

多肽的电泳分离*

左爱军 梁东春 郭刚 王宝利 张镜宇

摘要 目的:对4种PAGE方法进行比较,选择出适用于分离小分子质量多肽的电泳方法。方法:用常规SDS-PAGE、低分子质量Tricine-SDS-PAGE、多肽SDS-PAGE以及含尿素的多肽SDS-PAGE 4种方法对相同的样品进行电泳分离,并对分离效果进行比较。结果:常规SDS-PAGE不适合分离小分子质量多肽,Tricine-SDS-PAGE对分子质量小于10 ku的样品效果不佳。多肽SDS-PAGE能分离分子质量在5~20 ku的多肽,含尿素的多肽SDS-PAGE对分子质量小于5.0 ku的多肽也能很好的分离。结论:含尿素的多肽SDS-PAGE对小分子质量多肽的分离效果最好,可根据实验的需要选择适合的电泳方式。

关键词 肽类 电泳 尿素 电泳 聚丙烯酰胺凝胶

The Electrophoretic Separation of Low Molecular Weight Polypeptide

ZUO Aijun, LIANG Dongchun, GUO Gang, WANG Baoli, ZHANG Jingyu

Institute of Endocrinology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Abstract Objective: To select an ideal method for the separation of polypeptide, and compare the four SDS-PAGE methods in separating low molecular weight polypeptide. **Methods:** Identical samples of low molecular protein marker and polypeptide molecular marker were electrophoresed by conventional SDS-PAGE, Tricine-SDS-PAGE, SDS-PAGE for polypeptide and the SDS-PAGE containing urea. The separating effects of these four methods were compared. **Results:** Routine SDS-PAGE was not adaptable for separating low molecular weight peptide. Low molecular weight peptide (< 10 ku) was not separated by Tricine-SDS-PAGE well. Low molecular weight polypeptide (5~10 ku) could be separated by polypeptide SDS-PAGE. If urea were applied, polypeptide SDS-PAGE could separate the peptide lower than 5 ku. **Conclusion:** Containing urea polypeptide SDS-PAGE had the highest ability of separating low molecular weight peptide. The suitable method should be applied depends on the needs of the experiment.

Key words peptides electrophoresis urea electrophoresis polyacrylamide Gel

蛋白质电泳技术是生物化学实验的一个关键技术,并正在成为后基因组时代中蛋白质组学研究的核心技术。几乎所有的蛋白质分析中都使用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术,其在分离小分子质量多肽类样品时所遇到分离效果不佳的问题逐步引起研究人员的关注和重视。因此,对该技术本身的分辨率、灵敏度、速度和准确度的要求也不断提高。本研究对4种电泳方法进行比较,以便于在实验中选择适合的蛋白质凝胶电泳方法对多肽进行分离。

1 材料与方 法

1.1 材料 丙烯酰胺、N,N'-亚基丙烯酰胺、尿素和三羟甲基甘氨酸(Tricine)购自美国Amersham Place Little Chalfout公司;三羟甲基氨基甲烷(Tris)、多肽分子质量标志购自美国Sigma公司;氨基乙酸、考马斯亮蓝G-250和考马斯亮蓝R-250购自上海化学试剂公司;低分子质量蛋

白质标志购自华美生物工程公司;EPS 301电源为美国pharmacia公司产品;MV-型小型双垂直板电泳槽购自大连捷迈科贸有限公司,垂直玻璃板8 cm × 8 cm,凝胶厚度为1.0 mm。

1.2 4种电泳法对相同的样品进行分离 A法:常规十二烷基硫酸钠(SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)^[1];B法:低分子质量三羟甲基甘氨酸(Tricine)SDS-PAGE^[2];C法:多肽SDS-PAGE^[3];D法:含尿素的多肽SDS-PAGE^[4]。

1.2.1 凝胶液配制方法 A、B、C、D法配制分别见参考文献^[1~4],4种方法的主要不同之处在于:(1)A法pH值浓缩胶为6.8,分离胶为8.8,B、C、D法浓缩胶、间隔胶和分离胶浓缩胶pH值均为8.45。(2)A法和B法分离胶凝胶浓度(T)为10%,交联度(C)为3.3%,C法和D法分离胶T为16.5%,C为6%。(3)C法和D法在浓缩胶和分离胶之间增加了间隔胶T为0%,C为3.3%。(4)D法分离胶中含6 mol/L尿素。

