



聚丙烯酰胺凝胶电泳

王 杨 声

(中国科学院微生物研究所, 北京)

电泳是分离混合物中离子成分的最有效方法之一。以聚丙烯酰胺凝胶作支持物的电泳称为聚丙烯酰胺凝胶电泳。这种电泳方法分辨率高, 灵敏度大, 重复性强, 并且操作简便, 因此广泛应用于分子生物学, 生物化学, 细胞学, 免疫学, 酶学等学科的研究, 近年来在微生物分类上的应用也逐渐引起人们的注意。例如 1968 年 Gill 等^[1]利用聚丙烯酰胺凝胶电泳的方法区分了恶疫霉 (*Phytophthora cactorum*), 草莓疫霉 (*P. fragariae*) 和大豆疫霉 (*P. sojae*)。1978 年 Gill^[2]又进一步对不同寄主和不同地区分离得到的 30 株樟疫霉 (*P. cinnamomi*) 和 5 株恶疫霉 (*P. cactorum*) 进行了聚丙烯酰胺凝胶电泳分析, 为疫霉的分类提供了良好的方法。另如 Gottlieb 等^[3]利用聚丙烯酰胺凝胶电泳作为放线菌分类的一个标准, 实验证明不同种的链霉菌有不同的电泳区带。

根据凝胶支柱形状可分为盘状电泳和垂直板型电泳两种类型, 它们的原理和操作基本相同, 这里主要介绍几种常用的盘状电泳方法。

聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳

聚丙烯酰胺凝胶是由丙烯酰胺单体 ($\text{CH}_2=\text{CHCONH}_2$, 以下简称 Aa) 和交联剂甲叉双丙烯酰胺 ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CONH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$, 以下简称 Bis)。在催化剂和加速剂存在下聚合而成的大分子。Davis^[4]首先建立了聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳法, 电泳是在直立的凝胶管中进行的。凝胶是由样品凝胶; 间

隔凝胶; 和分离凝胶三部分组成。其中样品凝胶是把样品聚合在凝胶中, 间隔凝胶是起浓缩样品的作用, 在分离凝胶中样品根据电泳和分子筛的作用进行分离。间隔凝胶和分离凝胶的 pH 值和凝胶孔径都不相同, 构成了凝胶的不连续性。这个方法设备简单, 灵敏度高, 时间短, 它的不连续性能使区带变窄, 因而更提高了分辨率, 成为蛋白质, 核酸研究中最广泛应用的分析方法之一, 是鉴定多种化合物纯度必不可少的一种手段。有关这个方法的详细原理可参考有关文献^[5-9]。

一、原料

主要原料为丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺。当纯度不够时, 前者可以在氯仿中进行重结晶, 后者可以在丙酮中进行重结晶^[10]。把它们配成工作贮液后在 4℃ 可以保存 1—2 月, 如发现 pH 变高(酰胺基水解)则不能再用。这二种化合物都有毒性, 操作时要小心。

催化剂过硫酸铵 (AP), 溶液很不稳定, 当它的 1% 水溶液的 pH 小于 2 时, 必须重配, 在冰箱中放置也不能超过一星期, 最好用新鲜配制的溶液。

加速剂 N, N, N', N'-四甲基乙二胺 (TEMED) 最好密封避光保存。

二、设备 (图 1)

1. 电泳玻璃管: 采用弱碱性的匀质玻璃管。

本稿经张树政同志审阅, 并提出宝贵意见。

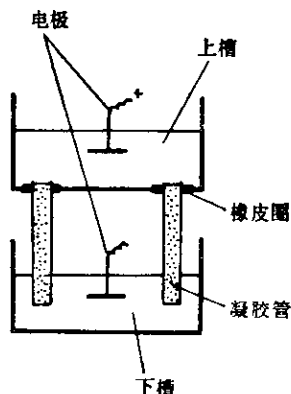


图1 盘状电泳简图

内径5—6毫米,管长65—80毫米,管的两端用金钢砂磨平。

2. 电泳槽: 用玻璃或有机玻璃做成圆筒形分上下两个槽, 一般两个槽共装缓冲液500—800毫升。下槽底部中央放一个白金电极, 用白金丝熔接在玻璃管中或绕在玻璃棒上即可。上槽底部要打8—12个孔, 电泳时用橡皮垫圈把玻璃管垂直固定在孔中, 要保证不漏水。上槽的白金电极可以固定在盖子上, 电泳时盖上, 以接通电路。电极与各管中心的距离要相等, 以保证电极与各管之间的电位梯度相等。

