

亲和电泳

莫汉庆 孙册

(中国科学院上海生物化学研究所)

亲和电泳是把电泳和生物分子间专一相互作用结合在一起的一种分离、分析技术,它兼有凝胶电泳与亲和层析的长处,能够快速、微量地分析蛋白质。其原理是让蛋白质混合物在一个含某种固相化配基的载体中进行电泳,该配基能够与蛋白质混合物中的一种(或一些)组分专一结合,而与其它组分分离。现广泛应用于生化研究与临床检验的免疫电泳就是一种亲和电泳。关于免疫电泳早已有许多专著作了介绍,这里不再赘述。本文主要介绍利用各种凝集素和糖(或糖蛋白)分子之间专一作用的亲和电泳。

1969年 Entlicher 等人发现^[1],在有 D-甘露糖, D-葡萄糖存在的情况下,豌豆凝集素(pea lectin)和扁豆凝集素(lentil lectin)的淀粉凝胶电泳的迁移率明显地增加。这是因为这二种对 D-葡萄糖和 D-甘露糖专一的凝集素在淀粉凝胶电泳时,都会被淀粉凝胶(D-葡萄糖的聚合体)所滞留;加入游离的 D-甘露糖和 D-葡萄糖后,这些“半抗原”分子(haptenic molecules),占据了凝集素上的糖结合部位,就能够消除淀粉凝胶对凝集素电泳迁移率的影响。

1972年 Takeo 和 Nakamura 用含糖原的聚丙烯酰胺凝胶电泳,定量测定了兔骨骼肌、肝、脑等组织的磷酸化酶与固相化兔肝糖原之间相互作用的强弱^[2]。

至今已建立了二种不同的亲和电泳的系统。

一、Børg-Hansen 系统

由 Børg-Hansen 等人建立的。这种方法与

免疫电泳雷同,只是用凝集素取代了抗血清而已。让糖蛋白在含固相化或游离凝集素的琼脂糖凝胶上电泳,象抗原与相应的抗体在免疫电泳时形成免疫沉淀线一样,糖蛋白与相应的凝集素也形成糖蛋白-凝集素复合物,可以检测出来。在具体做法上,基本与免疫电泳一样,发展为火箭亲和电泳、交叉亲和电泳、线亲和电泳,以及把免疫电泳和亲和电泳合而为一的交叉免疫-亲和电泳等。

1. 火箭亲和电泳^[3,4]

可用来测定蛋白质混合物里,对某一个凝集素专一的糖蛋白,从而推测该糖蛋白糖链末端(或糖链中)是否含某一(或某些)糖基。电泳是在含某一种凝集素的琼脂糖凝胶中进行的,蛋白质混合物里的糖蛋白与该凝集素专一结合,形成火箭形状的沉淀,很容易鉴定出来。根据火箭的高度,还可大致了解该糖蛋白的数量。由于亲和电泳利用凝集素与糖蛋白糖链之间的专一相互作用,糖链部分比肽链部分要稳定得多,不易受各种变性剂的影响,所以即使蛋白部分已受热、酸或去垢剂的作用,完全变性,仍能用火箭亲和电泳来鉴定和定量糖蛋白。

含凝集素琼脂层的制备 将溶于适当缓冲液中的 1%(W/V) 琼脂糖置沸水浴中使其熔化,待冷却至 60℃ 左右,加入适量的溶于同一缓冲液中的凝集素(一般凝集素溶液的体积与琼脂糖溶液的体积比不大于 1:10),充分混匀后,迅速浇在水平放置的、洁净的玻璃板上,使琼脂层厚度约为 1.5 毫米,凝集素浓度约为 20—150 微克/厘米²(浓度取决于样品中糖蛋白的浓度,正如在免疫电泳中,抗原、抗体的量匹配

恰当,才能形成清晰的免疫沉淀线)。待琼脂糖凝结后,在琼脂板的一侧打一排孔径、间距一律的圆孔(图 1),加入样品,立即电泳,以免样品扩散,影响火箭形状。

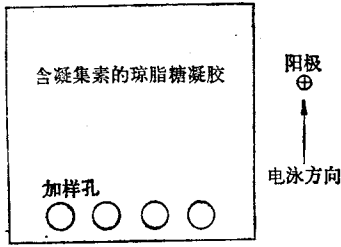


图 1 火箭亲和电泳示意图

缓冲液可采用巴比妥-盐酸缓冲液(92mM 5,5-二乙基巴比妥钠-盐酸缓冲液, pH8.6) 或用 Tris-巴比妥缓冲液(73mM Tris, 24.5 mM 5,5-二乙基巴比妥钠, 0.36mM 乳酸钙, 0.2mM 叠氮钠,用盐酸调 pH 到 8.6)。