*天津市自然科学基金重点项目(项目编号:033801611)

作者单位:300070 天津医科大学内分泌研究所

1.2.2 电泳缓冲液组成 4 种方法的主要不同之处在于: A 法阳、阴极缓冲液均含 Tris、甘氨酸和 SDS, pH 值均为 8.0, 而 B、C、D 法阳极缓冲液中只含 Tris, pH 值为 8.9, 阴极缓冲液中含 Tris、Tricine 和 SDS, pH 值为 8.25^[1-4]。

1.2.3 上样缓冲液组成及样品准备 A 法使用溴酚蓝作指示剂, B、C、D 法使用考马斯亮蓝 G-250。

1.2.4 电泳条件 预电泳恒电流 25 mA, 预电泳时间 30 min; 浓缩胶电泳恒电流 25 mA, 间隔胶电泳恒电流 50 mA, 分离胶电泳恒电流 50 mA。

1.2.5 染色 A 法和 B 法染料使用考马斯亮蓝 R-250, C 法和 D 法使用考马斯亮蓝 G-250, 染色 45 min 后脱色。

2 结果

2.1 4 种方法的电泳结果 以低分子质量蛋白质标志(97.4, 66.2, 43.0, 31.0, 20.1, 14.4 ku)和多肽分子质量标志(16.95, 14.44, 10.6, 8.16, 6.21, 2.51 ku)作为样品。由图 1, 2 可见, A 法可以将分子质量在 14.4~97.4 ku 的低分子质量蛋白质标志清晰的分离, 而对分子质量在 2.51~16.95 ku 的多肽分子质量标志却只能看到 16.95 ku 和 14.44 ku 2 条带; B 法对多肽的分离效果有所提高, 但 8.16 ku 和 2.51 ku 2 条带却无法分离; C 法可以清晰的分离包括 8.16 ku 在内的 5 个电泳条带, 却不能分离 2.51 ku 条带, D 法可以清晰的分离多肽分子质量标志的 6 条带。

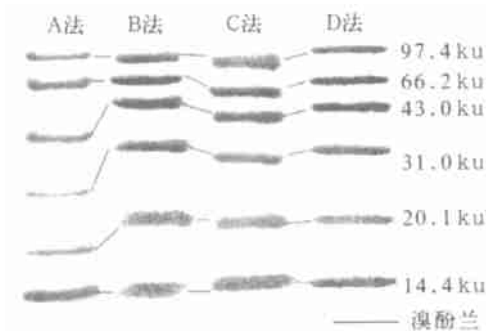


图 1 低分子质量蛋白质标志结果

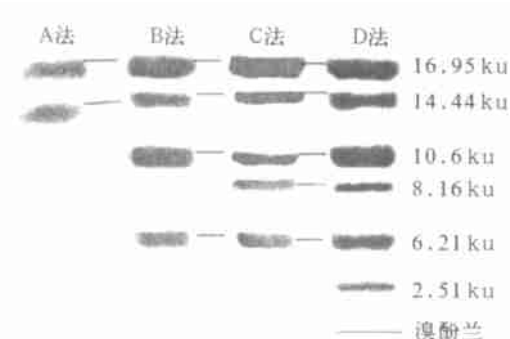


图 2 多肽分子质量标志结果

2.2 直线回归分析 将 B、C、D 3 种方法对多肽分子质量标志的分离结果以分子质量 (MW) 对数 (lgMW) 为横坐标以相对迁移率 (R_f) 为纵坐标进行直线回归分析, 回归方程分别为: $Y = -1.054 X + 4.312$, $Y = -0.968 X + 4.2699$, $Y = -1.0606 X + 4.2771$, 相关系数分别为 0.91, 0.93, 0.97, t 值分别为 2.92, 4.38, 7.98 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3 讨论

