

介绍一种蛋白、配体快速分离的方法——离心柱法

周筠梅

(中国科学院生物物理所,北京)

关键词 离心柱法, Penefsky column

在我们的实验工作中,将生物大分子与配体分离或除去盐份,改变蛋白的缓冲体系的工作,可以说是每天都离不开。透析和分子筛层析等是常用的好方法。但透析方法的缺点是需要时间较长,对于不够稳定的样品也不适用。用分子筛柱可以较快分离,但普通柱层析方法往往导致样品的稀释而不可避免地造成损失。这里介绍一种快速、回收率高且不稀释样品的凝胶柱分离方法。由于这个方法首先由美国纽约城公共卫生研究所的 Penefsky^[1]成功地用于 ATPase 与过量配体 ³²P 的分离,所以国外一般称之为 Penefsky column。而实际上使用了以色列贺本大学 Orly 和 Selinger 博士未发表的程序。所以 Penefsky 自己称之为离心柱法。因为此法与一般柱层析的区别在于通过离心而使样品快速通过凝胶,以达到快速、不稀释样品的作用。我认为称为离心柱法是名符其实的。现将具体做法介绍如下。

一、所需设备、材料

1. 马桶式离心机或类似的台式离心机一台。
2. 小柱子。通常用 1ml 医用的塑料注射器。如没有塑料注射器,用 1ml 的玻璃注射器也可以。
3. 滤片。装在柱子的底部,以防止凝胶泄漏。国外一般用多孔聚乙烯板 porous polyethylene disc 1.6 mm 70 μ 。用合适的打孔器打成外径与柱子内径相同的圆片,用注射器的芯子将其压至柱子的底部。如果找不到 polyethylene,可用少量玻璃毛压在柱子底部代用。
4. 分子筛凝胶。可根据分离样品的分子量,选合适的型号。一般用 Sephadex G-75, G-50, G-25 均

可。根据所分离蛋白质与分离配体的分子量而定。

二、操作步骤

1. 将小柱子架在合适的试管内,向此小柱内装填已溶胀好的 Sephadex, 令溶液自动流下,开始时因管小,表面张力大,溶液不易流出,可在柱顶用注射器芯子稍加压力,赶走出口处的气泡,使液体能自由流下。将 Sephadex 加至所需高度。一般待分离样品是 100 μ l 时,可加至 1ml 刻度处,静置 3—5min,至无液体滴下,此柱即已装好。
2. 将填好的 Sephadex 柱,连同试管放入马桶式离心机内。在 1000r/min 左右离心 2min。
3. 取出被甩干的柱子,放到另一个试管内。预先在此试管底部放一个小离心管(塑料的 1.5ml 或 0.5 ml 均可),以便收集分离后的样品。
4. 将待分离的混合物(体积一般 100 μ l 左右),加到上述柱子的顶部,将柱子连同试管放入离心机,1000 r/min 离心 2min。(注意:这一步骤使用的离心条件与步骤(2)保持相同即可,转数、时间可以自己控制)。
5. 取出柱子,在小离心管内就得了与游离配体分离的蛋白。柱内的 Sephadex 可以集中清洗,重复使用。此法除用于蛋白与配体的分离外,也可以方便地用于变更蛋白的缓冲体系。在蛋白浓度不是太低或太高时,回收率可高达 95% 以上。

参 考 文 献

- 1 Penefsky H. S. J Biol Chem, 1977; 252; 2891

[本文于1989年4月29日收到]