



等 电 聚 焦

何 忠 效

(中国科学院微生物研究所, 北京)

蛋白质分子是带有电荷的两性生物高分子, 其正、负电荷的数量是随分子所在环境的酸碱度而变化的。在电场存在下的一定 pH 缓冲液中, 带正电荷的蛋白质分子将向负极移动; 带负电荷的蛋白质分子将向正极移动, 这就是电泳过程。在某一 pH 下, 蛋白质分子在电场中不再移动, 即其净电荷为零, 则此 pH 值即为该蛋白质的等电点(pI)^[1]。

等电聚焦是在电解槽中放入载体两性电解质^[2], 当通以直流电时, 两性电解质即形成一个由阳极到阴极逐渐增加的 pH 梯度。若蛋白质存在于此体系中时, 则不同的蛋白质即移动并聚集于相当其等电点 pH 的位置, 并聚集成极窄的区带, 所以叫等电聚焦。

这种方法要求有稳定的 pH 梯度, 因此要有一种防止对流和已分离区带再混合的措施。根据所采取措施的不同, 可分为: ①密度梯度电聚焦: 这是经典的、最常用的方法。它既可用于准确测定蛋白质的等电点, 又可用于小量制备。本文着重叙述此方法。②聚丙烯酰胺凝胶电聚焦: 此法操作简单、分离迅速, 可同时作多份样品, 在分析比较研究方面很有用。而且此法便于与其他分离分析技术相结合, 从而可提高分辨力, 因此这种方法的重要性正在日益增加。③自由溶液电聚焦: 此法不加稳定介质, 而是采用机械方法来防止对流。又可分为自由区带电聚焦

及区带对流电聚焦两种。自由区带电聚焦是用慢慢旋转的电泳管或采用聚乙烯螺旋管来稳定对流, 前者用于微量分析, 后者可用于小量制备; 区带对流电聚焦是在蛇形管道中进行, 主要用于制备, 样品量可高达 1 克^[3]。

基本原理和方法

在直流电场中, 带正电荷的蛋白质分子向负极移动, 带负电荷的向正极移动。在普通电泳情况下, 电场中的 pH 是均一的、相对稳定

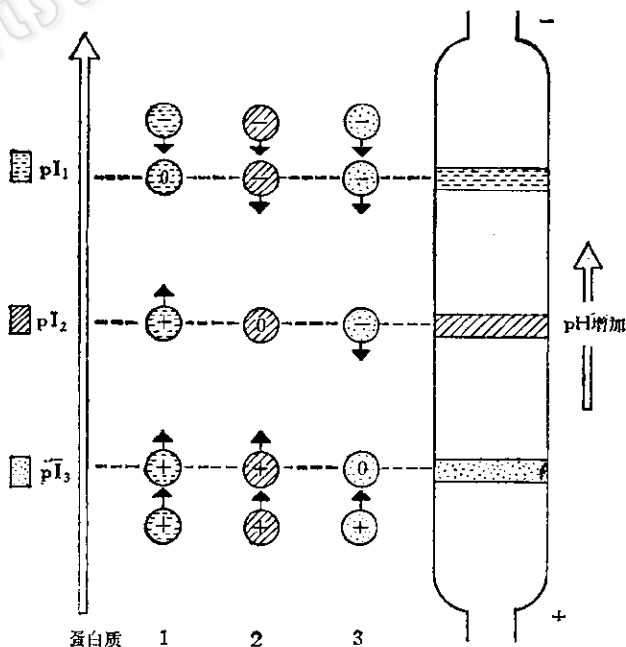


图 1 蛋白质在电场中等电聚焦示意图

的, 各种带电分子依其电荷符号的不同和数量多少的不同而向不同方向以不同速度移动。随

着电泳时间和所走距离的加长,由于分子扩散,区带越走越宽。而等电聚焦的主要特点是在电泳槽中加入很多种具有不同等电点的小分子两性电解质,构成一个从正极到负极 pH 逐渐增加的 pH 梯度。当蛋白质分子靠近正极时,处在低于其等电点的环境中,则带正电,向负极移动;反之则向正极移动,最后都聚集在相当其等电点的位置上,不再移动。测出各区带聚焦位置的 pH,便测出了它们的等电点。如图 1 所示。

一、pH 梯度

有人工 pH 梯度和自然 pH 梯度两种。前者是在电场中人为地加入具有不同 pH 的缓冲液互相扩散平衡以形成 pH 梯度,不够稳定^[4]。自然 pH 梯度是由电流本身所形成和排列的 pH 梯度,所以很稳定^[5]。形成自然 pH 梯度的物质,称载体两性电解质。