分子质量小于 15 ku 的多肽在常规 SDS-PAGE 系统中由于其形成的 SDS-多肽胶束大致是球形而不是椭圆形, 其长度和直径在同一个数量级, 且其内部较多的电荷不能被结合的 SDS 电荷所覆盖, 所以偏离了相对迁移率和分子质量对数的相互关系^[5]。本研究中使用 Tris-Tricine 系统(B、C、D 法)可以提高分子质量小于 20 ku 蛋白质的分辨率, 其优越性在于以 Tricine 代替甘氨酸作为终止离子, 在常规 SDS-PAGE 电泳中, 作为终止离子的甘氨酸在酸性浓缩胶中移动的非常慢, 因而较大分子质量的蛋白质也会被很好的浓缩, 然而分子质量低于 20 ku 的蛋白质则会因与 SDS 的共迁移影响分离效果。当 Tricine 作为终止离子时, 其在蛋白浓缩时与甘氨酸的作用大不相同, 它可以将小分子质量多肽微团浓缩到尽可能窄的范围内, 使 SDS 和多肽得到分离从而改善分离效果。另外 Tris-Tricine 系统不使用甘氨酸可以防止在下一步的氨基酸序列测定中的干扰, 而且 C、D 法所述电泳受样品中离子浓度和 pH 值的干扰很少, 甚至可以允许蛋白质样品中的高离子浓度^[5]。

本文所述 B 法使用 Tris-Tricine 系统可以提高分子质量小于 20 ku 蛋白质的分辨率, C 法在此基础上提高了交联度 (6%) 和凝胶浓度 (16.5%), 该凝胶的孔径可以达到满意的分离分子质量在 5~20 ku 的蛋白质, 这种方法比现已建立的其他电泳方法都优越^[6,7]。D 法在 C 法的基础上又引入了尿素, 可以有效地减少多肽与 SDS 的结合量, 电泳谱带随着尿素和 SDS 的浓度改变, 分子质量小于 5 ku 的肽类都能达到很高的分辨率, 上述结果与相关报道一致^[8]。多肽 SDS-PAGE 和含尿素的多肽 SDS-PAGE 都是很好的分离小分子质量多肽 (5~20 ku) 的电泳方法。本研究对几种常用的蛋白质电泳方法进行了比较, 旨在对实验中选择适当的电泳方式有所帮助。

参考文献

- 1 Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227 (259):680-685
- 2 郭尧君. 蛋白质电泳技术. 第1版. 北京: 科学出版社, 1999. 131-139
- 3 Schagger H, Von Jagow G. Tricine - Sodium Decyl Sulfate - Polyacrylamide gel electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 1987, 166(2): 368-379
- 4 Swank RT, Munkres KD. Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate. *Anal Biochem*, 1971, 39(2):462-477
- 5 卢圣栋主编. 现代分子生物学实验技术. 第2版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999. 383-387
- 6 王旭, 何冰芳, 李霜. Tricine - SDS - PAGE 电泳分析小分子多肽. *南京工业大学学报*, 2003, 25(2): 79-81
- 7 Kratzin HD, Wiltfang J, Karas M, et al. Gas - Phase sequencing after electroblotting on polyvinylidene difluoride membranes assigns correct molecular weights to myoglobin molecular weight markers. *Analytical Biochemistry*, 1989, 183:1-8
- 8 石继红, 赵永同, 王俊楼. SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析小分子多肽. *第四军医大学学报*, 2000, 21(6):761-763

(2004-01-13 收稿 2004-04-16 修回)

