

低电内渗琼脂糖研究进展*

REVIEW ON LOW ELECTROENDOSMOSIS AGAROSE STUDIES

刘力¹ 苑全云² 李智恩¹

(¹中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

(²青岛海洋渔业公司 266001)

现代生物技术工业是上个世纪末和本世纪初迅速发展起来的新兴产业,它的发展必然对生物介质提出了更高要求。电泳、色谱、免疫电泳等生物学技术都需要电中性或接近电中性的介质。因为介质中过多的电荷使凝胶在直流电场下产生对流,影响被测物质的迁移和分离,直接表现为电内渗(Electroendosmosis)和蛋白质吸附。琼脂糖是近似理想的凝胶基质,适用于生物聚合物的扩散和电动力学移动过程。琼脂糖凝胶比较透明,抗对流,对生物无作用,具有控制离子的作用^[1]。在生物聚合物扩散和电动力学移动过程的应用上,琼脂糖的局限性和琼脂糖的广适性反映了它们化学结构上的特点,而应用与化学结构之间有着密切的因果关系。琼脂糖是由不含或硫酸基含量最低的琼脂糖分子和中等含量的乃至最大含量的硫酸基酸性糖分子构成的连续复合物。电泳时,琼脂糖所含硫酸基等带负电荷的基团引起电内渗和蛋白质吸附。琼脂糖是琼脂中的近中性组分,仍然含有少量硫酸根、丙酮酸根等带负电的基团,电内渗是琼脂糖的重要质量标准之一,它在一定程度上反映了琼脂糖凝胶带负电荷的量。电内渗对电泳,尤其是对等电聚焦电泳的影响很大。低电内渗琼脂糖被广泛用作各种电泳和分子筛电泳的稳定介质。

1 电内渗的原理及测定

电内渗是中性或接近电中性的样品分子在含有带电基团的介质中电泳时,介质中的水向一极强烈地迁移。比如用琼脂糖作电泳介质时,琼脂糖中含有的硫酸基、丙酮基等带负电荷的基团使琼脂糖凝胶带负电荷。电泳时,在电场力的作用下,凝胶本身虽然不向正极移动,但凝胶中的水在水合氢离子的作用下向阴极移动,样品中的中性分子随着水也向阴极移动。电内渗使电泳过程变得复杂起来,更重要的是电内渗产生静水压头(Hydrostatic pressure heads),使一端电极有水渗出,另一端电极的水越来越少,破坏了凝胶结构,

打破了电泳场的均一性。

在碱性巴比妥缓冲液中电泳时,点在凝胶板上的葡聚糖(Dextran)离开电泳起点向阴极移动的距离用OD表示,点在同一块凝胶板上的人的血清白蛋白(Human albumin)离开电泳起点向阳极移动的距离用OA表示,电内渗的大小就可用 $-m = \frac{OD}{OA + OD}$ 表示^[2]。因为在碱性巴比妥缓冲液中,葡聚糖和人的血清白蛋白电泳方向相反,所以公式左边带一个负号。在pH=4~9之间,电内渗受pH值影响很小,但缓冲液成分、浓度,凝胶种类、浓度、化学成分以及凝胶使用时间对电内渗影响都不能忽略。而且值得注意的是,电内渗值在凝胶刚刚形成起初的几个小时内略微增大,在24h后则趋于稳定。

2 降低电内渗的方法

根据凝胶电泳产生电内渗的原理,可以采取一些方法,人为地降低凝胶的电内渗,大致分为以下3类。

2.1 聚合添加剂法

向凝胶中加入聚合添加剂,提高凝胶黏度从而降低电内渗。在沸水浴中向1.5%的琼脂糖溶液中加入不同浓度的马铃薯淀粉时,含1%马铃薯淀粉的凝胶的电内渗是含2%马铃薯淀粉的凝胶电内渗的一半。这说明提高凝胶中马铃薯淀粉浓度不能使电内渗无限降低。简单的黏度效应无法解释为什么水的迁移比人的血清白蛋白的迁移剧烈。但是,如果把淀粉颗粒看作是水扩散的障碍物,淀粉颗粒就会在亚显微水平上引起水的回流,从而降低水在水合氢离子的作用下向阴极的移动,降低电内渗。用电泳方法分离血清中血清白蛋白和 γ -球蛋白时,在琼脂糖凝胶中加入

