

改良的 Tricine-SDS-PAGE 电泳检测胸腺肽分子量\*

陈妍珂<sup>1</sup>,王孝功<sup>2</sup>,王亚鹏<sup>2</sup>

(1. 西安交通大学医学部生物医学实验研究中心,西安 710061;  
2. 西安迪赛生物药业有限责任公司,西安 710016)

**摘要:**目的 建立一种分析胸腺肽制剂中多肽分子量分布的简便可行的方法。方法 采用改良的 Tricine-SDS-PAGE 电泳方法分析胸腺肽制剂中多肽的分子量分布,并分析其中胸腺素 α1 的含量。结果 采用该法可检出 1 μg 的胸腺肽 α1,分析国内市场上的胸腺肽制剂多肽分子量分布范围在 3.5~8.5 kD。结论 该法适用于分析胸腺肽制剂中多肽组分的分子量分布和胸腺肽 α1 的存在,可用于胸腺肽制剂的质量控制。

**关键词:**胸腺肽;分子量;Tricine-SDS-PAGE 电泳;胸腺肽 α1

**中图分类号:**R446 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-7414(2016)01-132-03

**doi:**10.3969/j.issn.1671-7414.2016.01.038

Analysis of the Molecular Weight of Peptides  
in Thymosin by Tricine-SDS-PAGE

CHEN Yan-ke<sup>1</sup>, WANG Xiao-gong<sup>2</sup>, WANG Ya-peng<sup>2</sup>

(1. Experiment Center of Biomedical Research, Xi'an Jiaotong University School of Medicine, Xi'an 710061, China; 2. Xi'an Disai Biology Pharmaceutical Company, Xi'an 710016, China)

**Abstract:** **Objective** To establish a simple and feasible method in analyzing the molecular weight distribution of peptides in thymosin. **Methods** Improved Tricine-SDS-PAGE electrophoresis was applied to detect the molecular weight of peptides and the content of thymosin α1 in thymosin. **Results** Tested the thymosin preparations on the domestic market using this improved method. It was demonstrated that the peptide molecular weight distribution in thymosin preparations was between 3.5~8.5 kD, also could detect the concentration of 1 μg thymosin α1 in thymosin by using this improved method. **Conclusion**

This improved method is suitable for the analysis of peptides molecular weight distribution and the concentration of thymosin α1, so it can be used for control quality of thymosin preparations.

**Keywords:** thymosin; molecular weight; Tricine-SDS-PAGE; thymosin α1

胸腺肽是从小牛或猪胸腺提取的含多种多肽组分的免疫调节剂,在我国临床应用达 30 多年。Goldstein<sup>[1,2]</sup>最早采用胸腺组织破碎结合丙酮沉淀法制备胸腺素组分 5(thymosin factor 5, TF5)。随着超滤膜分离技术的发展,目前国内厂家多采用超滤工艺提取胸腺肽。上世纪 70 年代 Low 等<sup>[3~5]</sup>人从 TF5 中首次分离纯化出胸腺素 α1,它是由 28 个氨基酸组成的多肽,含量大约仅占 TF5 的 0.6% 左右,但免疫调节活性却是 TF5 的 1 000 倍,它对 T 细胞、B 细胞和 NK 细胞等的免疫功能都具有明显的调节作用。因此,现行的胸腺肽质量控制标准中将胸腺素 α1 的含量作为质控参数之一。了解胸腺肽制剂多肽的分子量分布范围和胸腺素 α1 的含量将为有效控制产品质量、保证安全有效用药提供可参考的科学依据,是目前胸腺肽质量控制亟待解决的问题。

聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)是进行蛋

白质分离的常用方法之一。蛋白质经热变性后与 SDS 结合形成带负电的复合物,电泳时蛋白的迁移率与分子量的负对数呈正比<sup>[6]</sup>。但常规的 SDS-PAGE 分离小于 10 kDa 的蛋白效果较差。Swank<sup>[7]</sup>报道,在分离胶中添加脲可以使小分子量的蛋白条带的清晰度增强。Schagger 等<sup>[8]</sup>报道了一种改进的 Tricine 肽电泳方法,使用 Tricine 替代甘氨酸作为慢迁移离子,解除短肽-SDS 复合物与 DS 颗粒的共迁移效应,改善小分子量短肽的电泳效果,可很好地分离分子量在 1~100 kD 的蛋白质。胸腺肽 α1 的分子量仅为 3 108 Da,等电点为 4.2,无法用通常的 SDS-PAGE 电泳有效分离。韩香等<sup>[9]</sup>人报道采用 Tricine-SDS-PAGE 可以分析化学合成的高纯度的胸腺肽 α1。我们采用该方法分析胸腺肽制剂中胸腺肽 α1 的含量时,电泳分离的效果仍不理想。笔者通过研究和改进,建立了一种灵敏的分析胸腺肽制剂中各组分分子量分布范