3. 电源: 直流稳压电源, 电压1000伏, 电流50毫安。

4. 其他设备: 日光灯, 微量注射器, 带长针头(8厘米)的普通注射器, 带弯尖针头的注射器。

三、操作步骤

(一) 制备凝胶

1. 按表1配制各种贮液, 不用时冰箱保存。
2. 将清洁干燥的玻璃管垂直固定在外径相同的试管架上, 底部用青霉素小瓶的橡皮塞堵住, 或套上一小段乳胶管, 乳胶管的另一端塞入一小段与玻璃管外径相同的玻璃柱, 备用。

3. 由冰箱中取出贮液, 放置在室温下。先制备分离凝胶, 按表1的配制体积比, 根据所选择的凝胶系统将1号、2号、3号贮液以及水混合, 在真空干燥器中抽出溶解的空气, 然后加入TEMED, 轻轻搅匀, 用注射器或细滴管取一定

量沿管壁慢慢加入上面准备好的玻璃管中, 加到所需高度(约55毫米)。轻轻敲打玻璃管底部, 排除小气泡, 然后用一个带弯尖针头的注射器在分离凝胶液面上沿管壁加入事先已抽去空气的蒸馏水层, 高3—4毫米, 尽量不要扰乱液面, 以便隔绝空气, 并避免凝胶表面形成弯月形。刚加水时看出有界面, 以后逐渐消失, 再出现界面时, 表明凝胶已聚合。

4. 分离凝胶聚合后放置20—30分钟, 将水吸去, 用少量已抽气的间隔凝胶混合液洗1—2次, 弃去, 然后加入间隔凝胶混合液达0.5—1厘米高, 同上法盖水层。采用光聚合方法时, 则放在日光灯下距离2—3厘米照射20分钟左右, 凝胶聚合后呈乳白色。吸去凝胶表面的水层, 换上电极缓冲液, 备用。

在聚合以后的凝胶中, 可能有些残留物质, 如过量的过硫酸铵, 对样品会有影响, 可以在分离凝胶聚合后, 用分离凝胶的缓冲液先进行一次预电泳, 3毫安/管, 30分钟, 2小时, 电泳后, 再按上法制备间隔凝胶。

(二) 样品准备

Davis介绍的方法^[4], 是将血清样品3—4微升(约200微克蛋白)和0.15毫升样品凝胶溶液混合制备凝胶, 但有些样品会抑制凝胶聚合, 而光照也可能引起某些蛋白质变性, 因此近来一般都不采用样品凝胶, 而是将样品溶解在以下混合液中, B液:水:20%蔗糖液=1:3:4^[11]。其中B液是指Davis原配方中的B液, 相当于表1中的4号贮液。若样品本身是稀溶液时, 可以根据样品用量, 扣除混合液中的水量。

含盐浓度高的样品必须进行透析除盐, 再对稀释8倍的4号贮液进行透析, 否则影响电泳的速度。

(三) 电泳操作

1. 安装凝胶管: 除去玻璃管下边的塞子, 把带有凝胶的玻璃管固定在上槽的孔中保持垂直位置, 在下槽中注满电极缓冲液, 加放上槽。

2. 加样: 每根凝胶表面上部放满电极缓冲液。样品溶液[如(二)中制备]中加示踪染料, 碱性缓冲系统可加入溴酚蓝(通常每根凝胶加

表 1 不连续盘状电泳的凝胶系统

	编号	高 pH——不连续系统		中性 pH——不连续系统		低 pH——不连续系统	
		贮液	配制体积比*	贮液	配制体积比*	贮液	配制体积比*
分离凝胶	1	1N HCl 48毫升 tris 36.3克 加水到 100毫升 pH 8.9	1.25	1N HCl 48毫升 tris 6.85克 加水到 100毫升 pH 7.5	1.25	1N KOH 48毫升 冰醋酸 17.2毫升 加水到 100毫升 pH 4.3	1.25
	2	Aa 30克 Bis 0.8克 加水到 100毫升	x**	Aa 30克 Bis 0.8克 加水到 100毫升	x**	Aa 30克 Bis 0.8克 加水到 100毫升	x**
		TEMED	0.005	TEMED	0.005	TEMED	0.005
		加水到	9.95	加水到	9.95	加水到	9.95
	3	Ap(10%)	0.05	Ap (10%)	0.05	Ap (10%)	0.05
间隔凝胶、样品凝胶	4	1N HCl 48毫升 tris 5.98克 加水到 100毫升 pH 6.7	1.25	1N HCl 48毫升 tris 4.95克 加水到 100毫升 pH 5.5	1.25	1N KOH 48毫升 冰醋酸 2.87毫升 加水到 100毫升 pH 6.7	1.25
	5	Aa 30克 Bis 0.8克 加水到 100毫升	1.00	Aa 30克 Bis 0.8克 加水到 100毫升	1.00	Aa 30克 Bis 0.8克 加水到 100毫升	1.00
		TEMED	0.005	TEMED	0.005	TEMED	0.005
		水	7.64	水	7.64	水	7.64
		Ap(10%)†	0.10	Ap(10%)†	0.10	Ap(10%)†	0.10
电极缓冲液		tris 6克 甘氨酸 28.8克 加水到 1000毫升 pH 8.3 不稀释或稀释10倍		二乙基巴比妥酸 5.52克 tris 1克 加水到 1000毫升 pH 7.0 不稀释		β-丙氨酸 31.2克 冰醋酸 8毫升 加水到 1000毫升 pH 4.5 不稀释或稀释10倍	
电极		上 (-) 下 (+)		上 (-) 下 (+)		上 (+) 下 (-)	