二、载体两性电解质

(一) 载体两性电解质的必备条件

载体两性电解质是一系列多氨基多羧酸的混合物^[2,6,7,8],对此载体两性电解质要求:

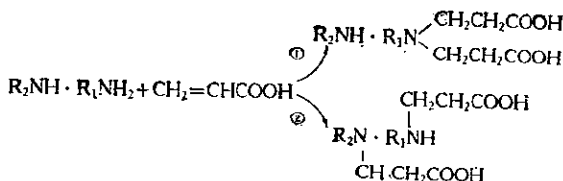
1. 能在电场中形成一个均匀、连续而稳定的 pH 梯度。
2. 要有足够大而较平均的导电性。
3. 在 280 毫微米处有较低的光吸收,且有较低的平均分子量,以利于蛋白质吸收峰的确认和分离。
4. 要有足够的缓冲能力,而又不与蛋白质发生相互作用。

(二) 载体两性电解质的合成

1. 合成原理:1966年, Vesterberg 和 Svensson 人工合成了载体两性电解质^[5,9,10],基本满足了对载体两性电解质的上述全部要求,从而大大推动了等电聚焦技术的应用。

用多乙烯多胺与丙烯酸加成,生成一系列多氨基多羧酸的混合物^[9]:

反应①、②同时进行, R₁ 和 R₂ 是氢或具有附加氨基的脂肪族基团。



这些多氨基多羧酸,由于 α - β 不饱和双键和脂肪胺上不同部位的氨基发生加成,而且由于酸和胺比例的不同,形成一系列具有不同氨基与羧基比例的混合物,从而得到一系列具有不同等电点(pI)值的多氨基多羧酸混合物。它们的 pI 值随着羧基与氨基比例的不同而分布在 pH3(大部分羧基的 pK 值)到 pH10(大多数碱性氨基的 pK 值)之间的不同区间。提高酸的量可加大载体两性电解质的低 pH 范围;提高胺的量,可加大载体两性电解质的高 pH 范围。

2. 合成举例^[11]:

(1) 合成:先在避光、通氮条件下,用减压蒸馏法进行原料纯化。丙烯酸:加 1% 对苯二酚,85℃ 水浴,25 毫米汞柱,沸程 62—68℃。四乙烯五胺:20 毫米汞柱,沸程 203—205℃。合成反应在一个四口瓶内进行。四口瓶加水封搅拌,外侧三个口分别放温度计(水银球部分应浸于反应液面下)、滴液漏斗和回流冷凝管(从管中心通入一个长玻璃管,下端插入反应液内,以备通氮)。将整个装置用黑布罩上(或在暗室中进行)。

加入 84 毫升四乙烯五胺(50% 水溶液,内含 1—2 克 NaH₂PO₄)于四口瓶内,烧瓶外用水浴加热,搅拌,通氮气,待反应液温度升至 55℃,开始慢慢滴加 80 毫升丙烯酸(50% 水溶液)。氨基数与羧基数之比为 2:1,胺与酸的克分子比为 1:2.5。滴加过程中冒白烟,为放热反应,滴加过程要使反应体系不超过 55℃,约 1 小时可滴完。加毕,提高反应液温度至 80℃。搅拌,通氮、避光反应 5 小时,不时调节温度(80±3℃),使反应液微沸。反应毕,便得到 pH3—10 载体两性电解质的 50% 水溶液。

(2) 提纯:将合成之载体两性电解质,在

通氮、避光条件下,用沸水浴减压蒸干至糖浆状。向此浆状物中加入原体积2.5倍之甲醇,在通氮,避光条件下,回流溶解。将醇溶解物用热滤漏斗暗处过滤,滤去醇不溶物。再在通氮、避光条件下减压蒸去甲醇,得黄色糖浆状物。将此浆状物用适量水溶至约25%浓度,得纯化的载体两性电解质(淡黄色)。

(3) 脱色:将纯化后的载体两性电解质,趁热(约70℃)。用活性炭脱色,可得无色产品。

(4) 浓度测定及调整:取少量样品,用减压蒸干法测得含量,再据此含量用蒸馏水将原产品调整至20%浓度,总产率约70%(产品干物重占投料量的百分数)。将此产品置棕色瓶内,上覆一层氮气,再用橡皮塞密封,用时以注射器抽取。将产品置冰箱内保存2—3年,性能不变。