\* 基金项目:国家科技支撑计划“药品注射剂检测技术体系研究”(编号 2008BAI55B04)。

作者简介:陈妍珂(1973—),女,蒙古族,博士,讲师,研究方向为肿瘤的发生发展机制,E-mail:yankechen@126.com。

围的方法。采用该法不但可以分析胸腺肽制剂中分子量的分布范围,并且可以检测出胸腺肽制剂中痕量的胸腺肽  $\alpha 1$ , 可用于胸腺肽制剂的质量控制和分析。

# 1 材料与方法

1.1 试剂、试药和仪器 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、巯基乙醇、过硫酸铵(AP), 均购自 Sigma 公司; 三羟基氨基甲烷(Tris)、三羟基氨基甘氨酸(Tricine)、十二烷基硫酸钠(SDS)均购自美国 Serva 公司; 其它试剂均为分析纯, 购自西安化学试剂厂。预染低分子量蛋白标准(Low-Range RNP755E, 美国 GE 公司), 注射用胸腺肽  $\alpha 1$  冻干粉针(Sciclone 制药公司); 注射用胸腺肽, 西安迪赛药业有限责任公司生产(批号: 1109550)、辽宁天龙药业有限公司(批号: 20050805)、北京赛生药业有限公司(批号: 20050808)、辽宁玉皇药业有限公司(批号: 20050223)。蛋白质电泳仪和凝胶成像仪(美国 Bio-Rad Lab)。

## 1.2 方法

1.2.1 溶液和胶的配制: ①30 g/dl AB 溶液: 称取 29 g 丙烯酰胺、1.0 g 甲叉双丙烯酰胺溶于 100 ml 超纯水中; ②49.5 g/dl AB 溶液: 称取 48 g 丙烯酰胺、1.5 g 甲叉双丙烯酰胺溶于 100 ml 超纯水中; ③10 g/dl 过硫酸铵(AP)溶液: 称取 1g 过硫酸铵溶于 10 ml 超纯水中, 临用前现配; ④分离胶缓冲液: 3 mol/L Tris-base, 0.3 g/dl SDS, 用 1 mol/L HCl 调节 pH 至 8.9; ⑤浓缩胶缓冲液: 1 mol/L Tris-HCl, 用 1 mol/L HCl 调节 pH 至 6.8; ⑥分离胶: 依次加入 49.5 g/dl AB 1.17 ml, 分离胶缓冲液 1 ml, 甘油 0.32 ml, 超纯水 0.51 ml, 10 g/dl AP 40  $\mu$ l, TEMED 4  $\mu$ l, 混合均匀; ⑦浓缩胶: 依次加入 30 g/dl AB 0.18 ml, 浓缩胶缓冲液 0.13 ml, 0.2 mol/L EDTA 10  $\mu$ l, 超纯水 0.69 ml, 10 g/dl AP 20  $\mu$ l, TEMED 2  $\mu$ l, 混合均匀; ⑧电泳阳极缓冲液: 0.2 mol/L Tris-base, 用 1 mol/L 调节 pH 至 8.9; ⑨电泳阴极缓冲液: 0.1 mol/L Tris-base, 0.1 mol/L Tricine, 1 g/dl SDS; ■ 样品缓冲液: 4 g/dl SDS, 12 ml/dl 甘油, 50 mmol/L Tris, 2 ml/dl 巯基乙醇, 少许溴酚蓝, pH6.8。

1.2.2 电泳样品的制备: 胸腺肽  $\alpha 1$  和胸腺肽冻干粉针用超纯水分别稀释至 0.1 mg/ml 和 5 mg/ml, 然后加入等体积的样品缓冲液混合均匀, 煮沸 5 min, 10 000 r/min 离心 5 min 取上清待用。