短篇与病例报告

八例 SARS 合并基础疾病患者临床救治体会

安景爱 李建新 张 征

关键词 严重急性呼吸综合征 基础疾病 治疗探讨

严重急性呼吸综合征 (severe acute respiratory syndrome, SARS) 发展迅速, 短时间内即可导致呼吸衰竭及多器官功能障碍综合征 (MODS), 尚无特异性疗法。笔者对救治的 8 例 SARS 合并基础疾病患者的临床资料进行回顾性分析, 现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 8 例均为 2003 年 4 月—6 月收治的确诊 SARS 患者, 其中男 5 例, 女 3 例, 年龄 33~74 岁, 平均 (59.25 ± 15.48) 岁, 50 岁以下患者 2 例。8 例中合并心肌梗死行冠脉支架植入术者 3 例, 糖尿病 2 例, 风湿性心脏病 1 例, 肺结核 1 例, 高血压伴慢性肾衰 1 例。8 例患者均有发热且体温超过 38.5℃; 均有咳嗽, 干咳为主, 痰中带血 3 例; 严重呼吸困难且血氧饱和度 (SaO₂) < 0.93 者 7 例; 白细胞计数均 < 10 × 10⁹/L; X 线胸片为多叶病变, 病变范围超过 1/3 者 7 例。SARS 诊断依据卫生部公布的传染性非典型肺炎的临床诊断标准确诊^[1]。

1.2 治疗与结果 所有患者均给予抗病毒药物利巴韦林 0.5 g, 2 次/d 静脉滴注; 抗生素主要为左氧氟沙星和阿奇霉素。8 例患者均因高热持续不退和(或)患者 X 线胸片病变进展迅速, 给予糖皮质激素治疗, 主要静脉应用甲基强的松龙 80~320 mg/d, 其中 2 例因症状加重采取冲击治疗, 给予 320 mg, 2 次/d, 维持 2~3 d。8 例患者均早期即给予鼻导管吸氧, 其中 7 例因出现严重呼吸困难, SaO₂ < 0.93 而采取无创通气治疗, 予持续气道内正压 (CPAP), 水平为 0.4~1 kPa, 平均为 0.6 kPa, 人机连接方式为鼻面罩或口鼻面罩。3 例合并心肌梗死患者均同时给予硝酸甘油扩血管、利尿剂及西地兰强心治疗; 2 例合并糖尿病患者在应用激素后血糖明显增高而给予胰岛素治疗; 1 例合并肺结核者同时应用抗结核药物。8 例患者中治愈出院 3 例, 其中 2 例年龄 < 50 岁; 死亡 5 例, 其中 3 例合并心肌梗死冠脉支架植入术者出现左

心功能障碍, 给予强心、利尿和扩冠等治疗, 症状仍无改善, 因循环衰竭而死亡; 1 例合并糖尿病患者出现糖尿病酮症酸中毒、电解质紊乱、昏迷, 抢救无效死亡; 1 例伴有高血压慢性肾衰, 经无创通气后, 呼吸困难虽有改善, 但因肾衰加重, 治疗无好转, 逐渐发展至 MODS 而死亡。死亡患者中 4 例年龄为 60 岁以上, 1 例为 57 岁。

2 讨论

SARS 是一种烈性传染性疾病, 且病情进展快, 特别是重症患者病情瞬息万变, 因此应密切观察, 了解患者的病情变化。治疗上主要采取综合性治疗措施, 即早期给氧, 对症治疗, 糖皮质激素联合抗病毒及抗生素治疗。国内一些文献报道, SARS 死亡的主要危险因素中包括年龄 > 50 岁及伴有冠心病、糖尿病和慢性阻塞性肺疾病等基础疾病^[2], 与本组观察结果基本一致。提示 SARS 老年患者及合并基础疾病者, 其病情更易转化为重症而增加死亡的危险性。因此, 对于 SARS 的治疗, 尤其是年龄 > 50 岁、伴有基础疾病者, 更要给予高度重视, 密切监测肝肾功能、心功能、心电图、心肌酶、电解质和血气分析等指标变化, 加强对基础疾病的救治, 以降低死亡的危险。此外, 在激素使用方面, 若应用不当或滥用也可产生严重后果。因此, 在 SARS 治疗中使用激素应严格掌握指征, 同时要注意防范严重不良反应的发生。

参考文献

- 1 中华人民共和国卫生部. 传染性非典型肺炎临床诊断标准. 中华人民共和国卫生部办公厅, 2003-05-03
- 2 陆伟, 张洪生, 王凤梅, 等. 重症 SARS 治疗中的有关问题. *天津医药*, 2003, 31(9):566-568

(2003-11-06 收稿 2004-04-20 修回)

作者单位: 300170 天津市第三中心医院内科