

法和手段都有一定的局限性,但是,在一定范围内,用固相核酸分子杂交技术,分析比较肿瘤细胞核酸的变化,能为癌变本质的探讨提供一些有一定参考价值的数据。

参 考 文 献

[1] 张玉砚等《生物化学与生物物理进展》1975年,第3期,第20—24页。

- [2] Gillespie, D. et al.: *J. Mol. Biol.*, 12, 829, 1965.
 [3] Getz, M. J. et al.: *Biochim. Biophys. Acta.*, 287, 485, 1972.
 [4] Bonner, J. et al.: *Biochemistry*, 6, 3650, 1967.
 [5] Church, R. B.: *Molecular techniques and approaches in developmental biology*, 1973. P. A. Wiley-Interscience Publication.
 [6] Drews, J. et al.: *J. Biochem.*, 3, 284, 1968.

[本文于1978年5月24日收到]

等电聚焦载体两性电解质的合成

中国科学院微生物研究所酶结构与功能研究组

等电聚焦是一种分离和鉴定蛋白质的新技术。它能迅速而准确的测定蛋白质的等电点;并根据蛋白质等电点的不同而把蛋白质混合物中各个成份互相分离开来。此技术要求在正、负极之间有一个从酸到碱连续变化的pH梯度。形成这种梯度的物质称为载体两性电解质(瑞典LKB厂专利商品名为“Ampholine”),它实际上是一系列多氨基多羧酸的混合物。对此载体两性电解质要求^[1]:

(1) 能在电场中形成一个均匀、连续而稳定的pH梯度。这些载体两性电解质pI值之差要小于0.05pH单位,才能分辨pI值很接近的蛋白质。

(2) 在等电点时要有足够大的电导性,而且在整个电场中的电导要均匀。

(3) 在280毫微米处有较低的光吸收,1%溶液的光密度值要低于0.05,使不干扰蛋白质洗脱峰的测定。

(4) 要易溶于水,其分子应明显亲水,以免与蛋白质的疏水键发生作用。

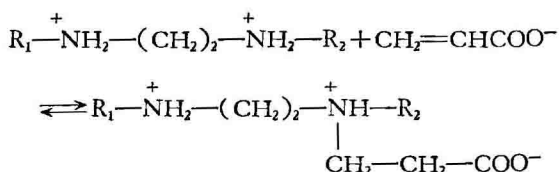
(5) 在等电点时要有足够的缓冲能力。即使有0.5%的蛋白质存在,也不会改变pH。也就是说,在等电点处至少有0.3微克当量/毫克pH的缓冲能力(即于每毫克载体中加入0.3微克当量的碱或酸,pH改变为1)。

(6) 要有比较低的平均分子量,以便于把

蛋白质从载体两性电解质中分离出来。

1966年, O. Vesterberg 人工合成了载体两性电解质^[2-4]。它在等电聚焦中形成自然pH梯度,基本满足了对载体两性电解质的上述要求,从而大大推动了等电聚焦技术的应用。

用多乙烯多胺与丙烯酸加成,生成一系列多氨基多羧酸的混合物^[4]:



这里R₁和R₂是氢或带有氨基的脂肪基。由于α-β不饱和双键和脂肪胺上不同部位的一级氨基或二级氨基间发生加成,而且由于酸和胺比例的不同,则形成一系列具有不同氨基与羧基比例的异构物和同系物的混合物,从而形成一系列具有不同等电点(pI)值的多氨基多羧酸混合物。它们的pI值随着羧基与氨基比例的不同而分布在pK₃(大多数羧基的pK值)到pK₁₀(大多数碱性氨基的pK值)之间的不同区间。

我们用丙烯酸分别与四乙烯五胺及三乙烯四胺进行加成反应,合成了pH3—10及pH3—6两种载体两性电解质。并用密度梯度聚焦法制备了pH3.5—4.5窄范围的载体两性电解质。并

与相应 pH 范围的瑞典 LKB 厂产品进行了性能比较。现将主要结果报道如下。

一、仪器和试剂

等电聚焦柱(110 毫升),中国科学院微生物研究所工厂参照 LKB 厂产品制成,构造有改进。

紫外及可见分光光度计 SP700C,英国 Unicam 公司产品。

丙烯酸,化学纯;三乙烯四胺,工业品;四乙烯五胺,荷兰制品。

Ampholine, pH3.5—5 (8/75, Batch10) 及 Ampholine, pH3.5—10 (11/71, Batch 43) 均为瑞典 LKB 厂产品。