电泳条件 样品端接阴极,电压为 1.5 伏/厘米,电泳过夜。

电泳完毕后,用一层滤纸把琼脂板覆盖起来(避免气泡,否则凝胶易开裂),再铺上 1 厘米厚的吸墨水纸,压上面积大于琼脂板、表面平整光滑、有足够重量的物件;15—20 分钟后,换滤纸和吸墨水纸,再压 15—20 分钟,使琼脂糖凝胶成为一层薄膜;然后轻轻地揭去滤纸,将琼脂糖凝胶连同玻璃板一起浸泡在生理盐水内,15 分钟换液一次,浸洗 2—3 次,以除去过剩的凝集素和样品中的杂蛋白。再换蒸馏水,浸洗 15—20 分钟,除去氯化钠;仍用滤纸,吸墨水纸压 15 分钟,置恒温烘箱(60℃)烘干。染色 10—15 分钟,脱色后,室温干燥,保存。

灵敏度 用 Coomassie 亮兰 R-250 染色蛋白,亲和电泳可以定量到 10 毫微克的糖蛋白,可与免疫电泳的灵敏度(3—10 毫微克)相媲美。

染色液配方 Coomassie 亮兰 R-250 5 克,乙醇 96% 450 毫升,冰乙酸 100 毫升,蒸馏水 450 毫升。染色液配好后,室温放置过夜,次日过滤。

脱色液配方 乙醇 96% 450 毫升,冰乙酸 100 毫升,蒸馏水 450 毫升。

2. 交叉(双向)亲和电泳

蛋白质混合物先在琼脂糖凝胶上进行电泳分离(第一向),然后再在一个含凝集素的琼脂糖凝胶上进行电泳(第二向)。

第一向电泳在 1% 琼脂糖凝胶中进行。将熔化的琼脂糖浇在水平放置的洁净玻璃板上,待凝结后,切去凝胶层的其余部分,留下 1.5—2.0 厘米宽的凝胶条;在凝胶条的适当位置打一圆孔(图 2a),加入样品后,立即进行电泳。样品端接阴极,电压为 10 伏/厘米,电泳时间为 60—90 分钟。第一向电泳完毕后,迅速地把含凝集素的琼脂糖浇在玻璃板的其余部位上,使成厚约 1.2—1.5 毫米的均匀的一层,凝结后,即可开始第二向电泳。样品端仍接阴极,电压为 1.5 伏/厘米,电泳在 10—20℃ 下进行过夜,方向与第一向电泳方向成 90°(图 2 b)。

凝胶的浓度、凝集素浓度、缓冲液以及电泳后处理等同火箭亲和电泳。

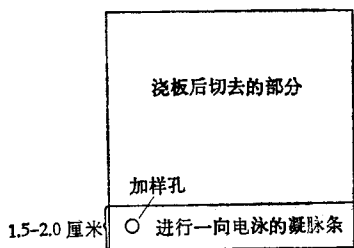


图 2a 交叉亲和电泳第一向凝胶制备方法示意图

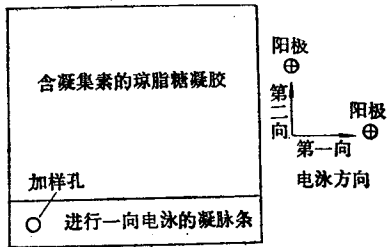


图 2b 交叉亲和电泳示意图

3. 交叉免疫-亲和电泳^[4,5]

