

## 双水相电泳分离蛋白质的研究

黎四芳 丁富新 袁乃驹

(清华大学化学工程系 北京 100084)

近几年来,随着生物技术的迅速发展,制备型电泳技术的研究得到了重视。然而由于技术上的原因,大规模的制备型电泳技术的研究还未能取得突破。阻碍电泳放大的一个主要问题是由于电加热作用而导致的热对流对电泳分离的破坏。为解决这一问题,人们提出了许多方法。例如,在太空的微重力环境下进行电泳<sup>(1)</sup>,应力稳定自由流动电泳<sup>(2)</sup>,循环等电聚焦和区带电泳<sup>(3)</sup>,色谱电泳<sup>(4)</sup>和等电膜等电聚焦<sup>(5)</sup>等。这些方法在电泳放大上都取得了一定的进展,但各有其局限性。最近,Clark<sup>(6)</sup>提出利用双水相的液液界面阻止热对流的设想,为开发大规模的制备型电泳技术开辟了一条新途径。Raghava Rao<sup>(7,8)</sup>等在两种双水相体系上施加电场后成倍地缩短了分相时间。Levine 和 Bier<sup>(9)</sup>采用 U 型管电泳装置研究了双水相体系中血红蛋白的电泳迁移率,观测到界面有阻滞作用。Clark<sup>(6)</sup>在柱型电泳装置中进行了一组双水相萃取肌红蛋白的简单实验。在 10mA 的恒电流下电泳 40min 之后,肌红蛋白的分配系数为 7.5,而当电场反向后,分配系数变为 0.04,界面阻力并不显著,两者结论并不一致。

本文提出了一种新型的双水相电泳装置并进行了双水相电泳分离肌红蛋白和牛血清白蛋白和细胞色素 C 及其混合物的实验,研究了电场方向、pH 值、电场强度和电泳时间对双水相萃取分离效果的影响,并与不加电场的双水相萃取的结果进行了比较。

### 1 材料和方法

#### 1.1 实验装置

实验装置如图 1 所示。电泳槽由有机玻璃加工制成,分为三个腔室:两个电极室和一个分离室。三个腔室横向水平排列。腔室长 0.017m,宽 0.017m,高 0.06m。腔室上开有直径为 0.01m 的连接孔。电极室和分离室之间的连接孔用离子交换膜隔开。电极室中含有铂电极。通过恒流泵使缓冲液从缓冲液贮瓶循环流过两电极室。电极缓冲液中不含蛋白质和成相高聚物。分离室中装有用与电极室相同的缓冲液配制的蛋白质和双水相体系混合物。实验过程中,保持三室液面完全相平,压力完全相同。电泳槽浸入温度为 288K 的恒温水浴中以移去电泳过程中产生的热量。稳压直流电源为 DYY-2 型稳压稳流电泳仪。

#### 1.2 实验材料

双水相体系由 3.8% 聚乙二醇 (PEG8000) 和 5.5% 葡聚糖 (dextran T-500) 组成。蛋白质为肌红蛋白 (pI6.99) 和牛血清白蛋白 (pI4.9) 和细胞色素 C (pI9.8~10.1),均为 Sigma 产品。pH9.26, pH8.35

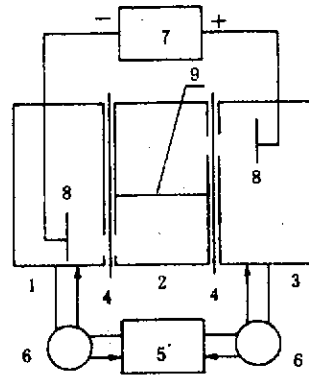


图 1 双水相电泳装置

1. 阴极室, 2. 分离室, 3. 阳极室, 4. 离子交换膜, 5. 缓冲液贮瓶, 6. 输液泵, 7. 电源, 8. 铂电极, 9. 双水相界面

和 pH6.99 的缓冲溶液由 0.02mol/L 的三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 和甘氨酸组成。pH5.22 的缓冲溶液由 0.01mol/L 的 Tris 和醋酸组成。蛋白质溶液分别由缓冲溶液配制而成。对于单一蛋白质, 采用浓度为 0.5kg/m<sup>3</sup>, 而对于两种蛋白质混合物, 每种蛋白质浓度为 0.25kg/m<sup>3</sup>。

### 1.3 实验方法

每次实验时, 首先将充分混合均匀的蛋白质和双水相体系混合物注入分离室中, 然后立即施加一定的电场强度。电泳几分钟后, 出现明显的双水相界面。经过指定的电泳时间之后, 分别用吸管取出上下相。由于双水相电泳是速率控制过程, 而不是平衡过程, 蛋白质在每一相内的分布是不均匀的。因此, 实验结束时, 尽可能将每一相全部取出。