1.2.3 电泳、固定、染色、脱色和凝胶成像: 按上述方法配制分离胶和浓缩胶, 待胶凝后, 上样, 用 90 V 恒压电泳至分离胶处, 改用 120 V 恒压电泳至溴酚蓝走至胶下沿时停止电泳。电泳结束后小心卸

下凝胶, 参考文献[8]方法进行固定、银染、脱色, 即: 置固定液 1(乙醇 40 ml/dl, 醋酸 10 ml/dl) 10 min; 双蒸水充分漂洗后, 移入固定液 2(戊二醛 0.05 ml/dl, 甲醛 0.003 7 ml/dl, 乙醇 40 ml/dl) 10 min; 依次用 40 ml/dl 乙醇和双蒸水充分漂洗后, 用硫代硫酸钠(0.2g/L)敏化 1 min; 用双蒸水漂洗 2 次; 0.1 g/dl 硝酸银染色 20 min; 洗涤后, 置于显色液中(2.5 g/dl 碳酸钠, 0.0148 ml/dl 甲醛)显色至条带清晰, 用 5 ml/dl 醋酸溶液终止反应。用 Bio-Rad 凝胶成像仪采集电泳图像。

2 结果 见图 1。采用这种 Tricine-SDS-PAGE 电泳法分析胸腺肽制剂发现, 胸腺肽主要组分的分子量集中在 8.5 kD 之下, 批次间无显著差异; 胸腺肽  $\alpha 1$  的条带位置高于 8.5 kD, 显著高于理论值(3.8 kD), 这是由于胸腺肽  $\alpha 1$  是酸性小肽, 亲水性强, 在溶液中主要以水和分子存在, 在电泳时呈现的表观分子量高于实际值。用这种方法检测胸腺肽  $\alpha 1$ , 条带的深浅与上样量呈正比, 最低上样量 1  $\mu$ g 条带仍清晰可见。

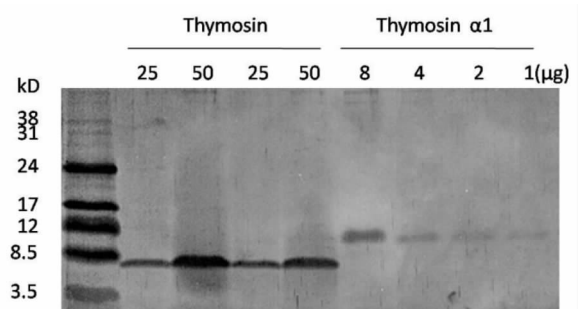


图 1 胸腺肽制剂和胸腺肽  $\alpha 1$  的 Tricine-SDS-PAGE 电泳图

3 讨论 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)是蛋白质分离的常用方法, 蛋白质经热变性后与 SDS 结合形成带负电的蛋白质-SDS 复合物, 复合物在电泳中的迁移率取决于蛋白质分子量大小。分子量在 15~200 kD 时, 电泳迁移率与分子量的对数呈线性关系。但常规的 SDS-PAGE 分离小于 10 kD 的多肽效果较差。改进的三羟基氨基甘氨酸(Tricine)-SDS-PAGE 适于分离分子量在 1~40 kD 的小分子蛋白。我们用该系统分离胸腺肽各多肽组分时, 发现胸腺肽组分遍布于 3.5 kD~8.5 kD, 但主要组分集中在 8.0 kD; 胸腺肽  $\alpha 1$  的条带位置高于理论值, 这与胸腺肽  $\alpha 1$  的性质有关。我们用这种改良的电泳方法检测了另外 3 个厂家的胸腺肽制剂, 电泳结果与图 1 类似, 表明这些制剂的分子量分布相近。在检测的胸腺肽制剂中, 本研究没有发现胸腺肽  $\alpha 1$  的特征条带, 这提示我们: 由于胸腺肽  $\alpha 1$  表观分子量比较大, 并具有很强的亲水性, 在超滤的过程中大部分的 (下转 137 页)

[1] 乐 军,梁 莉,李苏辉,等. 酶联免疫斑点试验快速诊断结核分枝杆菌感染的临床应用价值[J]. 中华检验医学杂志,2006,29(11):1005-1008.  
Yue J, Liang L, Li SH, et al. Clinical application of enzyme-linked immunospot assay for rapid diagnosis of active tuberculosis[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2006, 29(11): 1005-1008.

