

饭豇豆凝集素等电点的快速测定

赵永芳 周济兰* 叶明*

(武汉大学生物系)

目前多数人采用凝胶等电点聚焦电泳法测定蛋白质等电点(pI)。此法受多种因素的影响^[1,2,4],加之所用试剂 Ampholyte 价格昂贵,故使用不甚方便。根据溶液 pH 值大小直接影响蛋白质和离子交换剂束缚力的原理, Yang (1985) 报道了一种 pI 测定方法,我们参照这一方法对饭豇豆 (*Vigna Cylindrica*) 凝集素(详见另文)的 pI 值进行了测定,结果表明此法快速、准确(<0.2 pH 单位)、成本低(离子交换剂可反复使用)。

方法与结果

一、方法

1. 蛋白质含量的测定: 用 A_{280nm} 消光值表示,以牛血清白蛋白(进口产品)作对照;

2. 饭豇豆凝集素的制备及效价测定: 按文献[5]进行;

3. 凝集素等电点的测定: 选用 pH 变化范围在 4.8—6.0 的离子交换剂 SP-Sephadex C-50 (进口产品),饭豇豆凝集素用生理盐水稀释,其浓度为 2mg/ml。操作步骤参照文献[3]进行。

二、结果

用离子交换剂测出饭豇豆凝集素的等电点为 5.3。饭豇豆凝集素溶液在 pH 4.8—6.0 时,用它与 SP-Sephadex C-50 交换后,其上清液的凝集效价列于表 1(I)。以表中所列效价数为纵坐标,以相应的 pH 值为横坐标即可绘出饭豇豆凝集素的等电点测定曲线(图 1 中 A)。从图看出,该曲线分为三段:第(1)段是饭豇豆凝集素被 SP-Sephadex C-50 所吸附,凝集效价为 0。这表明饭豇豆凝集素在 pH 5.2 以下的溶液中带正电荷,能被阳离子交换剂吸附;第(3)段凝集效价为 16。这表明饭豇豆凝集素在 pH 5.4 以上的溶液

中带负电荷,不能被阳离子交换剂吸附;第(2)段是等电点区段,将该区段的首、尾 pH 值相加被 2 除就可得

表 1 凝集效价与 pH 的关系

管号	1	2	3	4	5	6	7
凝集效价	4.8	5.0	5.2	5.4	5.6	5.8	6.0
样品							
I*	0	0	0	16	16	16	16
II*	8	8	8	0	0	0	0

* Sp-Sephadex C-50 吸附饭豇豆凝集素后的上清液。

** Sp-Sephadex C-50 吸附饭豇豆凝集素后的沉积胶加 1ml 0.4mol/L 磷酸缓冲液(含 0.15 mol/L NaCl), pH 7.0, 充分洗涤,离心后收集的上清液。

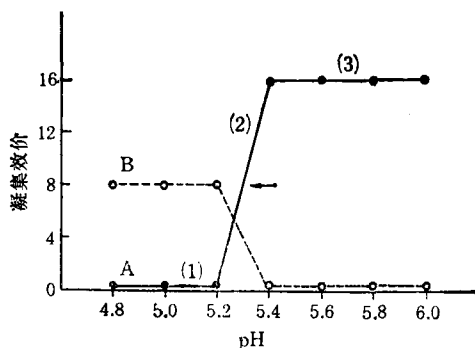


图 1 饭豇豆凝集素的等电点测定曲线

A. 交换剂吸附凝集素后的上清液;

B. 交换剂吸附凝集素后的沉积胶再洗脱的溶液。箭头所指表示等电点处。

* 湖北省肿瘤研究所。

析结果获得用户满意。重复性、再现性均好。

参考文献

[1] P. 卡尔森等著,张增明译:《病理生化学》,科学出版社,北京,1984,63页。

[2] M. S. 卡南高著,陆中定译:《衰老生物化学》,人民卫生出版社,北京,1980,164页。

[3] Beckman Instrument Inc: Training Course for 121MB Amino Acid Analyzer, 1979.