二、实验方法和结果

1. 载体两性电解质的合成

在避光、通氮下,用减压蒸馏进行原料提纯:丙烯酸,加 1% 对苯二酚,85℃ 水浴,25 毫米汞, b. p 62—68℃。三乙烯四胺,20 毫米汞, b. p 150—190℃。四乙烯五胺,20 毫米汞, b. p 203°—205℃。

(1) 加成反应 一个四口瓶,加水封搅拌,外侧三个口分别放温度计(水银球部分浸于反应液面下)、滴液漏斗和回流冷凝管(从管中心通入一个长玻璃管,下端插入反应液内,以备通氮)。将整个装置用黑布罩上(或在暗室中进行)。装置如图 1 所示。

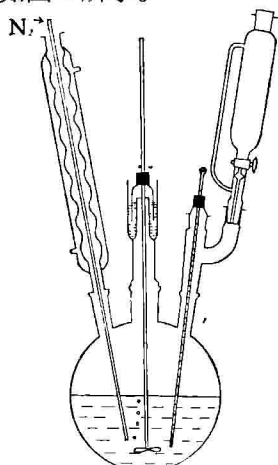


图 1 载体两性电解质合成装置

加入 84 毫升四乙烯五胺 50% 水溶液(内含 1—2 克 NaH_2PO_4)于四口瓶内,烧瓶外用水浴加热。开动搅拌、通氮气。待反应液温度升到 55℃,开始滴加 80 毫升丙烯酸的 50% 水溶液。胺与酸的克分子比为 1:2.5。滴加过程冒白烟,为放热反应,滴加过程中要使反应体系不超过 55℃,约 1 小时可滴完。加毕,提高反应温度至 80℃,搅拌、通氮、避光反应 5 小时,不时调节温度($80^\circ \pm 3^\circ\text{C}$),保持反应液微沸。反应毕,便得到 pH3—10 载体两性电解质的 50% 水溶液。

为了检验反应是否完全,将反应液用 KMnO_4 滴定:取 0.5 毫升反应液,加入 10 毫升蒸馏水,用 2N HCl 调 pH 至 2.0,用 5—10 毫升乙醚抽提,再蒸去提取液的乙醚,残余物溶于 2 毫升蒸馏水,用 0.01M KMnO_4 滴定。4.5 小时加成反应液即呈阴性,表明全部丙烯酸已反应完全。

以三乙烯四胺和丙烯酸进行加成反应,合成 pH3—6 载体两性电解质,胺与酸的克分子比为 1:3。即:30 毫升三乙烯四胺 50% 水溶液(含 1 克 NaH_2PO_4),滴加 42 毫升丙烯酸 50% 水溶液。反应条件同上。

(2) 产物提纯 将所合成之载体两性电解质在通氮、避光下,用沸水浴减压蒸干至糖浆状。将此浆状物加原体积 2.5 倍之甲醇(即反应物 100 毫升,加 250 毫升甲醇),通氮、避光下,回流溶解。将醇溶解物用热滤漏斗在暗处过滤,滤去醇不溶物。再在通氮、避光下减压蒸去甲醇,得黄色糖浆状物。将此浆状物用适量水溶至约 25% 浓度,得纯化后的载体两性电解质(淡黄色)。

(3) 脱色 将纯化后的载体两性电解质,趁热(约 70℃)用活性炭脱色,可得无色的产品。

取少量样品,用减压蒸干法(蒸至浓稠糖浆状)测得含量,再据此含量用蒸馏水将原产品调至 20% 浓度。总产率约 70% (产品干物重占投料量的百分数)。将此产品置棕色瓶内,上复一层氮气,再用橡皮塞密封,同时以注射器抽取。将产品置冰箱保存,2—3 年内性能不变。

2. 性能鉴定

将 pH3—10 产品与 LKB 厂 pH3.5—10 Amp-holine 在同样操作条件下对照进行实验; 将 pH 3—6 产品与 LKB 厂 pH3.5—5 Ampholine 在同样操作条件下对照进行实验。

(1) 吸收光谱 均用 1% 浓度, 用 SP700 C 紫外及可见分光光度计测定。用 1 厘米光径比色池, 以 3 厘米/分的纸速自动记录。进行 222 毫微米—400 毫微米间透光率的比较。结果如图 2、图 3 所示, 在 280 毫微米处, 透光率基本相同; 而在 260 毫微米处透光率低于 LKB 产品。

