

红细胞膜蛋白的 SDS 凝胶电泳分析¹⁾

王 壮 李小兵 王苏生

(中国科学院遗传研究所,北京)

高等动物的红血细胞是没有细胞核的高度分化的细胞。由于取材方便,分离和纯化膜的手续简便,所以被广泛采用作为膜生物学的材料^[2]。

在细胞膜的结构成分中,蛋白质占有重要地位。膜蛋白不仅包括多种特异的酶类和受体,而且还包含某些遗传标记物(如组织相容抗原)。它的组分的差异在某种程度上反映了细胞的分化情况。在蛋白质化学的研究中,凝胶电泳是广为采用的技术^[3],为了获得纯化的膜蛋白作为抗原,我们用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析测定了几种动物红细胞膜蛋白的分子量和相对百分组成,并对 SDS 凝胶电泳测定膜蛋白分子量的方法进行了讨论。

材 料 和 方 法

红细胞膜取材于人、普通绵羊、狗、家兔和豚鼠。

作为分子量参照物的牛血清白蛋白为上海牛奶公司出品; γ -球蛋白为本实验室自己提取(硫酸铵四次沉淀的兔 γ 球蛋白);醛缩酶为德国 Combithek 公司出品;核糖核酸酶为英国 Light 公司出品;细胞色素 C 为美国 Sigma 公司出品;丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺为本实验室用工业制品纯化^[1]。

红细胞膜的制备

参照 Stech 等的方法^[4],保存在阿瓦氏液中的新鲜血液或用肝素抗凝的新鲜血液加3—4倍体积生理盐水洗涤三次以上。沉积的红细胞按 1:40(v/v)加入 10 mM Tris-HCl pH 7.2 低渗缓冲液,于 4°C 放置过夜,然后 25,000 g 4°C 离心 30 分钟,收集膜沉淀。再反复用上述低渗缓冲液

洗涤并离心 4—8 次,至膜制品为白色。用改良过的 Lowry 法^[5]测定膜制品的蛋白含量。

红细胞膜的解离

取蛋白浓度为 3—6 mg/ml 的膜制品 0.75 ml,加入制样液 0.25 ml(制样液含 4% SDS, 40% 蔗糖, 40 mM EDTA, 160 mM 二巯基苏糖醇的 pH 7.4 40 mM Tris-HCl 缓冲液其中二巯基苏糖醇可用 5% 巯基乙醇代替),在 37°C 保温 30 分钟,此时膜制品为澄清透明溶液。加入一滴 1% 溴酚蓝作电泳指示染料,直接用于电泳。

膜蛋白的电泳

电泳系统如下:分离胶浓度 5.6%,交联度 40:1.08,含 40 mM Tris, 20 mM NaAc, 2 mM Na₂EDTA, 0.1% SDS, 用 HAc 调 pH 至 7.4;浓缩胶浓度 3%,交联度 40:1.08,含 20 mM Tris, 3 mM NaAc, 0.1% SDS, 用 1 N HCl 调 pH 至 5.5;上槽缓冲液含 30 mM 巴兆妥, 8.3 mM Tris, 0.1% SDS, pH 7.0;下槽缓冲液含 40 mM Tris, 20 mM NaAc, 2 mM Na₂EDTA, 0.1% SDS。

在电泳中,加样量为 8—10 μ g 膜蛋白/mm² 加样面;电压梯度为 10—12 V/cm 胶长/电流密度 0.1 mA/mm² 胶截面;电泳时间约 3—4 小时。

电泳完毕后,将凝胶置于含 0.25% 考马斯亮兰 R250、40% 甲醇、10% 冰乙酸的染色液中,30°C 染色一小时左右。在 10% 甲醇-7% 冰乙酸脱色液中脱色 10—12 小时。再用上述染色液重新染色一小时左右,以后再脱色,至本底完全透明。

Wang Zhuang et al.: Analysis of Erythrocyte Membrane Proteins on SDS-polyacrylamide Gel Electrophoresis