这是把免疫电泳和亲和电泳结合起来的一种方法。蛋白质样品先在只含缓冲液的琼脂糖

凝胶中进行电泳分离(第一向)。第一向电泳的琼脂凝胶层的制备方法同交叉亲和电泳。制备两块大小、厚度相同的凝胶板(其中一块进行交叉免疫电泳,作为对照;另一块进行交叉免疫-亲和电泳),在圆孔内加入样品后,立即电泳。电泳在离子强度为 0.075, pH 8.6 的巴比妥缓冲液中, 16℃, 电压为 10 伏/厘米的条件下进行, 时间为 60—90 分钟。第一向电泳完毕后,在距离凝胶条约 2.2 厘米处,与凝胶条平行地放置一把厚度大于 2 毫米的有机玻璃直尺,在直尺与凝胶条之间浇第一中间胶。第一中间胶的配制方法是把已经固相化在 Sepharose 4B 上的凝集素、缓冲液以及维持凝集素活性所需的金属离子加到经煮沸并已冷到 60℃ 的脂琼糖凝胶中,使琼脂糖凝胶的最终浓度为 1%,凝集素浓度为 0.1 毫克/厘米²。作对照的玻璃板上,浇上含缓冲液的 1% 的琼脂糖作第一中间胶。第一中间胶凝结后,小心移去有机玻璃直尺,切去 0.2 厘米的边。再以同样的手续浇第二中间胶。两块玻璃板的第二中间胶都是 1% 的琼脂糖,不含凝集素,缓冲液,也不含抗血清。因为某些免疫球蛋白在 pH8.6 时,朝阴极有轻微的迁移,所以必须加入第二中间胶(空白胶),使免疫沉淀线与第一中间胶分开。第二中间胶的宽度约为 1.5—2.0 厘米。第二中间胶凝结后,在玻璃板的剩余部分浇上参照胶。参照胶中含纯化的,针对样品蛋白的抗血清。四种胶的厚度分别为:第一相凝胶 1.7 毫米,第一中间胶 1.5 毫米,第二中间胶 1.25 毫米,参照胶 1.0 毫米(图

3)。待参照胶凝结后,即可开始进行第二向电泳。第二向电泳电压为 2 伏/厘米,时间 22 小时。电泳后的各种处理同火箭亲和电泳。

Børg-Hansen 用交叉免疫-亲和电泳分析人血清^[5],在第一中间胶中加入 ConA-Sepharose 4B 及 0.1M 的乙酸-乙酸钠缓冲液(pH6, 含 1M NaCl, 1mM CaCl₂, 1mM MnCl₂, 1mM MgCl₂),并将交叉免疫-亲和电泳的结果与作对照的交叉免疫电泳的结果,以及用在第一中间胶中加入已知对某一蛋白专一的抗体进行交叉免疫电泳所得的结果相对照,很容易确定出人血清中只有少数蛋白质不和 ConA 起反应,如白蛋白、前白蛋白、 α -脂蛋白、GC-球蛋白和血清类粘蛋白(α -酸性糖蛋白);而与 ConA 作用的蛋白质为 α_1 -抗胰蛋白酶、 α_1 -抗胰凝乳蛋白酶(α_{1X} -糖蛋白)、结合珠蛋白、血浆铜兰蛋白、 α_2 -巨球蛋白、 α_2 -HS-糖蛋白、 β -脂蛋白、铁传递蛋白、补体 C'3 (β_{1A} -球蛋白)、血液结合素、IgG、IgA 和 IgM。

用交叉免疫-亲和电泳可以预测亲和层析的结果、即蛋白质混合物中哪些组分可以用亲和层析来纯化,应该采用什么亲和层析材料,来分离某一个组分。在第一中间胶中加入固相化的、已知专一性的凝集素,可以用来鉴定细胞质膜和其它各种来源的糖蛋白。也有人用交叉免疫-亲和电泳和交叉免疫电泳的方法来研究人红细胞质膜上主要的内在膜糖蛋白(阴离子输送蛋白,即第三带, band 3)的不均一性^[6]。

二、Hořejši 和 Kocourek 的系统:

是由 Hořejši 和 Kocourek 建立的。先让单糖和烯丙醇起反应,合成烯丙基糖苷^[7-9],在配制聚丙烯酰胺凝胶时,把这种烯丙基糖苷作为单体一起加进去,使丙烯酰胺与烯丙基糖苷共聚,这样就得到了通过共聚而固相化在聚丙烯酰胺凝胶上的各种单糖。共聚物的分子量、糖的含量、以及水溶性都可以通过改变聚合时的条件来加以控制^[8,9]。