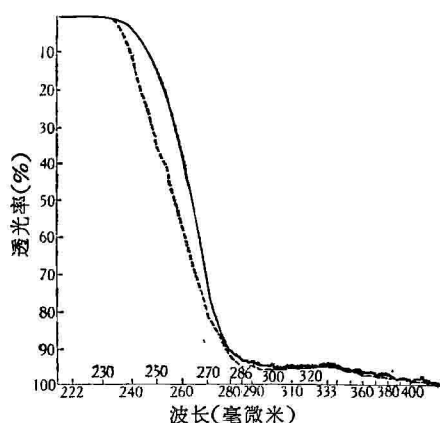


图 2 合成载体两性电解质 (pH3—10) (——) 和瑞典 LKB 厂 Ampholine (pH 3.5—10) (.....) 的透光率 (1% 浓度)

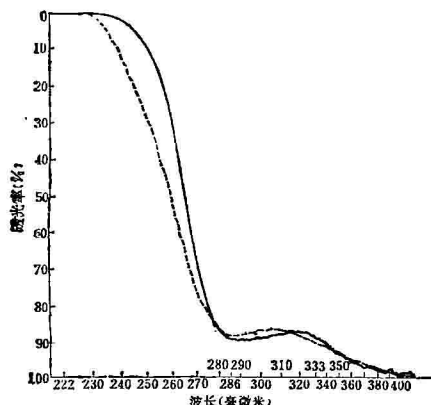


图 3 合成载体两性电解质 (pH3—6) (——) 和瑞典 LKB 厂 Ampholine (pH3.5—5) (.....) 的透光率 (1% 浓度)

(2) 空白电聚焦 按标准程序^[5]进行。用甘油做密度梯度物。合成产品 (20%) 加量 6.4 毫升; Ampholine (40%) 加量 3.2 毫升。700 伏,

4°C 聚焦 24 小时。放柱时流速 2.5 毫升/1.5 分 (收集 1 管), 全柱约 1 小时 15 分钟放完。平板式自动记录仪灵敏度用 10 毫伏, 纸速 120 毫米/小时, 可得紫外吸收自动记录图谱, 如图 4a, 4b 及 5a, 5b, 所示。

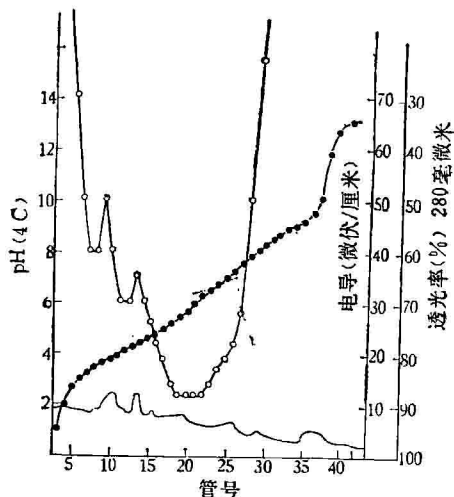


图 4a 合成载体两性电解质 (pH3—10) 的空白电聚焦
pH ●——● 电导 ○——○ 透光率——

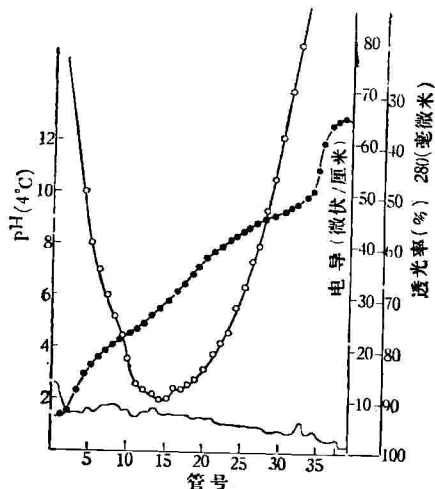


图 4b 瑞典 LKB 厂 Ampholine (pH3.5—10) 的空白电聚焦
pH ●——● 电导 ○——○ 透光率——

(3) 缓冲能力 将每相邻两管合并, 每管 5 毫升, 用标准碱滴定各管, 使 pH 升高 1 单位。用每毫升样品所消耗碱的微克当量数表示缓冲能力。结果如图 6、7 所示。我们合成的产品的缓冲能力, 略低于 LKB 厂产品。