### 1.4 分析测试

蛋白质和双水相体系混合物的电导率由 DDS-11A 型电导率仪测量。根据初始电导率和电流密度可确定电场强度。蛋白质的浓度由 53Wb 型紫外-可见分光光度计分别在 410nm 和 280nm 下测量, 根据吸光度的加和性, 可求得每种蛋白质浓度。

## 2 实验结果

### 2.1 电场方向和 pH 的影响

在电场的作用下, 肌红蛋白的分配系数与电场方向和 pH 的关系如图 2 所示。实验是在一定的电场强度和一定的电泳时间下采用等体积的双水相体系进行的, 不加电场时, 肌红蛋白稍微倾向于下相, 在两相的分配结果也显示于图 2。可见, 根据电场方向和 pH 不同, 肌红蛋白能任意地被迁移至上相或下相。

### 2.2 电泳时间的影响

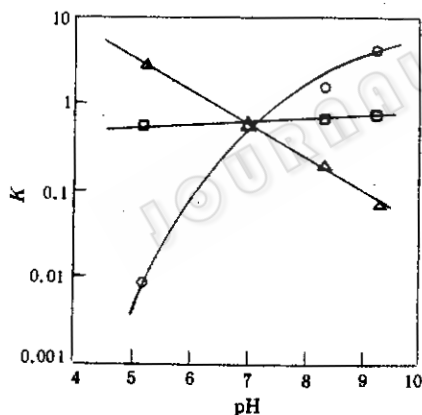


图 2 分配系数随电场方向和 pH 的变化

电场强度 24.0V/cm, 电泳时间 40min

□E=0, ○阳极在上, △阴极在上

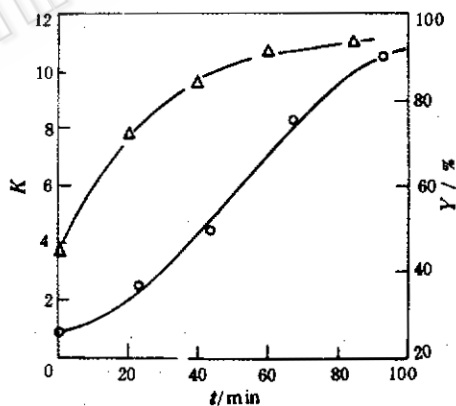


图 3 分配系数和上相收率随电泳时间的变化

电场强度 24.0V/cm, pH9.26, 阳极在上

○分配系数, △上相收率

在电场强度为 24V/cm、pH9.26 以及上电极为阳极的条件下, 肌红蛋白的分配系数和上相收率随着电泳时间的延长而增大, 如图 3 所示。电泳 80min 之后, 肌红蛋白的分配系数已改变一个数量级以上, 上相收率已达 90% 以上。

### 2.3 电场强度的影响

在 pH9.26、电泳时间为 40min 以及上电极为阳极的条件下, 肌红蛋白的分配系数和上相收率随着电场强度的升高而增大, 如图 4 所示。当电场强度低到 4.8V/cm 时, 也能使肌红蛋白向上相迁移, 即使电场强度高达 48.1V/cm, 界面处也不发生热对流和返混, 表明双水相界面具有强的抗热对流特性。在 48.1V/cm 的电场强度下电泳 40min 之后, 肌红蛋白的分配系数从 0.81 变为 38.7, 上相收率从

44.7%增高为 98.0%。

#### 2.4 蛋白质混合物的分离

在电场强度 24.0V/cm, pH 分别在 5.22, 8.35 和 9.26 的条件下进行了双水相电泳分离肌红蛋白和牛血清白蛋白以及细胞色素 C 和牛血清白蛋白混合物的实验。电泳时间固定为 40min, 结果列于表 1 和表 2。无电场作用下双水相萃取的分离因子接近于 1, 分离效果不好。而施加电场强度 24.0V/cm, 电泳 40min 之后, 分离因子远远偏离于 1, 从而大大改善了分离效果。

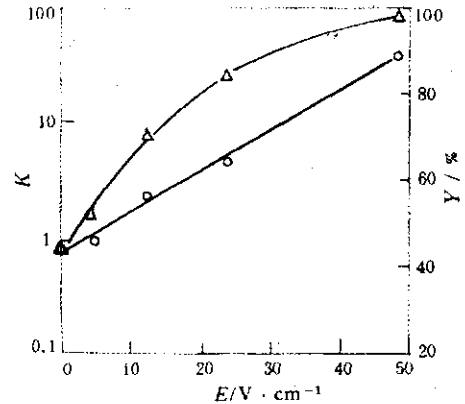


图 4 分配系数和上相收率随电场强度的变化  
电泳时间 40min, pH9.26, 阳极在上  
○分配系数, △上相收率

表 1 肌红蛋白和牛血清白蛋白的分离

$E/V \cdot cm^{-1}$	上电极	pH	$K_A$	$K_M$	$\alpha$
0		5.22	0.550	0.6	0.917
24.0	+	5.22	0.906	0.0289	31.3
24.0	-	5.22	0.475	1.81	0.262