密度梯度电聚焦

一、密度梯度

密度梯度的作用是防止样品层内对流、保持pH梯度、避免已分离区带再混合。它是由一个重溶液和一个轻溶液以梯度混合形成。用作密度梯度的溶质应符合以下要求:①在水中溶解度高,粘度低;②具有高密度,能得到最高和最低密度差不低于0.12克/厘米³;③必须不与样品蛋白质起反应;④应为不解离的。最常用的溶质是蔗糖(分析纯),因为它对蛋白质不仅无害,甚至有保护作用。重溶液含蔗糖50%(重量/体积)。这时柱上下的最大密度差为0.2克/厘米³。因蔗糖在高pH值时会分解并影响pH梯度及pI测定,这种情况下宜使用甘油。也可用乙二醇、甘露醇、山梨醇、右旋糖酐或Ficoll(蔗糖聚合物商品名)。

二、分辨力

密度梯度电聚焦的分辨力可用以下公式表示。

$$\Delta pH = 3.07 \left(\frac{D(dpH/dx)}{-E(du/dpH)} \right)^{\frac{1}{2}}$$

式中 ΔpH 即为两种蛋白质能分开时的pI值的差别。3.07是分辨两个区带的指标, E 为电场强度, D 为蛋白质扩散系数, dpH/dx 为聚焦部位的pH梯度, du/dpH 为蛋白质在等电点时“pH-迁移率”直线的(负)斜率。

其中 D 和 du/dpH 为蛋白质的固有特性。所以在实验中可通过改变 E 和 dpH/dx 来改变分辨力^[6]。影响分辨力的一些因素如下:

1. 提高 E 可提高分辨力,但 E 不能无限提高,因电压过高引起生热,产生热对流现象。

2. 减小 dpH/dx ,即采用小范围的pH值可以提高分辨力,这倒是不受限制的,实验者可以自己分成更小的范围^[11]。

3. 扩散系数 D 值的大小, D 值越小,分辨力越高,分子量小的 D 值大。如在分离分子量较低的肌红蛋白时,算出 ΔpH 为0.02,若分离分子量更高的蛋白质或采用更小的pH范围,则 ΔpH 有可能达到0.01 pH单位。

4. 聚焦后样品的收集方式也影响分辨力。每管收集的体积不应过大,否则会降低分辨力。从流出口到测定部位(光度计)与收集管之间应尽量减短距离。

三、pH梯度的选择

在测未知蛋白质时,可先采用pH3—10的载体,经初步测定后改用较窄的范围以提高分辨力。但在使用窄pH范围的载体时,要加入载体量1/10的pH3—10载体。在使用离开中性pH范围的载体时,应加入载体量1/10的pH6—8(或pH3—10)的载体。在用pH低于3的范围时,可加有机酸如一氯乙酸、二氯乙酸、甲酸、乙酸等^[12];当用到pH10以上时,可补加胺,使pH增加到11。

四、蛋白质样品及分离容量

因为等电聚焦的分辨力高,所以样品一般不用提纯。但为了大量提纯蛋白质,则应预先初步提纯。有些物质(如核酸)在聚焦时会沉淀,应先除去。

样品应不含盐,因盐浓度高电流大,易生

热,且盐离子迁移至两极产生酸碱,会占据分离的有效部位,所以盐浓度最高不得超过0.5mM。必要时可以对0.5%载体或1%甘氨酸溶液透析。

加样体积不受限制,用110毫升体积的柱时,加样量可高达80—85毫升。

密度梯度电聚焦的操作方法^[1,13]

