 1 天, 再在 PBS $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ 中透析 2 天。

2. 同上。但后 2 天的 PBS $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ 中加入 Bio-Beads SM-2 2g/L 一起透析。

3. 同步骤 2。但透析后样品再过一根 Sephadex G 25 凝胶过滤柱。柱床体积 8 ml, 洗脱液为 PBS $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$, 0.5% 胆酸钠。合并洗脱高峰, 于 PBS $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ 中再透析 2 天。

4. 在 4℃, PBS $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ 中透析 3 天。

三、血凝试验

取 1ml 豚鼠无菌压积红血球, PBS $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ 洗 3 次后, 制成 2% (V/V) 红血球悬液备用。

向圆底 96 孔板的第 1 孔内加入 10 μl 经不同处理制备的人工脂质体样品, 以及 40 μl PBS $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ 。

1) 磷酸盐缓冲液: 0.01 mol/L 磷酸盐和 0.15 mol/L NaCl 。

表 1 不同处理的膜蛋白样品的凝血反应

样品处理	凝 血 作 用											
	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240
1.洗柱 PBS $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$, 1% Triton X-100 洗脱 PBS $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$, 1% Triton X-100 300m mol/L α -甲基甘露糖苷 透析 1) PBS $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$, 0.2%胆酸钠 1天, PBS $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ 2天 或 2) 同上 1天 PBS $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ + Bio-Beads SM-2 2天 或 3) 同 2), 加 Sephadex G25 柱, PBS $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ 2天	++++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	±	-	-
	++++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	±	-	-	-
	++++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	-
2.洗柱 PBS $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$, 1% Triton X-100, PBS $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ 1:1 Triton X-100 0.2% 胆酸钠, PBS $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ 1:2 Triton X-100 0.2% 胆酸钠, PBS $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ 1:3 Triton X-100 0.2% 胆酸钠, PBS $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ 0.2% 胆酸钠, 洗脱 PBS $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$, 0.2% 胆酸钠, 300m mol/L α -甲基甘露糖苷 透析 PBS $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ 3天	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.对照 PBS $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

向第 2 到第 12 孔内加入 25 μ l PBS $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$. 然后按倍比法稀释, 制成一系列含不同浓度的人工脂质体液。

再向第 1 到第 12 孔内加入 25 μ l PBS $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$, 及 25 μ l 2% 豚鼠红血球, 总体积为 75 μ l. 于平板振荡器上振动 30s 后, 在 4℃ 下培育 1h. 观察并记录下红血球的凝血反应。

结 果 与 讨 论

包含经不同处理所得膜糖蛋白样品的人工脂质体对红血球的凝血效应见下表。

由表明显可见: 如果用 Triton X-100 提取和洗脱下来的膜蛋白样品来制备人工脂质体, 那么无论怎样透析, 均不能除尽 Triton X-100, 从而引起红血球的凝血反应。但是, 如果先采用易透析的胆酸钠盐的不连续梯度来置换 Triton X-100, 然后再用在 PBS $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$, 0.2% 胆酸钠中的 300m mol/L α -甲基甘露糖苷来洗脱膜糖蛋白, 那么由此制备的人工脂质

体样品则很容易地在 PBS $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ 中将表面活性剂透析掉, 从而不再引起红血球的凝血反应。这一结果充分说明这个方法是可行的和有效的。并且从多次实验来看, 方法的重复性亦较好。当然有报道介绍另外一些方法来去除 Triton X-100, 例如: 将样品过一根 Bio-Beads SM-2 的柱子^[2], 或使用 Extracti-Gel G 等^[3]。但这些方法要想除尽 Triton X-100, 也不是很容易, 且成本均较高, 相比较之下, 此法是可取的。另外, 如果无需制备人工脂质体, 那么可以将洗脱下来的膜蛋白样品直接透析一下使用, 那就更简单一些。

参 考 文 献

- 1 Bradford M M. *Analytical Biochem*, 1976; **72**:248
- 2 Holloway P W. *Anal Biochem*, 1973; **53**:304
- 3 Necessary P C et al. *J Biol Chem*, 1984; **259**:6947

[本文于 1989 年 12 月 31 日收到,

1990 年 8 月 4 日修回]