表 2 细胞色素 C 和牛血清白蛋白的分离

$E, V \cdot cm^{-1}$	上电极	pH	$K_A$	$K_M$	$\alpha$
0		9.26	0.227	0.403	0.563
24.0	+	9.26	1.44	0.337	4.27
24.0	-	9.26	0.0834	0.578	0.144
0		8.35	0.286	0.475	0.602
24.0	+	8.35	0.933	0.435	2.14
24.0	-	8.35	0.108	0.852	0.127

### 3 讨论

在双水相电泳过程中, 蛋白质的迁移速率与电场强度和电泳迁移率成正比。pH 距等电点越远, 蛋白质所带的净电荷越多, 电泳迁移率越大。但是, 带不同电荷的蛋白质分子之间的相互作用使电泳迁移率变小, 这在细胞色素 C 和牛血清白蛋白的分离过程中表现较为明显。

从我们的实验结果来看, 一方面, 双水相界面对扩散和对流的阻力是相当大的, 可以完全抑制热对流对电泳分离的破坏; 另一方面, 双水相界面对电迁移的阻力并不显著, 在一定的电场强度下电泳若干时间就可以克服。Levine 和 Bier<sup>[9]</sup>采用的是 U 型管电泳装置, 两电极之间的距离较长, 实际上施加在双水相界面上的电场强度较低, 同时, 他们还采用了两相差较大的双水相体系, 因而不易于在逆浓度梯度下迁移穿过相界面。另外, 缓冲溶液和缓冲容量的影响也较大。我们在实验中曾经观察到, 当缓冲容量较小时, pH 变化较大, 从而改变了蛋白质的带电量甚至带电性, 蛋白质也容易在双水相界面处聚焦。

尽管 Clark<sup>(6)</sup>得出的两个分配系数不是在恒电场强度下的结果,与本文的工作还是一致的。但柱型装置存在着严重的缺点:两电极室与分离室纵向排列,不仅电极室中产生的气体不易排出,而且造成各室压力不同,电极室溶液向分离室渗透,导致 pH 值变动,从而影响蛋白质的带电性。本文的实验装置两电极室和分离室横向水平组合,既有利于气体的排出,又可使三室液面相平,保证各室压力完全相等,能较好地实现电泳和双水相萃取的结合。

### 符号说明

$E$ ——电场强度/ $V \cdot cm^{-1}$

$K$ ——分配系数

$t$ ——电泳时间/min

$Y$ ——上相收率/%

$\alpha$ ——分离因子

下角标

A——牛血清白蛋白

M——肌红蛋白

### 参 考 文 献

- [1] Snyder R. S. Rhodes P H, Micale T Y. *Sep Sci Technol*, 1986, **21**: 157~161.
- [2] Ivory C F. *Sep Sci Technol*, 1988, **23**: 875~912.
- [3] Ivory C F. *Electrophoresis*, 1990, **11**: 919~922.
- [4] O Farrell P H. *Science*, 1985, **227**: 1586~1588.
- [5] Chiari M. *Electrophoresis*, 1994, **15**: 953~959.
- [6] Clark W M. *Chemtech*, 1992, **22**: 425~428.
- [7] Raghva Rao K S M S, Stewart R M, Todd P. *Sep Sci Technol*, 1990, **25**: 985~989.
- [8] Raghva Rao K S M S, Stewart R M, Todd P. *Sep Sci Technol*, 1991, **26**: 257~262.
- [9] Levine M L, Bier M. *Electrophoresis*, 1990, **11**: 605~611.

## Protein Separation by Aqueous Two-phase Electrophoresis

Li Sifang Ding Fuxin Yuan Naiju

(Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084)

**Abstract** By applying an electric field between the interface of a polyethylene glycol/dextran aqueous two-phase system, proteins have been directed into one phase and then the other by simply reversing polarity. Effects of polarity, electric field strength, pH and electrophoresis time on partition coefficients of the proteins were determined. Partition coefficient of myoglobin changes from 0.81 to 38.7 and top phase recovery from 44.7% to 98% with 48.1V/cm applied for 40 min. A separation factor of 31.3 was obtained from myoglobin and bovine serum albumin mixture with 24.0V/cm applied for 40min.

**Key words** Aqueous two phase partition, electrophoresis, bioseparation, protein