* 国家 863 计划资助项目 819-07-05 号。

收稿日期:2000-04-29;修回日期:2000-06-05

马铃薯淀粉可以使两者的电泳距离相差更大,但其他成分电泳距离保持不变。加入刺槐豆胶或瓜耳胶也可以达到降低等电内渗的目的^[3]。

2.2 化学修饰法

在等电聚焦电泳中,通常以季铵盐作反应剂,采用向琼脂糖凝胶中引入正电荷基团的化学修饰法降低电内渗^[4]。这种方法的特点在于正电荷基团中和了凝胶中的负电荷。季胺基中与氮原子相连的3个基团既可以相同,也可以不同,还可以与氮原子形成杂环(在杂环上与氮原子相隔两个碳原子的位置上可以是氧原子)。当季胺基是引入物中唯一的正电荷基团时,电性在pH=2~12范围内保持不变,季胺基通过醚键或羧酸酯键与琼脂糖羟基上的氧原子相连。pH值不同,正电荷基团的引入程度也不同。在反应剂中,与引入的正电荷基团相对应的负离子可以是有机离子,也可以是无机离子,例如氯离子,硫酸根离子,或其他有机酸根离子,琼脂糖本身含有的负离子也可以作为对应的负离子。引入物中除了胺基外,最好不含其他氮原子。经过化学修饰的琼脂糖因为具有多孔性和大网络结构,所以用于等电聚焦电泳时聚焦速度快于聚丙烯酰胺等电聚焦电泳,可用于聚焦更大的蛋白质分子。与聚丙烯酰胺凝胶电泳相比,省略了聚合步骤,不使用有毒物质,可重复使用。这些优点使化学修饰后的琼脂糖凝胶比聚丙烯酰胺凝胶更具优越性。

2.3 纯化分离法

产生电内渗的根本原因是电泳介质中或多或少的含有带电基团,去除介质中含带电基团的组分才是消除电内渗最根本的方法。琼脂糖的电内渗之所以小于琼脂原因在于,琼脂糖是从琼脂中分离出的近中性组分,以二糖作为结构单元,琼脂糖的典型分子式可以写为 $[C_{12}H_{14}O_5(OH)_4]_n$,琼脂糖二糖(Agarobiose)由 β -D半乳糖(β -Dgalactopyranose)和3,6-内醚-L半乳糖(3,6-anhydro-Lgalactose)组成。琼脂糖的糖链上常含有甲氧基、硫酸基、丙酮酸基等取代基,取代的类型和数量与海藻种类、生长环境有关^[5]。Takano等1995年报道,从江藻中提取的琼脂通常在 β -D半乳糖和3,6-内醚-L半乳糖上含有甲氧基。如果分离不完全,琼脂糖中残留的硫酸基、丙酮酸基引起相当大的电内渗。要想降低电内渗,就应尽量去除琼脂或琼脂糖中的带电荷较多的极性组分,主要是硫酸根含量较高的酸性组分。

2.3.1 乙酰化法

乙酰化法利用高硫酸根酸性组分与中性琼脂糖

乙酰化后在同一溶剂中溶解度的差异将两者分开。然后在乙醇中,利用皂化反应将乙酰化琼脂糖的乙酰基去掉,调节溶液pH值至中性,过滤即可得再生的琼脂糖。但是所得的琼脂糖因乙酰化过程而被降解,而且颜色是棕色的。

2.3.2 季铵盐沉淀法

用季铵盐作选择性沉淀剂将高硫酸根酸性组分沉淀,分离出琼脂糖的方法可以避免或降低因乙酰化过程引起的琼脂糖的降解和变色。但最大的困难就是无法将复聚物从琼脂糖溶液中分离出去,而且情况随琼脂原料不同而变化。多数情况下产生乳状沉淀,难以用离心或过滤的方法分离,加热或加盐也无法有效地把两者分离。

2.3.3 共沉淀法

共沉淀法对季铵盐法作了进一步改进。向琼脂糖溶液中加入比高硫酸根酸性组分硫酸根含量更高的、可溶性硫酸多糖,例如卡拉胶(Carrageenan),然后加入季铵盐。利用高硫酸根酸性组分与卡拉胶的共沉淀分离出琼脂糖^[6]。由于高硫酸根酸性组分和卡拉胶在季铵盐作用下形成絮状沉淀,易于分离。此方法制出的琼脂糖的灰分<1%,硫酸钡重量法测出的硫酸根含量在0~0.5%之间。加入卡拉胶的重量是琼脂重量的20%左右,最低不少于10%,最高不多于30%。根据琼脂的硫酸根含量,加入卡拉胶的量及其硫酸根含量确定加入的季铵盐的量。通常情况下,加入的季铵盐的量是琼脂溶液重量的10%~60%。如果原藻的硫酸根含量很低,提取出的琼脂的凝胶强度很大,可以考虑省略冷冻、融化、洗涤、干燥、粉碎步骤,直接由原藻利用共沉淀法提取琼脂糖,从而简化操作步骤,降低生产成本。目前此方法已被用于商品化生产琼脂糖。直接利用共沉淀法提取琼脂糖步骤简便,但对原料要求过高,一般原藻的质量达不到以上要求,所以此方法局限性很大。