[本文于 1987 年 10 月 28 日收到]

出饭豇豆凝集素的等电点为 5.3。即

$$pI = \frac{5.2 + 5.4}{2} = 5.3$$

为了证实本试验所测数据的准确性,曾把上述各管中吸附凝集素后的交换剂分别进行离心,弃上清液,尔后在每管沉积胶中加入 1ml 0.4 mol/L PBS 溶液充分洗涤,再离心收集上清液测定其效价(见表 1 中 II)。从表中数据看出,在每个 pH 值范围内,由离子交换剂洗脱出溶液的效价与其吸附后上清液的效价正好相反。即前者为高效价时,后者则为无效价或低效价;反之,前者为无效价或高效价时,后者则为高效价。由表 1 中 II 所列数据绘出的曲线(图 1 中 B)也正好与图 1 中 A 相反。

讨 论

1. 用离子交换剂测定蛋白质等电点是一种可靠、快速、经济的方法。我们曾用此法分别测定了国产和进口的两种牛血清白蛋白的等电点,其结果($pI=5.2$)与文献[3]报道一致,与进口样品 $pI=5.3$ 相近。依照本法测出的饭豇豆凝集素等电点值是 $pI=5.3$,对该物质的盐析液进行了离子交换层析分离,结果较为满意(另文报道)。本法测定蛋白质的等电点时,1—2 小时可得到结果,所用的试剂也较普通,被检测的样品不一定提纯(如有特异测定方法时)。可见用离子交换剂测定蛋白质等电点可能是一种有实用意义的方法。

2. 强性离子交换剂用于测定蛋白质的等电点较为适宜。离子交换剂吸附蛋白质的数量与溶液的 pH 值关系密切。强阳性离子交换剂(SP-Sephadex C-50)或强阴性离子交换剂(QAE-Sephadex A-50)在较广的 pH 范围有较大的解离度^[4],对带同样电荷蛋白质的吸附量趋于一致,可减少测定误差。但用此法测定牛血清白蛋白的等电点时产生了异常的第(4)段曲线(图 2)。这可能是由于牛血清白蛋白($pI=5.2$)在 $pH<4.6$ 的溶液中带较多正电荷导致交换剂的交换容量增大或产生非特异吸附现象而引起的。

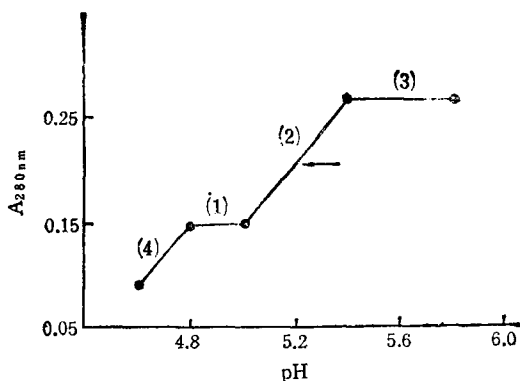


图 2 牛血清白蛋白的等电点测定曲线
箭头所指表示等电点处

3. 用离子交换剂测定蛋白质的等电点时,离子交换剂与蛋白质用量的比例要适当。一般用分光光度法测得蛋白质的浓度为 3mg/ml,离子交换剂(沉积胶)为 1.0ml 时,测出的 pI 值较为理想。若交换剂量加大到 1.5ml 时,可使 $pH5.2$ 以下的蛋白质均被吸附,而在 $pH5.4$ 以上不出现水平线(出现梯度线),致使测出蛋白质的等电点偏高,甚至测不出来。

致谢:王微勤副教授帮助鉴定饭豇豆特此致谢。

参 考 文 献

- [1] An Derlan. B.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 1980, 200(1), 206.
- [2] 赵永芳编:《生物化学技术》,武汉大学印刷厂,1982, p. 217,
- [3] Yang, V.C. and Langer, R.: *Anal. Biochem.*, 1985, 147 (1), 148.
- [4] *Isoelectric Focusing Principles and Methods.*, Pharmacia Fine Chemi Cals. Uppsala, Sweden, 1982.

[本文于 1987 年 10 月 12 日收到]