* 配制体积比是指总体积为 10 时, 各种贮液的体积比例量。

** x 值可以根据需要的凝胶浓度(%)从下列关系中找到:

欲配凝胶浓度(%)	2.5	5.0	7.5	10	13	15	20
x 值	0.83	1.67	2.50	3.33	4.33	5.00	6.67

† 间隔凝胶采用光聚合方法时, 可用 1—1.5 毫升 4% 核黄素液代替 Ap 液。

0.1% 染料液 5 微升); 酸性缓冲系统可加入次甲基蓝。用微量注射器取一定量样品溶液(含 1—100 微克蛋白)加在缓冲液的下层凝胶的上面。注意不要使样品与缓冲液混合。

3. 电泳: 上槽中轻轻注满电极缓冲液, 接通电源, 开始电流每根凝胶管 2 毫安, 当样品进入分离凝胶后电流增大至每管 3—5 毫安。不

稳定的样品可在低温进行电泳, 当示踪染料走到距凝胶末端 0.5—1 厘米处停止电泳。缓冲液可以反复使用, 但上下槽不要混合或互换。

4. 取出凝胶: 用一根长针头的注射器吸满水, 将针头插入凝胶与管壁之间, 一边慢慢旋转玻璃管, 一边推针前进, 同时注水, 凝胶即可取出。如凝胶浓度高, 取出困难时, 可用 10% 的

甘油水溶液代替水注入。

(四) 染色、脱色、保存

常用下述两种染色剂染色。方法是:

1 克氨基黑 10B(Amido black 10B)溶于100毫升7% 醋酸中,它同时有固定和染色的作用,每条凝胶浸在染色液中约1—2小时,取出凝胶,以水冲去表面的染料,浸于7% 醋酸中,不断更换洗脱液直至背景几乎无色为止,保存于7% 醋酸中。

用50%三氯醋酸液配成0.1% 考马斯亮蓝 R250 (Coomassie brilliant blue R250)溶液。电泳后凝胶先放在12.5%三氯醋酸中固定30分钟;然后在上述染色液中染色1—2小时,以7% 醋酸脱色,保存于7% 醋酸中。

其他染色方法可参阅文献[5,7]。

电泳后凝胶也可不经染色而直接用紫外光凝胶扫描仪扫描。国产电泳光密度扫描仪DGS 1型(北京试验设备厂制)可以扫描染色后的凝胶区带并积分面积。

四、工作中的一些问题

(一) 聚丙烯酰胺凝胶孔径和凝胶系统的选择

由于聚丙烯酰胺凝胶电泳除电荷效应外,还有分子筛效应,因此选择合适孔径的凝胶是成功地进行分离的关键,实验证明当凝胶的孔径大约是蛋白质分子平均大小的一半时,分离较理想,大致范围如下:

蛋白质:

分子量范围	适用凝胶浓度(%)
<10 ⁴	20—30
1—4×10 ⁴	15—20
4×10 ⁴ —1×10 ⁵	10—15
1—5×10 ⁵	5—10
>5×10 ⁵	2—5

核酸 (RNA):

分子量范围	适用凝胶浓度(%)
<10 ⁴	15—20
10 ⁴ —10 ⁵	5—10
10 ⁵ —2×10 ⁶	2—2.6

常用的标准凝胶浓度为7.5%。它适合分离多数生物体内的蛋白质。分析未知样品时,若染色后在间隔凝胶与分离凝胶界面处有染色很深的区带,说明凝胶孔径太小,需要用一系列降低浓度的凝胶进行试验来选择。