2.3.4 果胶酶降解法

用果胶酶(Pectinase)降解高硫酸根酸性组分,使之变成水溶性的,从而选择性地使高硫酸根酸性组分从琼脂中分离出来^[7],剩下的就是琼脂糖。

2.3.5 聚乙二醇沉淀法

共沉淀法和果胶酶降解法虽然都是选择性地使高硫酸根组分从琼脂中分离出来,但是加入的物质残留在琼脂糖中成为杂质,影响了分离效果,降低了琼脂糖的纯度。聚乙二醇沉淀法克服了以上缺点^[8]。琼脂糖不溶于醇的水溶液,而高硫酸根酸性组分在醇的

水溶液中的浓度高于在原琼脂复合物中的浓度。醇沉淀法利用高硫酸根组分和琼脂糖在同一溶剂中溶解度的差异把两者分开。适合作琼脂糖沉淀剂的聚乙二醇分子量变化范围很窄。因为低分子量聚乙二醇沉淀出的琼脂糖更易分离,所以低分子量聚乙二醇(600~1500)比高分子量聚乙二醇更具优势。聚乙二醇分子量上限受分离时溶液黏度的限制。一般情况下,分子量在4000~8000的聚乙二醇沉淀效果比较好,分子量6000左右时沉淀效果更好。聚乙二醇和水溶液混合速度、温度、水溶液的离子强度都会影响沉淀效果。聚乙二醇沉淀法提取的琼脂糖灰分、硫酸根、丙酮酸含量、电内渗明显降低,在较低的温度下就可以溶于水。此外,还可以用低分子量亚烷基醇或烯化醇、低分子量链烷醇作沉淀剂。但是,醇沉法不能将某些可溶性色素分离出来。

2.3.6 离子交换或吸附法

琼脂糖和高硫酸根酸性组分所含的带电基团数量不同,前者的极性明显小于后者。利用极性的差异将两者分离也是一种可行的和有效的分离途径。这种方法思路简洁明了,即采用不同的离子交换剂或吸附剂吸附高硫酸根酸性组分,然后再用极性不同的洗脱液将硫酸基含量不同的琼脂糖洗脱。例如用阴离子交换树脂 DEAE 纤维素(乙酸型或柠檬酸型)^[9]或 DEAE Sephadex A50^[10] 吸附高硫酸根酸性组分。如果先用 EDTA 溶液预洗,然后加热溶解,加入 Al(OH)₃ 凝胶吸附高硫酸根酸性组分,由溶液制出的琼脂糖的硫酸根含量低,具有良好的电渗性质^[5]。离子交换剂或吸附剂在使用前要处理成某种形式,例如用 NaOH 和 HCl 将 DEAE Sephadex A50 处理成氯型 DEAE Sephadex A50。离子交换剂或吸附剂使用后可以采用同样的处理方法再生、重复使用,从而降低生产成本。离子交换或吸附法利用琼脂糖与高硫酸根酸性组分极性的差异将两者分离,洗脱剂的极性决定了洗脱组分的带电基团的含量,因而洗脱剂的种类、浓度及温度决定了琼脂糖产品的硫酸基含量。离子交换或吸附法以琼脂糖原料,可以分级制备出高纯度的琼脂糖产品,但步骤过于繁琐。

2.3.7 电渗析法

Gordon, Keil 和 Sebesta 1958 年首先注意到琼脂中的某种物质对短波紫外光 (Short U. V light) 有强烈的吸收,而且这种物质可以用电泳过程分离出去。Bockemüller 和 Certeer 1962 年利用琼脂的这种性质和电渗析原理设计了一种分离高硫酸根酸性琼脂糖的方