在这种含固相化糖配基的聚丙烯酰胺凝胶上进行亲和电泳,可以用来筛选、分离各种凝集

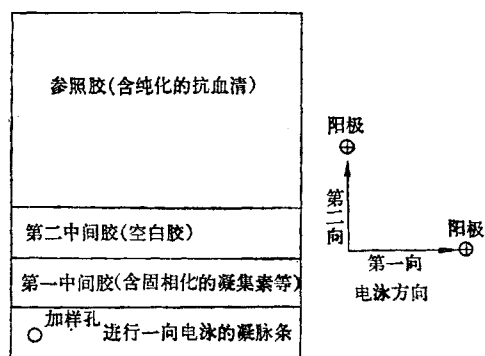


图 3 交叉免疫-亲和电泳示意图

素,研究凝集素及其衍生物与糖类的相互作用^[8,9],测定凝集素-糖复合物的解离常数^[10],判断凝集素的亚基或片段是否仍具有糖结合部位,研究各种修饰反应(诸如光氧化、乙酰化、亚磺酰化等)及各种金属离子对凝集素的糖结合活性的影响,还可以用来检验用亲和层析方法得到的凝集素制剂,其糖结合性能的均一性。譬如比较草蓼(*Vicia cracca*, 亦称广布野豌豆)凝集素在对照胶和含 N-乙酰- α -D-半乳糖胺残基共聚物的亲和胶上的电泳行为,结果表明,该凝集素制剂由活性和非活性二种分子组成(对照胶仅一条带,亲和胶上呈二条带:一快,一慢。快的一条与对照胶上那条带位置相同,表明是非活性分子)。由于亲和电泳,除了利用蛋白质分子之间电荷和分子量的差异以外,还引进了另一个新的因素:生物分子之间相互作用的专一性,因此大大地提高了凝胶电泳的分辨能力。譬如蓖麻凝集素的二个有毒的同工凝集素(isolectins)在亲和胶上分离得比对照胶好^[11]。

1. 制备烯丙基糖苷

采用各种常规的合成脂肪族糖苷的方法^[7]。必须指出任何一种糖苷的合成都有其最适条件,下面给出的只是制备大多数烯丙基 α -D-和 α -L-糖苷的大致过程^[9]。

在一只装有机机械搅拌装置和回流冷凝管(带干燥管)的烧瓶中,将100克磨成细粉的单糖悬浮于200毫升含3%(W/V)干燥氯化氢的无水烯丙醇中。混合物加热,搅拌,80℃回流4小时,糖几乎完全溶解,溶液通常变成棕色。冷却后,用25%的氨水中和(约需12毫升),于70℃减压蒸馏,除去所有的烯丙醇。如果残留物是固体,可以直接从热的乙醇中把烯丙基糖苷结晶出来,通常需要二次重结晶。如果残留物是糖浆状物质,可用一些丙酮稀释后,加入一些纤维素粉拌匀,再用300毫升丙酮分三次萃取。丙酮萃出物于70℃减压蒸馏至干,残留物溶解于尽可能少的热乙醇中,使烯丙基糖苷结晶出来。得率通常为理论值的25—45%。

游离的氨基糖用上述方法处理时不能形成

糖苷。但它们的N-乙酰衍生物(N-乙酰氨基糖)仍可用这一方法制得相应的烯丙基糖苷,不过最好把氯化氢的浓度降低为0.5—1.0%(W/V),反应时间缩短为30分钟到1小时。由于在反应期间部分N-乙酰氨基发生脱乙酰作用,为了得到一个容易结晶的产物,必须除去这些带游离氨基的糖。因此在中和、蒸发以后,把产物溶解于水,然后通过阳离子交换树脂柱(如Dowex 50W),洗脱物再蒸发至干,从热乙醇中结晶出糖苷。

上述方法不适用于制备寡糖的糖苷。制备烯丙基 β -D-及 β -L-糖苷的方法可参照文献[9]。

2. 制备水溶性的糖基共聚物^[10]

丙烯酸(1克)、烯丙基糖苷(0.1—2克)、过硫酸铵(约20毫克)溶解于10毫升水中,水浴加热到100℃,沸腾5分钟。冷却后,用20毫升水稀释,然后对2升去离子水充分透析(通常需搅拌透析72小时,换水数次),以彻底除去未起反应的烯丙基糖苷及其它低分子量的寡聚体和单体。所得的共聚物沉降系数 $S_{20,w}$ 约为2.5—3.5S。

也可以把1—25微升的四甲基乙二胺(TEMED)加到上述溶液中,让反应混合物在室温下聚合2小时,然后搅拌透析。或用TEMED(2微升/毫升)和核黄素(50微克/毫升),在室温下用紫外光照射15分钟来引发上述的游离基聚合反应。

也可以用减压蒸馏除去烯丙醇以后所得到的糖酱状的粗制品来代替纯的、结晶的糖苷,该混合物通常含40—70%的未起反应的糖,这些糖并不参与共聚。此时,应该用较多的过硫酸铵(2.5毫克/毫升)。