一、仪器和药品

(一) 等电聚焦柱

如图2所示,现在国内有些单位已试制成功。中国科学院微生物研究所在试制过程中做了一些改进,将中心电极下端的活塞改为玻璃磨口塞,中心电极的大部分封在细玻璃管内,管

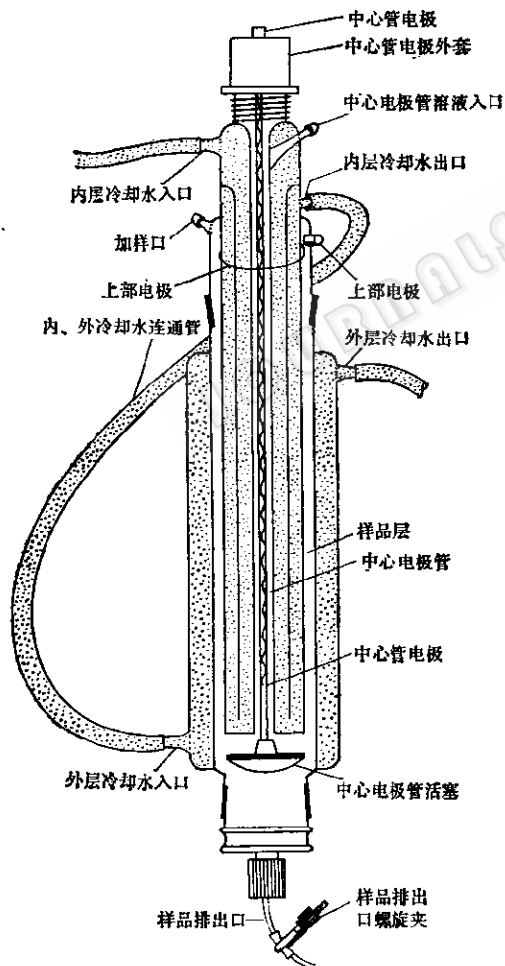


图2 等电聚焦柱剖面图

内部分可用其他金属丝代替白金丝。目前国内所制聚焦柱,样品层总体积多为110毫升。

(二) 载体两性电解质

可用瑞典LKB厂的商品“Ampholine”,也可自己合成。中国科学院微生物研究所已制成pH3—10及pH3—6等载体两性电解质,并进行了性能鉴定,与瑞典LKB厂同样pH范围的产品有相似的pH梯度、光吸收,导电性和缓冲能力^[13]。

(三) 蔗糖或甘油

分析纯。

(四) 电极溶液

阴极为稀氢氧化钠溶液;阳极为稀硫酸或稀磷酸溶液。

(五) 电源

仪器可变电电压范围0—1000伏,电流0—50毫安,最小应有0.1毫安读数。

(六) 冷却装置

用一恒温冷却箱,在0—4℃下聚焦。将聚焦后收集的各组分放入冷却箱。平衡20分钟后,在此温度下测pH。一般用自来水冷却也可以。

(七) pH计

最好能准确到0.01pH单位,并尽可能有微型结合电极,以便能测不超过1毫升的样品溶液。

以上各种仪器和药品为必备的。还有一些辅助的仪器和试剂,如梯度混合器、蠕动泵、流动测定的紫外光吸收计、部分收集器以及分离蛋白质和载体两性电解质的葡聚糖凝胶等。

二、操作要点(对于110毫升柱)

(一) 电极溶液的制备

如表1。

(二) 密度梯度溶液的配制

1. 用自动梯度混合器时,只需配轻、重两种溶液:将轻溶液加于混合器的有补偿锥的一侧,重溶液加于有搅拌器的一侧,然后开动梯度混合器(见图3),通过蠕动泵,以5毫升/分的流速注入柱内。重、轻溶液的配制见表2。

表 1 电极溶液的配制

	阳极在中心管内	阳极在柱顶
H ₂ SO ₄ 或 H ₃ PO ₄	0.05毫升浓酸或 1 毫升 1M 酸溶液	0.02毫升浓酸或 0.5 毫升 1M 酸溶液
蒸馏水	15毫升	5 毫升
蔗糖	11克	
	阴极在中心管内	阴极在柱顶
NaOH	0.1 克或 1 毫升 2M 溶液	0.05克或 0.5 毫升 2M 溶液
蒸馏水	14毫升	5 毫升
蔗糖	11克	

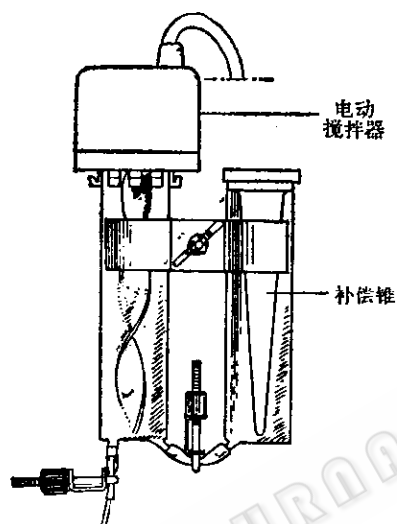


图 3 梯度混合器

表 2 密度梯度溶液的配制

成 分	重 液	轻 液
载体两性电解质 40% (重量/体积)	1.9 毫升	0.6 毫升
蒸馏水和蛋白质溶液	37 毫升	51.5 毫升
蔗糖	26 克	

2. 人工混合的密度梯度溶液按表 3 配制:

将配好的轻、重溶液置于两个滴定管内, 按上表的量配成 24 管不同密度的溶液, 然后按管号依次以滴定管注入柱中, 流速不得超过 3 毫升/分。人工混合时, 可估计蛋白质可能的聚焦位置, 将样品放入一个适当的管中代替轻溶液, 以缩短聚焦时间。