法。

此外还有二甲基亚砷 (DMSO) 法、二甲基甲酰胺 (DMF) 法、碘化钠法、壳多糖法、Acridol 法、雷万诺法、尿素法^[11]。

碱处理使琼脂分子中存在的一定含量的琼脂糖前体 D 半乳糖基-6 硫酸基-L 半乳糖转变成 D 半乳糖基-3, 6 内醚-L 半乳糖,降低琼脂的硫酸基含量^[11]。利用琼脂糖与高硫酸根酸性组分水溶性的差异,水洗或稀盐溶液洗(例如 EDTA 钠盐、三磷酸钠、磷酸盐缓冲液)除去高硫酸根酸性组分的方法简便易行。

往往用一种处理方法只能从琼脂中除去部分高硫酸根酸性组分,电内渗降低得不理想,常采用两种或两种以上方法的联合。联合法制出的琼脂糖与琼脂相比,电内渗显著降低。碱处理和水洗经常用作联合法的前处理。常见的联合法有水洗与离子交换联合法,醇沉淀与离子交换法,水洗与醇沉淀联合法。

3 应用与研究展望

3.1 低电内渗琼脂糖应用

3.1.1 电泳分析方面用作电泳凝胶,特别适用于等电聚焦电泳。在生物学和临床诊断等分析鉴定上,具有设备简单,操作容易,分析灵敏、快速、结果准确等优点。近年来已广泛应用于肝炎、肝癌及冠心病等的化验上。

3.1.2 在亲和层析方面,作为亲和层析的载体,用于分离、纯化或制备某些蛋白质、酶、抗原、抗体、核酸和激素等。

3.1.3 在分子筛层析(又称凝胶层析或凝胶过滤)中,珠状凝胶可用于多组分蛋白质或多糖等混合物的分离及其纯化、分子量测定。

3.1.4 用作微生物培养基及固相酶的载体。

3.2 在低电内渗琼脂糖的应用中存在的一些问题和应采取的措施

3.2.1 生物热敏物质在琼脂糖通常的凝固温度下会失去生物活性,凝固温度是琼脂糖应用的重要制约因素。琼脂糖的凝固温度受琼脂糖分子细致结构的影响,例如硫酸根含量和结合位置。提高琼脂糖中硫酸基的含量,可以降低凝固温度,但同时也会引起电内渗的增大和凝胶强度的降低,从而影响琼脂糖的应用。针对以上问题,可以依据琼脂糖凝固的机理,考虑采用化学修饰的方法得到低电内渗低凝固温度琼脂糖。即向低电内渗琼脂糖分子中引入某些中性基团,例如乙酰基、羟乙基、甲基基,既降低琼脂糖的凝固温度,又不增大琼脂糖的电内渗,而且琼脂糖的凝

胶强度达到实际应用的要求。

3.2.2 针对琼脂糖凝胶容易受压变形的致命弱点,采用交联技术使琼脂糖凝胶形成网状结构,提高其耐压性、耐热性和耐有机溶剂性。琼脂糖凝胶交联技术不断推新,可以采用不同的双功能试剂,在不同的反应条件下,使琼脂糖发生不同形式的交联,从而制成系列生化分离层析介质。而且还可以用不同方法多次交联,提高交联度,达到更高机械强度。生物技术的产业化使层析介质的需求量迅速增加。以前实验室制备规模小、成本高,无法满足大规模工业化生产的需要。因此琼脂糖凝胶今后的研究重点有两个:一是改进性能,使介质的机械强度和吸附量提高;二是降低造价,使介质变成廉价易得的物质。

生物分离介质是开展生物技术和产业化的“硬件”。国外对琼脂糖系列产品制备的研究起步远远早于我国,研制低电内渗琼脂糖对丰富国产生物分离

介质品种,乃至提高我国生化产品的国际竞争力都是十分有意义的。

主要参考文献

- 1 纪明侯.海藻化学.北京:科学出版社,1997.34,105,106~107
- 2 Kirkpatrick *et al.*. *USPatent* 4983268,1991.
- 3 Cook *et al.*. *USPatent* 4290911,1981.
- 4 Hansson *et al.*. *USPatent* 4312739,1982.
- 5 M. Tako *et al.*. *Botanica Marina*,1999,42:513-517
- 6 John Blethen, Rockland *et al.*. *USPatent*, 3281409,1966.
- 7 Morse *et al.*. *USPatent*, 3362884,1966.
- 8 Alfred Polson, Milneron, *USPatent*, 335127,1967.
- 9 Zabin *et al.*. *USPatent*, 3423396,1969.
- 10 Duckworth Yaphe. *USPatent*, 3753972,1973

(本文编辑:刘珊珊)