若要制备水不溶性的糖基共聚物,只要在上述反应混合物中再加入适重的N,N'-甲叉双丙烯酰胺即可^[9]。

糖基共聚物中糖的含量可以用分光光度计测定,以相应的游离糖为标准。中性糖用酚-硫酸法测定,用游离的中性糖作标准曲线。氨基糖的测定是把样品水解(4N盐酸12小时)后,

用氨基酸分析仪进行的。

3. 电泳

盘状聚丙烯酰胺凝胶电泳按常规方法,在普通的电泳装置中进行^[12]。但不需要大孔胶(又称成层胶、浓缩胶)。

根据所需要的固相化糖和游离糖的浓度,在制备聚丙烯酰胺凝胶时,加入计算量的水溶性糖基共聚物和游离糖,混匀,使它们能够均匀地分布在凝胶中。

上样量是每根凝胶(5×75 毫米)50 微克蛋白(溶解在 20 微升 20% 的甘油溶液中)。

电泳缓冲液可以采用碱性或酸性系统。电泳在碱性缓冲系统中^[13]进行时,电流为每管 4 毫安,电泳进行到溴酚兰到达凝胶底部附近为止,约需 1.5 小时,在酸性缓冲系统中^[14]进行时,电流为每管 7 毫安,时间约 2—3 小时。电泳在室温下进行。

电泳完毕后,凝胶的染色、脱色按常规方法进行。

4. 用亲和电泳方法,测定凝集素-糖复合物的解离常数

在聚丙烯酰胺凝胶中加入糖基共聚物后,能与该固相化糖基专一作用的凝集素的电泳迁移率就会减小(相对于不含该糖基共聚物的对照胶而言),改变固相化糖的浓度,可以改变凝集素在亲和胶上的迁移率。尚若在亲和胶中再加入游离糖,与固相化糖基共聚物竞争凝集素的糖结合部位,凝集素的电泳迁移率又可增加,当固相化糖基共聚物浓度固定不变时,凝集素的电泳迁移率随游离糖浓度增加而增加。因此凝集素的电泳迁移率对固相化糖浓度和游离糖浓度的相关性,可分别用来计算凝集素-固相化糖复合物,凝集素-游离糖复合物的解离常数。

Hořejši 等^[10]用下列公式来计算凝集素-糖复合物的解离常数:

$$\frac{l}{l_0 - l} = \frac{K_i}{C_i} \left(1 + \frac{C}{K} \right)$$

其中: l_0 为未受固相化糖作用影响时,凝集素的迁移率。

l 为在一定浓度(C_i)的固相化糖和一定

浓度(C)的游离糖存在下,凝集素的迁移率。

C_i 为固相化糖的浓度; C 为游离糖的浓度。

K_i 为凝集素-固相化糖复合物的解离常数。

K 为凝集素-游离糖复合物的解离常数。

当 C_i 值固定时,以 $\frac{l}{l_0 - l}$ 为纵轴, C 为横轴作图,可得一直线,该直线在纵轴上的截距为 $\frac{K_i}{C_i}$ 。这样,当 $C = 0$ 时,在一定的 C_i 下,可计算出凝集素-固相化糖复合物的解离常数 K_i 。

$$K_i = \frac{l}{l_0 - l} \cdot C_i$$

该直线外推后,在横轴上的截距为 $-K$,因此凝集素-游离糖复合物的解离常数 K 。

$$K = -C$$

测定凝集素的迁移距离(l 及 l_0)的方法是:电泳完毕后,用氨基黑或 Coomassie 亮兰 R250 染色。脱色后,量原点到蛋白区带中间的距离。一般是每一浓度重复三份,取平均值。

必须指出,在测定 l_0 值时,不能用不加任何固相化糖基共聚物的“空白胶”做对照,而必须使用与测定 l 值时相同 C_i 浓度的“惰性”糖基共聚物的对照胶(即加入与该凝集素不起作用的糖基共聚物),其目的是为了消除由于加入糖基共聚物,引起聚丙烯酰胺凝胶浓度改变,导致电泳迁移率改变而产生的误差。

为了精确地测定凝集素-糖复合物的解离常数,还必须选择一个适当的固相化糖的浓度 C_i ,使 l 值不太低,也不太高(最好约为 $0.25l_0$),还要选择适当的电泳条件,使蛋白在电泳、染色后呈带清晰,且有较高的迁移率(即较大的 l_0 值)。