3. 装柱及聚焦: 装柱前, 连好电源, 通上冷凝水, 先将中心电极管活塞打开, 通过中心电极

表 3 人工混合的密度梯度溶液的配制 (单位: 毫升)

管号	轻 液	重 液	管号	轻 液	重 液
1	0	5.0	13	2.4	2.6
2	0.2	4.8	14	2.6	2.4
3	0.4	4.6	15	2.8	2.2
4	0.6	4.4	16	3.0	2.0
5	0.8	4.2	17	3.2	1.8
6	1.0	4.0	18	3.4	1.6
7	1.2	3.8	19	3.6	1.4
8	1.4	3.6	20	3.8	1.2
9	1.6	3.4	21	4.0	1.0
10	1.8	3.2	22	4.2	0.8
11	2.0	3.0	23	4.4	0.6
12	2.2	2.8	24	4.6	0.4

管溶液入口以滴管加入中心管电极溶液(重), 加至中心电极管口以上 2 厘米处。再通过蠕动泵(或用吸管)将已有蛋白质样品的密度梯度溶液以 5 毫升/分的速度(用吸管为 3 毫升/分)从加样口加入。加至距上部电极约 0.5 厘米处即停止, 再以吸管慢慢加入上部电极溶液(轻), 加至浸过电极 0.5 厘米即可。

聚焦时接通电源, 电压 400 伏。当用梯度混合器充填时, 开始几小时电压要低于最终值 150 伏。一般聚焦过程, 电流不断下降, 降至稳定时, 即表明聚焦已完成。表 4 所列电压和聚焦时间, 可作为对 1% 载体两性电解质溶液的一个大概的参考。聚焦最好在 4℃ 下进行。

表 4 聚焦电压和聚焦时间

pH 范围	电压(伏)	时间(天)
3—10	400	2
3—5	500	1—2
4—6	600	1—2
5—7	700	1—2
6—8	700	1—2
7—9	600	2
8—10	500	2

4. 放出样品、收集、测定: 聚焦完毕时, 关闭电源, 关严中心电极管活塞(务必关严!)先以吸管轻轻的吸出上部电极溶液, 再打开下部的样品排出口, 以 2 毫升/分的流速排出。根据测定的需要(如测 pH、酶活、蛋白质)确定每管收集的量。一般以 1—2 毫升/管为合适。排出时

速度应均匀,注意不得震动柱身,避免已聚焦区带之紊乱及再混合,如发生再混合,可将各管重新依次加入柱中,再作一次聚焦,第二次时间短得多。

各管收集完毕后进行分析测定。

① pH 测定: 先将各管置冷水浴平衡 20 分钟后,再在水浴温度下测定各管的 pH。据报道已有连续测定 pH 的装置,结果比分管测定为好。

② 蛋白质含量的测定: 以紫外分光光度计测定 280 毫微米波长处之吸光度。

③ 酶活测定: 将各管以适当方法测酶活。

将以上所测的三个值,对管号(横座标)作图,作出 pH 曲线、蛋白质含量曲线、酶活曲线。蛋白质峰(或酶活峰)所对应的 pH 值,即为该蛋白质(或酶)的 pI 值。

上述操作,若用流动紫外光监测仪进行,可将样品排出口接紫外光吸收计,再经过蠕动泵(或向柱样品层上部注水压出)以每分钟 1 毫升的流速排至收集器。蛋白质含量即通过紫外光吸收计测出,并在自动记录器上画出曲线。再测收集的各管的 pH,将 pH 曲线画于蛋白质曲线图上,即可求出蛋白质的 pI 值。图 4 为血红蛋白等电聚焦分离图形。

5. 除去蛋白质中的载体两性电解质(及蔗糖或甘油): 因为大部分蛋白质的分子量在 10,000 以上,而载体两性电解质的最大分子量在 10,000 以下。这种分子大小的差异,使我们可以利用分子筛把它们分开。而样品的稀释率仅为 1.5 倍。用葡聚糖凝胶 G-25 或 G-50 柱都可以。若用 G-50 柱(2.5 × 20 厘米),以 15 毫升/小时·厘米²的流速,加样量为 2 毫升/厘米²,1 小时便可以完全分开。