[2] Zhang LF, Liu XQ, Zuo LY, et al. Longitudinal observation of an interferon gamma-released assay (T-SPOT. TB) for *Mycobacterium tuberculosis* infection in AIDS patients on highly active antiretroviral therapy[J]. Chin Med J (Engl), 2010, 123(9): 1117-1121.

[3] Kim SH, Song KH, Choi SJ, et al. Diagnostic usefulness of a T-cell-based assay for extrapulmonary tuberculosis in immunocompromised patients[J]. Am J Med, 2009, 122(2): 189-195.

[4] Farhat M, Greenaway C, Pai M, et al. False-positive tuberculin skin tests: what is the absolute effect of BCG and non-tuberculous mycobacteria? [J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2006, 10(11): 1192-1204.

[5] Ribeiro S, Dooley K, Hackman J, et al. T-SPOT. TB responses during treatment of pulmonary tuberculosis [J]. BMC Infect Dis, 2009, 9(1): 1-9.

[6] Adetifa IM, Ota MO, Jeffries DJ, et al. Interferon- $\gamma$  ELISPOT as a biomarker of treatment efficacy in latent tuberculosis infection: a clinical trial[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2013, 187(4): 439-445.

[7] 段 静,王 艳,袁 杭,等. 结核杆菌五种实验室检测方法比较[J]. 现代检验医学杂志,2014,29(4): 79-82.  
Duan J, Wang Y, Yuan H, et al. Comparison of *Mycobacterium tuberculosis* in five kinds of laboratory tests [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2014, 29(4): 79-82.

[8] 归巧娣,刘 珂,苍金荣,等. 干扰素释放酶联免疫法(TB-IGRA)与蛋白芯片法检测结核分枝杆菌的方法比较[J]. 现代检验医学杂志,2014,29(5): 114-116.  
Gui QD, Liu K, Cang JR, et al. Comparison of TB-IGRA and protein chip in the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2014, 29(5): 114-116.

收稿日期:2015-05-23 修回日期:2015-08-24

(上接 133 页)胸腺肽  $\alpha 1$  可能被截留,因此在制剂中检测不到胸腺肽  $\alpha 1$ 。对胸腺肽超滤工艺进行改进,可能提高制剂中胸腺肽  $\alpha 1$  的含量。

参考文献:

[1] Goldstein AL, Asanuma Y, Battisto JR, et al. Influence of thymosin on cell-mediated and humoral immune responses in normal and in immunologically deficient mice[J]. Journal Immunology, 1970, 104(2): 359-366.

[2] Goldstein AL, Low TL, McAdoo M, et al. Thymosin  $\alpha 1$ : isolation and sequence analysis of an immunologically active thymic polypeptide[J]. Immunology, 1977, 74(2): 725-729.

[3] Low TL, Thurman GB, McAdoo M, et al. The chemistry and biology of thymosin isolation, characterization, biological activities of thymosin  $\alpha 1$  and polypeptide beta 1 from calf thymus[J]. Journal of Biological Chemistry, 1979, 254(3): 981-986.

[4] Leichtling KD, Serrate SA, Szeite MB. Thymosin  $\alpha 1$  modulates the expression of high affinity interleukin-2 receptors on normal human lymphocytes[J]. International Journal of Immunopharmacology, 1990, 12(1): 19-29.

[5] Favalli C, Jezzi T, Mastino A, et al. Modulation of natural killer activity by T  $\alpha 1$  and interferon [J]. Cancer Immunol Immunother, 1985, 20(3): 189-190.

[6] 王家政,范 明. 蛋白质电泳技术[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 77-123.  
Wang JZ, Fan M. The technology of protein electrophoresis [M]. Beijing: Sciences Publishing Company, 2000: 77-123.

[7] Swank RT, Munkres KD. Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate[J]. Analytical Biochemistry, 1971, 39(2): 462-477.

[8] Schagger H, Von Jagow V. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of protein in the range from 1 to 100kDa [J]. Analytical Biochemistry, 1987, 166(2): 368-379.

[9] 韩 香,顾 军,苑庆兰,等. 人胸腺肽  $\alpha 1$  的固相合成及体外活性研究[J]. 中国药物化学杂志, 2004, 14(1): 27-29.  
Han X, Gu J, Yuan QL, et al. Study on fmoc solid-phase synthesis and activity of thymosin  $\alpha 1$  [J]. Chinese Journal of Medicinal Chemistry, 2004, 14(1): 27-29.

收稿日期:2015-10-23 修回日期:2015-12-18