用亲和电泳测定凝集素-糖复合物解离常数的优点是(1)只要用极少量的样品,就可测定 K 和 K_i 值。(2)因为是亲和电泳,所以杂蛋白的存在并不干扰 K 和 K_i 的测定。即使只是部分纯化的凝集素,也可用于测定。(3)可同时测定某一凝集素所有电泳行为不同的分子形式(即同工凝集素)的解离常数。往往一个凝集素

在对照胶上是均一的,但在亲和胶上却被分成若干不同的带,表明这一凝集素,可能存在着对糖亲和力不同的若干同工凝集素。(4)用亲和电泳测得的解离常数与用其它方法测得的值一致。(5)可用来研究很弱的相互作用(解离常数达 10^{-1} 到 $1M$),用这一方法测得的解离常数一般在 10^{-1} 到 $10^{-6}M$ 之间。(6)方法简便,普通实验室里的圆盘聚丙烯酰胺凝胶电泳的设备,无需改良就可使用。

自 60 年代中期以来,亲和层析在生化分离技术方面已赢得了重要地位,而亲和电泳还刚刚出现,有待发展、完善。虽然迄今亲和电泳方面的实验大都以凝集素和糖蛋白为对象,但这一方法的原理普遍适用于研究各种生物分子间的相互作用。我们相信这一方法经适当改进后,可用于微量地,定量地研究核酸的相互作用、激素-受体、蛋白质-蛋白质、酶-底物等的相互作用。

本文承沈昭文教授热情指教与修改,谨表谢忱。

参 考 文 献

[1] Entlicher, G. et al.: *Experientia*, 25, 17, 1969.

- [2] Takeo, K. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 153, 1, 1972.
- [3] Bøg-Hansen, T. C. et al.: *Analytical Biochemistry*, 81, 78, 1977.
- [4] Axelsen, N. H. et al.: *A Manual of Quantitative Immuno-Electrophoresis, Methods and Applications*, Universitetsforlaget, Oslo Scand. *J. Immunol.*, 2, Suppl. 1, 1973.
- [5] Bøg-Hansen, T. C.: *Analytical Biochemistry*, 56, 480, 1973.
- [6] Golovtchenko-Matsumoto, A. M. et al.: *J. Biochem.*, 87, 847, 1980.
- [7] Staněk, J.: *The Monosaccharides*, Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences, Prague, 257, 1963.
- [8] Hořejší, V. et al.: *Methods Enzymol.*, 34, 178, 1974.
- [9] Hořejší, V. et al.: *Methods Enzymol.*, 34, 361, 1974.
- [10] Hořejší, V. et al.: *Biochimica et Biophysica Acta*, 499, 290, 1977.
- [11] Hořejší, V. et al.: *Biochimica et Biophysica Acta*, 499, 301, 1977.
- [12] Davis, B. J.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121, 404, 1964.
- [13] Steward, F. C. et al.: *Am. J. Bot.*, 52, 155, 1965.
- [14] Reisfeld, R. A. et al.: *Nature*, 195, 281, 1962.

[本文于1982年2月25日收到]

微核试验及其在测定化学致癌剂中的应用

郭 长 兴 王 宏 秀

(北 京 药 品 检 验 所)

微核试验是染色体损伤短期突变性试验方法之一^[1],于七十年代初由 Matter 和 Schmide 建立。他们用哺乳动物骨髓细胞的多染性红细胞与致癌性化学物质相作用,发现微核出现率与染色体畸变有很好的相关性。通过近几年的应用,此方法已趋完善,并为国际环境致突变物和致癌物防护委员会所肯定。

微核试验的原理:正常的红细胞分裂到多染性红细胞时,其核应该消失;如果与诱变性化学物质或某些生物因子相作用,就会在细胞

DNA 复制合成前期(G_1 期或 S 期),合成期与合成后期(S 期与 G_2 期)损伤染色单体,有时也会作用于有丝分裂的过程,损伤纺锤体的机能,导致染色体全部不分裂或无着丝点的碎片及多着丝点桥联。在细胞分裂末期,由染色体断裂遗留下来的断片演变而形成微核。

在正常情况下哺乳动物骨髓红细胞比较集中,其无核的细胞主要是成熟红细胞和多染性红细胞,并且多染性红细胞占多数。当有毒物质作用于骨髓细胞时,可造成一定比例的含有