

缓冲液,回收率有一定的提高,但如果提高不多,反而带进了以后不易处理的盐,也许是不合算的,特别是对于分子量不大的小肽。

三、讨 论

制备型聚焦电泳早有文献报道,有代表性的就是在垂直的蔗糖梯度中聚焦的柱式装置^[4]。但至今应用仍不普遍。主要的缺点是聚焦在液体介质中进行而聚焦完成后需在撤消电场的情况下才能将被分离的样品放出。这样使分离好了的各个成份又不同程度地再混合^[5],有时还会发生被分离的成份在等电点处沉淀,因此往往只能获得一个良好的聚焦图象,却拿不到纯净的产品。

琼脂糖平板制备聚焦正好克服了上述这一弱点。被分离的组分在聚焦完成后停留在其等电点附近,只要及时切割,就不可能再混合;即使沉淀,也有可能用合适的溶剂再将其溶解而洗脱。整个操作只要具备一般的多用途平板电泳仪即可完成,无须特殊的设备。

在不少蛋白质和肽的分离提取中,要获

得聚焦电泳上呈单一谱线的制品是不太容易的。往往历经冗长的分离流程后,所得的产品在聚焦谱上仍呈好几条带。此时如进行一次制备聚焦,问题往往迎刃而解。样品中待分离组分的等电点相差愈远,就愈容易分离,即使是一群像胸腺素组分五等电点相近的多肽,也有可能通过应用含窄范围两性电介质的琼脂糖平板,经连续两次的制备聚焦,使它们中的一些组分得到比较满意的分离效果的。

参 考 文 献

- [1] 姚志建等,《生物化学杂志》1(2),75,1985.
- [2] 姚志建、沈倍奋,《生理科学进展》,印刷中.
- [3] Anderson, B. L. et al.: *Anal. Biochem.*, **132**, 365, 1983.
- [4] Svensson, H., *Arch. Biochem. Biophys. Suppl.*, **1**, 132, 1962.
- [5] Righetti, P. G., "Isoelectric Focusing: Theory, Methodology and Applications", p. 96—98, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford, 1983.

[本文于1984年11月19日收到]

应用电泳滴定曲线预测离子交换层析法的最佳 pH 条件

舒 雨 雁

(广西医学院生化教研室, 南宁)

洪 息 君 班 建 东

(广西医学院药理教研室)

储 开 疆 汤 圣 希

(广西医学院蛇毒研究室)

电泳滴定曲线 (Electrophoretic Titration Curve, ETC) 是近年引人注目的一项新技术。它组合等电聚焦-电泳技术进行制备,即在含有两性电解质的聚丙烯酰胺 (PAA) 胶板上,经预聚焦形成 pH 梯度后,胶板转 90 度再经一次

电泳,使样品蛋白质按其表面电荷的性质和密度在 pH 梯度中迁移泳动形成 ETC。

ETC 的分辨力高,可用于蛋白质的纯度检测,包括单一氨基酸或蛋白质突变体;用于蛋白质表面电荷特性和等电点的检测;用于选择各

蛋白质组分之间泳动电荷最大差异的 pH 范围以预测离子交换层析的最佳条件; 用于研究蛋白质与配基的结合; 用于研究蛋白质与蛋白质之间的相互反应。ETC 的操作不甚复杂, 需时不长, 样品量仅需微克至百微克^[2,4,5]。我室在分离蛇毒前应用平床电泳 (Flat-Bed Electrophoresis) 制备 ETC, 满意地为高效液相层析离子交换分离蛇毒提供最佳 pH 的选择。现报道如下。

材料与 方法

一、材料

真空冷冻干燥五步蛇毒 (Venom of *Agkistrodon acutus*), Pharmacia FBE 300 型平床电泳仪, 配用 ECPS 3000/150 型恒功率仪和 VH-1 型压时积仪。