(4) 用聚焦法制备 pH3.5—4.5 载体两性电

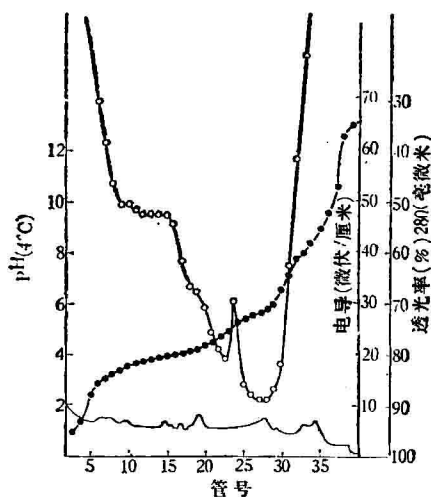


图 5a 合成载体两性电解质 (pH3—6) 的空白电聚焦

pH ●——● 电导 ○——○ 透光率——

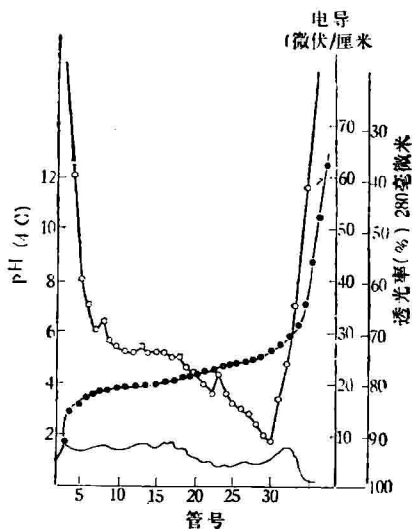


图 5b 瑞典 LKB 厂 Ampholine (pH3.5—5) 的空白电聚焦

pH ●——● 电导 ○——○ 透光率——

解质 将 pH 3—6 载体两性电解质 (20%), 二倍于常规用量做空白电聚焦:

重液: 20 克甘油 + 10 毫升载体两性电解质, 再加水至 60 毫升。

轻液: 3 毫升载体两性电解质加水至 60 毫升。

700 伏, 4°C 聚焦 24 小时后, 测各级分的 pH。合并 pH 3.5—4.5 的各级分, 即得 pH 3.5—4.5 之载体两性电解质 32 毫升。将此载体两性电解质进行空白电聚焦, 以鉴定其性能:

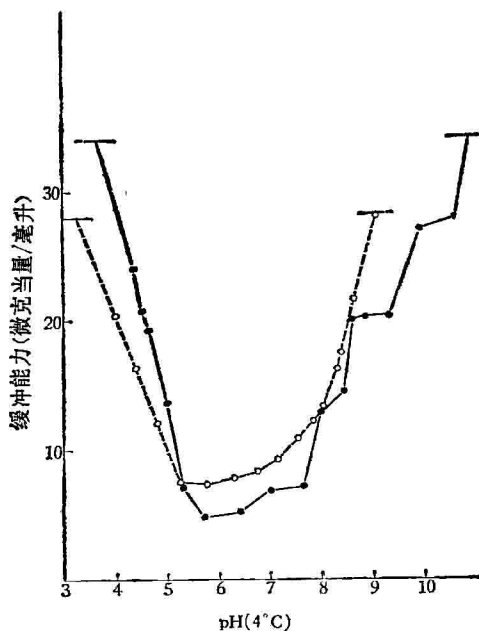


图 6 pH3—10 载体两性电解质和 LKB 厂 pH3.5—10 Ampholine 的缓冲能力

本所合成 ●——● LKB 厂 ○——○
图中上方横虚线表示截取部分, 图 7 同

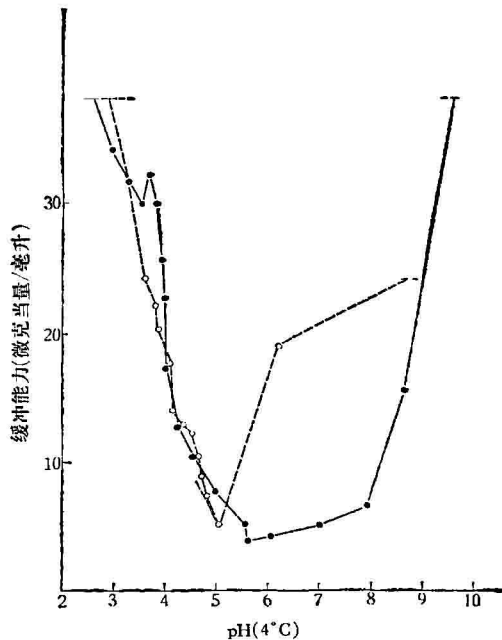


图 7 pH3—6 载体两性电解质和 LKB 厂 pH3.5—5 Ampholine 的缓冲能力

本所合成 ●——● LKB 厂 ○——○

重液: 20 克甘油 + 24 毫升 pH 3.5—4.5 级分 + 0.3 毫升 pH 3—10 载体两性电解质, 加水至 60 毫升

轻液: 8 毫升 pH3.5—4.5 级分 + 0.1 毫升 pH3—10 载体两性电解质, 加水至 60 毫升

700 伏, 4°C 聚焦 24 小时后, 自动记录 280 毫微米处的透光率, 分段收集, 并测各级分的电导和 pH。结果如图 8 所示, 可见有高的透光率、连续的 pH 梯度, 但在 pH4 处电导性不够均匀。