对缓冲液透析至少需要 36 小时。若不时振动透析系统,并经常更新缓冲液,则可缩短聚焦时间,大约 15 小时左右即可除去 99% 的两性载体。

(三) 影响因素及假象

1. 温度对 pI 的影响: pI 值随测量温度不同而改变,而与聚焦时的温度无关。

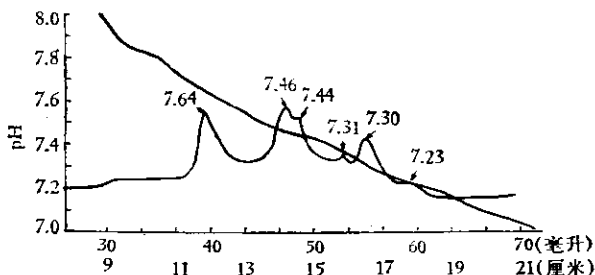


图 4 血红蛋白等电聚焦分离结果^[1]

2. 碱性部分 pI 的测定会受二氧化碳的影响,应避免接触二氧化碳(如可以通入氩气或氮气)^[1]。

3. 蔗糖在阳极附近有较高的紫外吸收^[14],应作空白实验,以消除假像。

4. 载体两性电解质通常在 280 毫微米处的光吸收很低,对测定蛋白质干扰不大,但精确测定时,应作空白实验。用 Lowry 法测定蛋白质时,载体显色很强,干扰测定,必须先透析除去或用三氯乙酸沉淀蛋白质后再测定。用双缩脲法不受影响,但灵敏度太低。对于有特殊生物活性的蛋白质,则最好测定其活性,如酶活力、抗原性等。还有报道指出载体两性电解质与蛋白质结合会改变 pI 值。也有报道谈到蛋白质在无盐溶液中会由于静电力而发生聚合^[15]。

应 用

等电聚焦技术应用甚广、报道极多^[16,17]。(据不完全统计,至 1977 年已有两千多篇有关报道。)已广泛地应用于蛋白质、酶、激素、病毒、高等植物色素^[18]及免疫球蛋白^[19]的分离纯化及鉴定。也广泛地用于临床生化、免疫学、疾病早期诊断^[20]。也有些报告谈到等电聚焦在生物膜、病毒及防止啤酒变浊等方面的应用^[21]。

在微生物酶的研究中应用亦相当广泛,主要集中在下述两个方面:

1. 用密度梯度电聚焦法或与其它分离提纯技术搭配,从粗抽提液中分离和提纯出高纯度的酶,见表 5。

2. 用聚丙烯酰胺凝胶电聚焦或密度梯度电聚焦法,准确测定了一些微生物酶的等电点,或

表 5 用密度梯度电聚焦法分离提纯的微生物酶

酶	来 源	提 纯 程 序	提 纯 效 果	文 献
纤维素酶,甘露聚糖酶,木聚糖酶,β-葡萄糖苷酶,甘露糖苷酶,木糖苷酶	曲 霉	用粗酶制剂直接电聚焦	其中至少有三个酶又分出2—3个有酶活组分	[9]
转化酶	酵 母	培养滤液直接电聚焦	可分出几个有酶活性的峰	[22]
α-溶血素,脱氧核糖核酸酶,葡萄球菌激酶,蛋白酶,透明质酸酶	金黄色葡萄球菌	浓缩100倍的培养滤液直接电聚焦	这些酶大都有多分子形式,脱氧核糖核酸酶还可分成二个主要成分和三个次要成分	[23] [24]
葡聚糖酶	细 菌	硫酸铵沉淀→CM纤维素→用pH 3—6载体进行电聚焦	提纯 30 倍	[25]
β-内酰胺酶 I β-内酰胺酶 II	蜡状芽孢杆菌 569/H/9	先用pH3—10载体聚焦,再用pH 8—10载体电聚焦	酶 I 分成三个比活相同的组分, pI 为9.20,9.47,9.68;酶 II 的 pI 为 8.45,另在 pH10.11 有一个比活低的峰	[26]
脱氧尿嘧啶三磷酸酶	枯草杆菌	粗抽提物用pH3—10载体直接电聚焦	得到 pI4.1 和 pI3.7 两个有活力组分	[27]
磷酸酶 C	梭 菌 (<i>Clostridium perfringens</i>)	培养滤液→冷冻干燥→DEAE Sephadex A25→Sephadex G75 →pH5—7载体电聚焦	得到 pI = 5.7±0.05 的一个单一组分提纯 200 倍	[28]
己糖激酶	酵 母	用 440 毫升 LKB 柱 pH4—6 载体电聚焦	分出天然型 p-I, p-II 和修饰型 S-I, S-II 组分,从 P 型向 S 型转化时, pI 降低。各组分 pI 为:5.25, 4.93 和 4.99, 4.73。重复性很好	[29]
耐热酸性蛋白酶	青 霉 菌 (<i>Penicillium duponti</i>)	用 LKB110 毫升柱 pH3—6 载体电聚焦	得到 pI = 3.81 的单一组分	[30]
磷酸酶 B	青 霉 菌 (<i>Penicillium notatum</i>)	粗抽提液→pH4.0 处理→硫酸铵分段→Sephadex G200→DEAE Sephadex A50→淀粉胶电泳→pH3—5 载体电聚焦	提纯 200 倍,得到聚丙烯酰胺凝胶电泳均一的制品	[31]
磷酸酶 C	链 霉 菌 (<i>Streptomyces hachijoensis</i>)	Sephadex G-50 ↓ pH3—10 载体聚焦 ↓ pH5—8 载体聚焦	第一次电聚焦提纯 368 倍,第二次电聚焦得到提纯 1510 倍(pI = 6.0)及 1330 倍(pI = 5.6)的二个组分	[32]
胸腺嘧啶核苷酸磷酸化酶	大肠杆菌	离心→超滤→DEAE-纤维素→Sephadex G-150→pH3.5—10.3 载体 220 毫升电聚焦	聚丙烯酰胺凝胶电泳表明有一个主要的活力区带及一个小量的、迁移较快的无活力区带	[33]