1) 本实验承科学院感光研究所马金石等同志提供扫描仪,协助扫描,表示感谢。

有保留价值的凝胶,在含有 10% 甘油的脱色液中浸泡 4 小时以上,夹在两层玻璃纸之间,固定在适当大小的瓷板或玻璃板上,37℃ 干燥 24—26 小时。干版可长期保存。电泳完毕后,按公式 (1) 算出标准蛋白和被测样品蛋白的相对迁移率 R_m 。

$$R_m = \frac{D_x \cdot L_1}{L_2 \cdot D_0} \quad (1)$$

D_0 为未染色凝胶中指示染料的迁移距离, D_x 为染色后凝胶中蛋白区带的迁移距离。 L_1 为染色前凝胶长度, L_2 为染色后凝胶长度^[1]。

结果和讨论

从人和几种动物红细胞膜蛋白的电泳图谱(见图 1)可以看出,几种不同来源红细胞的膜蛋白都具有 6 个相应的主要组分,其中组分 I、II、V、VI 具有相似的迁移距离;而组分 III 和 IV 的迁移距离则按人、羊、狗、豚鼠的顺序依次递减,反映出分子量的递增。从图谱上可以看到羊的膜蛋白多出一个含量相当高的组分,而人

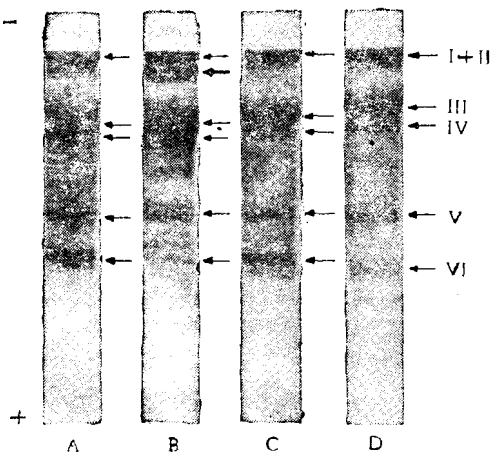


图 1 红细胞膜蛋白 SDS 凝胶电泳图谱

A. 人; B. 羊; C. 狗; D. 豚鼠的红细胞。箭头指出膜蛋白主要组分。B 右侧粗箭头指出羊的红细胞膜上的特异组分(电泳条件见材料方法部分)。

和其它动物的膜蛋白中与它对应的组分则含量很低。

为了估计这些膜蛋白组分的分子量,取牛血清白蛋白, γ 球蛋白, 醛缩酶等已知分子量的

蛋白作为参照物进行分子量测定^[2,6]。分子量测定参照物的电泳图谱见图 2。

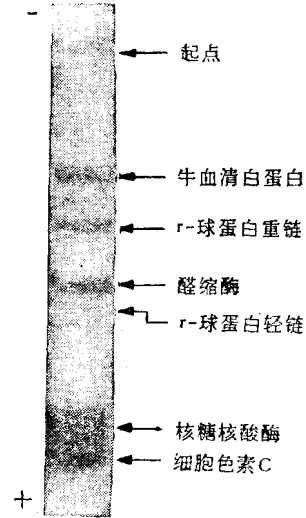


图 2 标准蛋白的电泳图谱(电泳条件同图 1)

把各个参照蛋白的迁移距离代入上面的公式(1),计算各蛋白的相对迁移率 R_m 。结果见表 3。

以分子量的对数 ($\log MW$) 为横坐标,相对迁移率 (R_m) 为纵坐标作图,结果如图 3。可以看出,分子量对数和 R_m 呈直线关系,只有 γ 球蛋白轻链和醛缩酶略有偏移。

表 1 分子量测定参照物的电泳结果¹⁾

蛋白质	分子量	泳动距离(D_x) (mm)	相对迁移率 (R_m)
牛血清白蛋白	68,000	29.5	0.327
γ -球蛋白重链	50,000	38.0	0.422
醛缩酶	39,500	51.5	0.571
γ -球蛋白轻链	25,000	55.0	0.610
核糖核酸酶	13,700	82.5	0.915
细胞色素 C	11,700	88.5	0.982

1) $L_1 = 93\text{mm}$, $L_2 = 101\text{mm}$, $D_0 = 83\text{mm}$ 。

根据图 3 中直线的纵截距和横截距,可以导出方程:

$$\log MW = 5.2 - \frac{1.20}{1.04} \cdot R_m \quad (2)$$

将公式 (1) 及表 1 中 L_1 , L_2 , D_0 的数值代入方程(2),可得出方程:

$$\log MW = 5.2 - 0.0128D_x \quad (3)$$

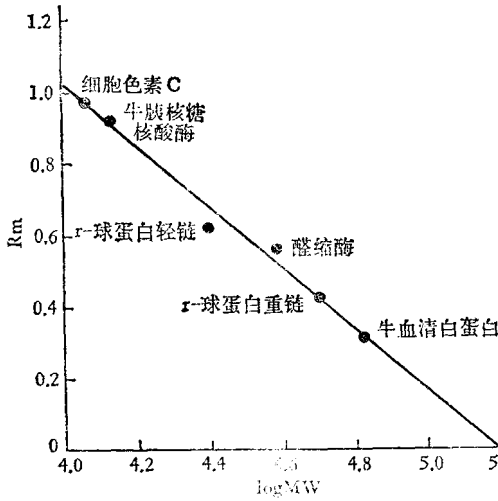


图3 参照蛋白的分子量-相对迁移率标准曲线

将各蛋白组分的迁移距离 (D_x) 代入方程 (3), 即可求出该组分的分子量。结果见表 4。

表 2 几种不同的红细胞膜蛋白主要组分的分子量

组分 ¹⁾	人	羊	狗	豚鼠
I+II	288,000	288,000	286,000	286,000
III	85,000	88,000	90,000	96,000
IV	73,000	76,000	78,000	82,000
V	50,000	50,000	50,000	50,000
VI	31,000	31,000	31,000	30,000

1) 见图 1。

应当说明,在本文中方程(2)、(3)的常数部分是根据表 3 中列举的实验数据导出的。在其它的几次实验中虽然 L_1 、 L_2 、 D_0 、 D_x 的数值不尽相同,但用此法求得的分子量是一致的。

为了计算各组分的相对含量,将凝胶板在 595 nm 波长扫描,扫描图谱见图 4。对所得各峰的面积积分,可求出各组分的相对含量。结果见表 5。表 5 中数据表明,不同红细胞膜蛋白的百分组成不同。

实验过程中,我们曾对使用浓缩胶和不使用浓缩胶的结果进行比较。在未使用浓缩胶的情况下,加样量较大时常出现拖尾现象,妨碍含量较低的组分的检出。加浓缩胶后,分辨力显著改善,加样量较大时也能得到相当清晰的图谱,使对低含量组分的分析成为可能。加浓缩胶后测得的人红细胞膜蛋白的分子量与文献报道的未加浓缩胶测得的分子量^[6]基本一致。

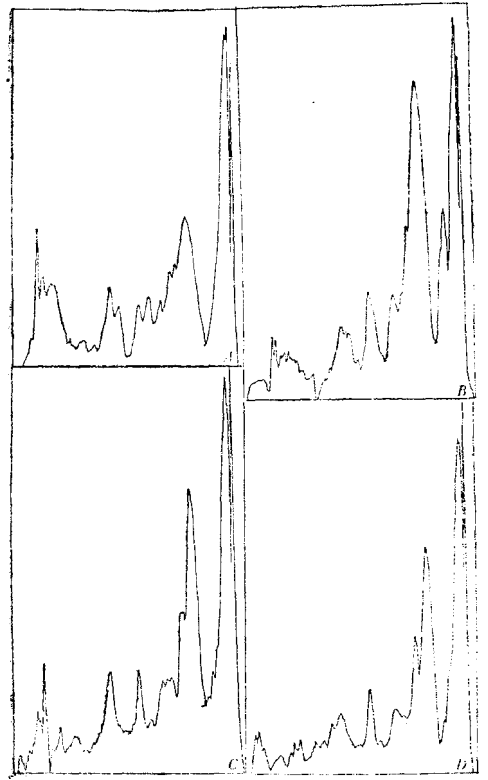


图 4 几种动物红细胞电泳的扫描图谱

A. 人; B. 羊; C. 狗; D. 豚鼠。
考马蓝染色后在 590 mμ 扫描,从右到左为电泳方向。

表 3 几种不同红细胞膜蛋白主要组分的相对百分含量¹⁾

组分	人	羊	狗	豚鼠
I+II	30.2	25.1	33.6	32.6
III	28.8	34.4	30.0	22.6
IV	9.6	10.4	9.5	9.9
V	6.7	5.1	6.4	6.4
VI	7.6	7.7	8.3	9.7

1) 根据图 1 电泳图谱扫描积分计算结果。

在 SDS 存在时,温度对染色效果有明显影响,在 30°C 染色和脱色比在 10°C 下为好,重复染色也比一次染色效果更好。

参考文献

- [1] 莽克强、徐乃正、方荣祥编: 1975. 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 科学出版社, 27-71页。
- [2] Marchesi, V. T., H. Furthmayr: 1976. *Ann. Rev. Biochem.*, 45: 667.
- [3] Shapirs, A. L., et al.: 1967. *Biochem. Biophys. Res. Commn.*, 28: 815.
- [4] Stech, T. L., et al.: 1970. *Science*, 168: 255.
- [5] Hartree, E. F.: 1972. *Anal. Biochem.*, 48: 422.