Pharmacia FPLC 快速蛋白液相层析仪, 配用 Mono-Q 阴离子交换柱以及全套配件。

Corning 135 pH/Ion 计, 配用表面电极。

LKB Ampholine pH 3—10, 其它试剂如丙烯酰胺、TEMED 等为 Sigma 或 BDH, 或国产 A. R. 级试剂。

Milli-Q 制备的高纯水, 电导 1500 万欧/cm²。

二、方法

1. 聚丙烯酰胺 (PAA) 胶板的制备 按 T7C3 配比取 10% 丙烯酰胺、双丙烯酰胺贮液 10.5ml, 甘油 2.0ml, (1% TEMED 0.4ml) 和 Ampholine pH 3—10 0.95ml, 高纯水加至 15 ml, 混匀脱气, 加过硫酸铵 22.8mg/ml 0.2ml, 灌入胶模中, 静置 2 小时以上, 完全聚合后即成 115×115×1.0mm 的 PAA 胶板。

2. 胶板的等电聚焦 (IEF) 平床电泳仪冷却板校正水平后, 滴加高纯水 2ml, 平整安放 PAA 胶玻板, 除去玻板下气泡, 吸去过量的水, 取电极条分别泡在 0.05M 硫酸阳极液或 1M 氢氧化钠阴极液中。取出后吸去过量的电极液, 分别安放在 PAA 胶板两侧边缘, 用滤纸连接电极条与相应的电极液, 调整平床电泳仪电极悬杆使与电极条切合。加盖, 开动冷却装置, 接

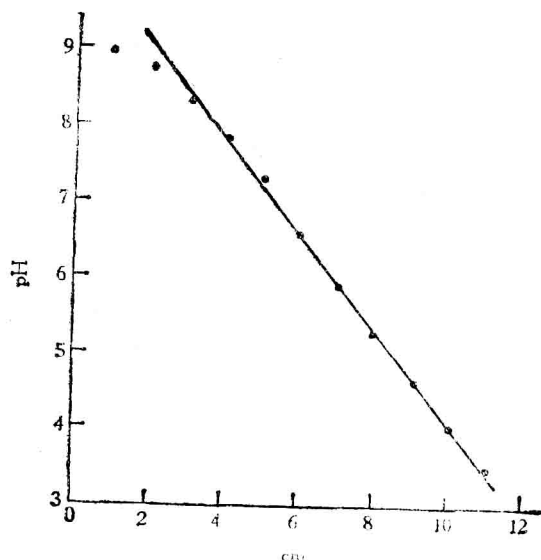


图 1 等电聚焦后, 带有两性电解质的 PAA 胶板上的 pH 梯度

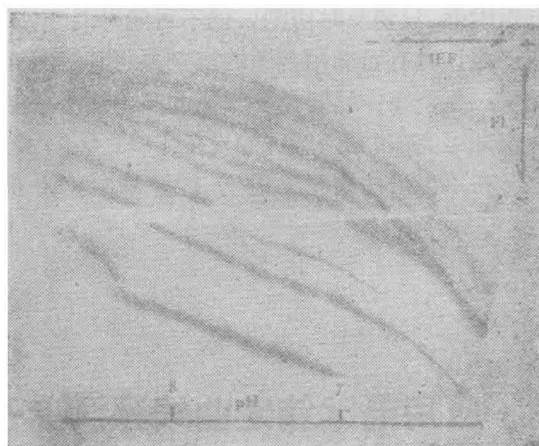


图 2 经 Sephadex G-100 凝胶过滤分离的五步蛇毒 II。峰的滴定曲线

通电源, 调 ECPS 仪的电压至 1500 V, 电流 150mA, 功率 15W, 调 VH-1 仪至 750Vh, 进行等电聚焦时的电流方向应与胶板加样槽的方向一致。当 VH-1 显示 IEF 完毕后, 切断电源, 启盖, 用刀片切去电极条内侧至边缘的胶, 用表面电极从阴极至阳极定距测定胶板表面的 pH 梯度。

3. 胶板的电泳 (EI.) 2mg/ml 蛇毒样品 50—75μl 加入胶板样品槽中。可加少量示踪剂溴酚蓝。应将胶板水平转 90 度进行电泳, 电流方向此时与样品槽的方向相垂直。调整电压

至 1000V, 电流 150mA, 功率 15W, 压时 250 Vh. 通电后, 样品中各蛋白质组分按其电荷的性质和密度, 在 pH 梯度胶板上泳动. 当溴酚兰示踪至阳极边缘时终止电泳.