对一些微生物酶进行了分析比较研究(见表6)。

近年来,这方面的工作进行的很多,读者还可查阅有关蛋白质等电点值的专门文献^[42]。

除了用于蛋白质的分离分析之外,还有不少报告谈到了等电聚焦技术在蛋白质化学研究中的应用。蛋白质的解离、聚合、化学修饰都能

使其表面电荷发生改变,从而可用聚焦法在这方面提供一定的信息^[43]。还可用电聚焦来监测蛋白质-蛋白质间的相互作用及蛋白质共价结构的各种改变,如脱氨基、肽链降解、巯基氧化、磷酸化作用及共价结合配基等^[44]。也可通过等电聚焦来揭示蛋白质构象变化而造成的带

表 6 用等电聚焦法测定的微生物酶等电点

酶	来 源	方 法	结 果	文献
固氮酶	巴斯德梭菌 (<i>Clostridium pasteurianum</i>)	7.5% 胶, pH3—10 载体凝胶 电聚焦	铁钼蛋白 pI 为 5.0, 铁蛋白 pI 为 4.6	[34]
固氮酶	棕色固氮菌 (<i>Azotobacter vinelandii</i>)	凝胶电聚焦	铁钼蛋白 pI 为 5.2 铁蛋白 pI 为 4.7	[35]
3-磷酸甘油酸激酶	酵母	4%胶, pH7—9 载体凝胶电聚 焦	pI = 7.2	[36]
邻-乙酰丝氨酸和邻-乙酰 高丝氨酸脱氢酶	酵母	密度梯度电聚焦	野生型和突变型的 pI 均为 4.4	[37]
内核苷酸酶 III	大肠杆菌	以细胞色素 C 为内标准物用 5% 胶, pH9—11 载体进行凝 胶电聚焦测定	pI = 10	[38]
新核糖核酸酶 [EC. 3.1.4.23]	青霉菌 (<i>Aspergillus saitoi</i>)	凝胶电聚焦	pI = 3.95	[39]
蛋白水解酶	T ₄ 感染的大肠杆菌细胞	凝胶电聚焦	pI = 9	[40]
天门冬氨酸转氨甲酰酶	枯草杆菌	凝胶电聚焦	pI = 5.0	[41]