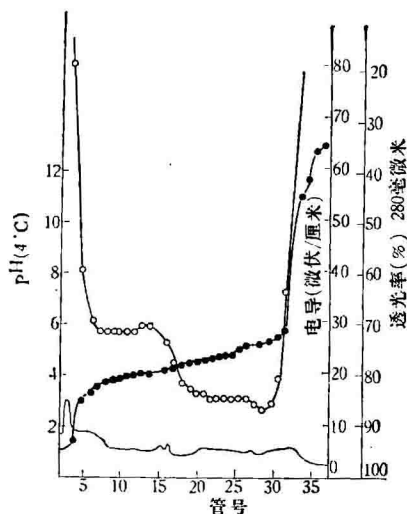


图 8 用聚焦法制得的 pH3.5—4.5 载体两性电解质的再聚焦
pH ●——● 电导 ○——○ 透光率——

三、讨 论

1966 年 O. Vesterberg 人工合成载体两性电解质并于 1967 年由瑞典 LKB 厂商品化。1973 年 S. N. Vinogradov 等发表一篇有关载体两性电解质合成的报告, 但只用凝胶电聚焦鉴定其性能, 未报告光吸收、缓冲能力、电导性能等情况^[6]。

此外, 对 (pH3—6) 及 (pH3—10) 两种载体两性电解质, 各进行三次合成, 有较好的重复性。另外, 还用国产四乙烯五胺进行两次 pH3—10 载体两性电解质的合成, 结果基本相同。在工作中我们得出以下几点经验:

1. 用四乙烯五胺进行加成反应比用其它寡乙烯寡胺所得到的 pH 梯度要好。四乙烯五胺与丙烯酸的克分子比以 1:2.5 到 1:3 较好。文献^[6]认为用五乙烯六胺最好, 我们没有找到这

一试剂, 曾经用多乙烯多胺(工业规格)经过减压蒸馏得出的低沸点馏份进行合成, pH 梯度较好, 但颜色太深。

2. 用乙二醇或二乙烯三胺等进行合成时, pH 梯度往往不好, 呈阶梯状, 又因丙烯酸对氨基的比例较大, 往往在 pH4.2—4.5 处出现特有的紫外吸收峰, 有可能是未反应时丙烯酸所引起的。为了形成较平滑的 pH 梯度, 要求两性载体中异构物越多越好。据文献^[6]报道, 三乙烯四胺有 7 个异构物, 四乙烯五胺有 12 个异构物, 而五乙烯六胺有 20 个异构物, 故低分子量的胺不适用, 氨基与羧基的比例以 2:1 较好。

3. 在合成过程中通氮避光是很重要的, 可避免胺类氧化生成有色物质, 反应时保持微沸。丙烯酸中不必加对苯二酚, 防止引进高的紫外吸收, 但必须在重蒸馏后立即使用, 防止聚合。

4. 用甲醇提取法进行提纯, 可以去掉一些有紫外吸收的杂质, 处理一次即可。用活性炭脱色 2—3 次即可, 脱色次数太多会大大降低产率。

5. 在用密度梯度等电聚焦法时要求两性载体最好无色, 否则干扰测定。但用凝胶等电聚焦时则无妨碍, 因为这些有色物质本身也是两性载体, 它们的存在可以提供更平滑的 pH 梯度。

参 考 文 献

- [1] O. Vesterberg: Isoelectric focusing and Iso-tachophoresis, Ed. by Nicholas Catsimpoalas 1976, p. 50.
- [2] O. Vesterberg et al.: *Acta Chem. Scand.*, **20**, 820, 1966.
- [3] O. Vesterberg: Mixture of Carrier Ampholytes and Method of Preparation, British Patent No. 1106818, July 17, 1968.
- [4] O. Vesterberg: *Acta Chem. Scand.*, **23**, 2653, 1969.
- [5] 张树政、何忠效: 化学通报, 1974 年, 第 4 期, 第 42 页.
- [6] S. N. Vinogradov et al: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **54**, 501, 1973.

[本文于 1978 年 3 月 10 日收到]