4. 胶板的固定、染色和洗脱 用 5% 磷基水杨酸、10% 三氯醋酸固定 60 分钟, 0.2% 考马斯蓝甲醇醋酸液染色 3—6 小时, 醋酸甲醇液洗脱. 此时可见蛋白组分各自迁移的清晰 ETC, 其中, 使各条曲线得以最明显分开的 pH 范围为最佳 pH 条件. 曲线与样品槽相交的 pH 值, 即为该曲线蛋白组分的等电点, 如图 3 黑三角所指的位置.

结 果

等电聚焦 pH 梯度、等电点和最佳 pH 范围的选择 本实验等电聚焦形成的 pH 梯度, 其线性较好, 见图 1.

对上海东风厂电泳纯牛血清蛋白进行测试, 得三条 ETC, 其中一条为主线, 观测 pI 约为 4.9, 与文献资料吻合.

经 Sephadex G-100 凝胶过滤分离的五步蛇毒 II_b 峰进行测试, 得 9 条 ETC. 各条曲线最明显分开的 pH 范围在 7.4—8.0 之间, 见图 2. 说明这个 pH 范围是对 II_b 峰进行离子交换分离的最佳 pH 条件.

将 II_b 峰采用 FPLC/Mono-Q 以上述 pH 范围进行离子交换层析, 共分得 11 峰, 测定其第三峰有类凝血酶活性, 经 ETC 再检测为单一曲线. 见图 3. 曾将第五、六峰再混合后进行 ETC 测试, 得二条曲线. 见图 4.

由于 PAA 本身有分子筛效应, 样品分子量大于 15 万道尔顿时, 宜采用琼脂糖胶板^[3]. 使用薄胶时宜配用 Silane A-174 以利胶板的操作. 制备 ETC 的费用稍大. 切盼国产品能满足供应, 以降低成本.



图 3 用 FPLC/Mono-Q 柱分离后的第三峰的滴定曲线

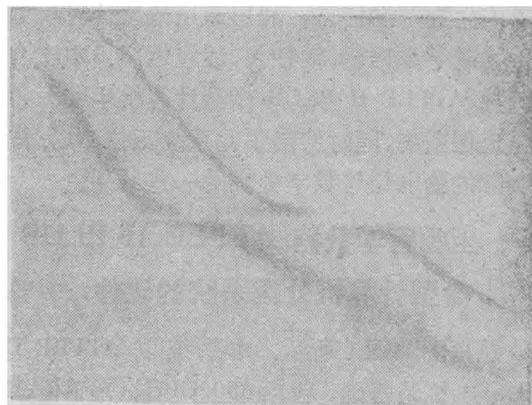


图 4 用 FPLC/Mono-Q 柱分离的第五和六峰混合物的滴定曲线

参 考 文 献

- [1] Pharmacia Fine Chemical: in *Titration Curves. Iso-electric Focusing, principles and methods.* Uppsala, 118—22, 1982.
- [2] Haff, L. A. et al.: *J. Chromatogr.*, **266**, 409—25, 1983.
- [3] Troungos, C. et al.: *J. Chromatogr.* **250**, 73—9, 1982.
- [4] Righetti, P. G. et al.: *J. Chromatogr.* **166**, 455—60, 1978.
- [5] Righetti, P. G. et al.: *J. Chromatogr.*, **184**, 415—56, 1980.

[本文于 1984 年 11 月 17 日收到]