电基团的暴露。

参 考 文 献

- [1] Vesterberg, O.: Isoelectric Focusing of Protein, *Methods in Enzymology* (ed. by William, B. J.), Vol. 22, Academic Press, New York and London, 1971, p. 389.
- [2] Svensson, H.: *Acta Chem Scand.*, 16: 456, 1962.
- [3] Rilbe, H.: Isoelectric Focusing of Protein, *Isoelectric Focusing and Isotachopheresis* (ed. by Catsimopoulos, N.), 1975.
- [4] Kolin, A.: *J. Chem. Phys.*, 22: 1623, 1954.
- [5] Vesterberg, O., and H. Svensson: *Acta Chem. Scand.*, 20: 820, 1966.
- [6] Svensson, H.: *Acta Chem. Scand.*, 15: 328, 1961.
- [7] Haglund, H.: *Science Tools*, 14: 17, 1967.
- [8] Haglund, H.: Isoelectric Focusing in pH Gradient, *Methods of Biochemical Analysis* (ed. by Glick, D.), Vol. 19, Interscience Publishers, New York, 1971, p. 1.
- [9] Vesterberg, O.: British Patent 1,106,818, 1968.
- [10] Vesterberg, O.: *Acta Chem. Scand.*, 23: 2653, 1969.
- [11] 中国科学院微生物研究所: 生物化学与生物物理进展, 1979 年 (待发表)。
- [12] Pettersson, E.: *Acta Chem. Scand.*, 23: 2631, 1969.
- [13] 张树政, 何志效: 化学通报, 1974 年第 4 期, 234 页。
- [14] Earland, C. and D. B. Ramsden: *J. Chromatog.*, 35: 575, 1968.
- [15] Allen, E. and A. B. Roy: *Biochim. Biophys. Acta*, 168: 243, 1968.
- [16] Wrigley, C. W.: *Isoelectric Focusing* (ed. by Niedewieser, A. and G. Pataki), Ann. Arbor Science Publishers inc., 1971, p. 291.
- [17] Vesterberg, O.: isoelectric Focusing and Separation of Protein, *Methods in Microbiology* (ed. by Norris, J. H. et al. O.), Vol. 5 B, Academic Press, London, 1971, p. 595.
- [18] Jonsson, M. and E. Pettersson: *Science Tools*, 15: 2, 1968.
- [19] Valmet, E.: *Science Tools*, 15: 8, 1968.
- [20] Cwynarski, M. T., J. Watkins and P. N. Johnson: Isoelectric Patterns in IgG Myeloma Proteins: Possible Biochemical and Clinical Inference, *Isoelectric Focusing* (ed. by Arbuthnott, J. P. and J. A. Beeley) Butterworths, 1975, p. 212.
- [21] Sawag, D. J.: Towards an Understanding of Beer Haze Formation, *Isoelectric Focusing* (ed. by Arbuthnott, J. P. and J. A. Beeley) Butterworths, 1975, p. 329.
- [22] Vocterberg, O. and Berggren: *Ark. Kemi.*, 27: 119, 1967.
- [23] Wadstrom, T.: *Biochim. Biophys. Acta*, 147: 445, 1967.
- [24] Vesterberg, O. et al.: *ibid*, 168: 243, 1968.
- [25] Sawai, T., K. Toriyama and K. Yano: *J. Biochem.*, 75: 105—112, 1974.
- [26] Davies, R. B., E. P. Abraham and J. Melling: *Biochem. J.*, 143: 115—127, 1974.
- [27] Price, A. R. and J. Frato: *J. Biol. Chem.*, 250: 8804—8811, 1975.
- [28] Mollby, R. and T. Wadstrom: *Biochim. Biophys. Acta*, 312: 569—584, 1973.
- [29] Schmidt, J. J. and S. P. Colowick: *Arch. Biochem. and Biophys.*, 158: 471—477, 1973.
- [30] Emi, S., D. V. Myers and G. A. Lacobucci:

- Biochem.* 15: 842—848, 1976.
- [31] Kawasaki, N., J. Sugatani and K. Saito: *J. Biochem.*, 77: 1233—1244, 1975.
- [32] Okawa, Y. and T. Yamaguchi: *J. Biochem.*, 78: 537—545, 1975.
- [33] Voytek, P.: *J. Biol. Chem.*, 250: 3660—3665, 1975.
- [34] Tso, M. Y. W.: *Arch Microbiol.*, 99: 71—80, 1974.
- [35] Kleiner, D. and C. H. Chen: *ibid.*, 98: 83—100, 1974.
- [36] Stinson, R. A.: *Biochem.*, 13: 4523—4529, 1974.
- [37] Yamagata, S., K. Takeshima and N. Naiki: *J. Biochem.*, 77: 1029—1036, 1975.
- [38] Radman, M.: *J. Biol. Chem.*, 251: 1438—1445, 1976.
- [39] Ohgi, K. and M. Irie: *J. Biochem.*, 77: 1085—1094, 1975.
- [40] Benchetrit, L. and U. Bachrach: *Virology*, 71: 602—604, 1976.
- [41] Brabson, J. S. and R. L. Switzer: *J. Biol. Chem.*, 250: 8664—8669, 1975.
- [42] Righetti, P. G. and T. Caravaggio: *J. Chromatog.*, 127: 1—28, 1976.
- [43] Hobert, M. J.: Clues to Protein Structure from Isoelectric Focusing, *Isoelectric Focusing* (ed. by Arbuthnott, J. P. and J. A. Beeley), Butterworths, 1975, p. 275.
- [44] Arbuthnott, J. P.: Multiple Forms of Bacterial Toxins in Preparative Isoelectric Focusing, *Isoelectric Focusing* (ed. by Arbuthnott, J. P. and J. A. Beeley), Butterworths, 1975, p. 212.