选择合适 pH 的凝胶系统,可以使分离物有较多的基团解离,达到较好分离效果,如表1所列高 pH 值凝胶系统适用于分离酸性或中性蛋白质,中性 pH 值系统适用于酸性或中性蛋白质,尤其是酶。低 pH 值系统则适用于碱性或中性蛋白质。

需要注意,只采用一种 pH 值的凝胶系统或只用一种凝胶浓度时,得到单一区带还不能充分证明是均一的物质,例如 β -酪素 A¹、A²、A³ 每分子分别含有 6、5 和 4 个组氨酸残基,当它们在 pH 9 电泳时,由于组氨酸侧链不带电而只呈现出一个均一区带,但当它们在含 4.5 克分子尿素的 pH 3 甲酸-乙酸缓冲液中电泳时,能分成三个区带^[12]。另如铁蛋白和卵运铁蛋白在分子量和电荷上都差异很大,但在凝胶浓度为 5.7% 时迁移率相同,只呈现出一个均一的区带^[13]。因此在鉴定混合物的纯度时最好采用两种以上不同 pH 的凝胶系统以及两种以上浓度的凝胶。

(二) 聚合反应的控制

对于一个已选定的凝胶系统,要保证良好的可重复性,必须注意控制聚合反应的条件,聚合速率太快太慢都会影响凝胶孔径,一般通过调节 TEMED 的用量控制凝胶在 30 分—1 小时内聚合,使 95% 以上的单体转变成多聚物。当在酸性溶液中制备凝胶时,可以增加 TEMED 的用量。然而,胺会增加缓冲液的 pH,需要先经过长时间电泳来除去凝胶中有催化作用的副产物,也可以在每 100 毫升丙烯酰胺溶液中加入 0.5 毫升 30% H₂O₂ 和 0.35 克硫脲来代替预电泳^[12],这种方法并不会影响缓冲液的离子强度。

氧是聚合反应的抑制剂,在聚合前混合液先经过抽气以及聚合时加盖水层都是为了降低氧浓度,保证聚合反应正常进行。

此外,温度也能影响聚合速率。增加温度

会加快聚合反应,但一般不作为控制聚合反应速率的手段,常在聚合时保持恒定温度。

(三) 聚合物的分离

蛋白质高度聚合时,可以利用尿素或 β -巯基乙醇处理以得到蛋白质的单体,但由于尿素中常混有氰酸盐;在碱性 pH 时蛋白质中的赖氨酸基团会发生氨基甲酰化作用,产生假区带。为此,可以将尿素溶液通过混合离子交换树脂(Amberlite MB-1 和 5%IR-128)床以除去氰酸盐。在碱性 pH 下,一旦蛋白质溶于尿素后就必须立即使用。盐酸胍不能用作分离试剂,因为它的溶液具有高的导电性。SDS 虽然是一个很好的分散剂,但由于它能改变电荷因而会使原来较小的电荷差别消失^[12]。

(四) 浓度梯度凝胶电泳

采用丙烯酰胺浓度梯度凝胶电泳可以提高分辨率。在这种系统中,同一条凝胶柱中做成不同浓度的凝胶,而凝胶的孔径大小也成相应的梯度。阶梯式的不连续凝胶浓度梯度是由两种或两种以上浓度的凝胶重叠而成;而浓度从上至下线性连续递增的凝胶是利用浓度梯度混合器来制成,线性梯度为 4—20% 的凝胶适用于分离蛋白质,而 2.5—12% 的凝胶适用于分离 RNA^[5,7]。

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

Shapiro 等^[14]发现洗净剂十二烷基硫酸钠(SDS)可使蛋白质离解成多肽链。在 SDS 存在下通过聚丙烯酰胺凝胶电泳可以测出多肽链的分子量。后来由 Weber 等^[15]证实和发展了这个方法,他们用 37 种已知分子量的多肽链进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,结果发现蛋白质的相对迁移率和分子量对数呈直线关系(见图2)。实验证明,用这个方法测定分子量,结果可靠,重复性高。并且在一个较广的分子量范围内(15,000—200,000)有很好的分辨能力,精确度为 $\pm 10\%$ 。由于这种方法所需设备简单,操作时间短,近年来应用日益广泛,特别是用于分析多成分的系统,如复合的酶、病毒和膜等。同时

还可以将分离的多肽链洗脱下来,除去 SDS 后进一步进行氨基酸分析,肽图谱, N-末端及 C-末端的测定等。此外还可以使这些蛋白质组分恢复活性,以进一步研究它们的酶和抗原的性质^[16]。

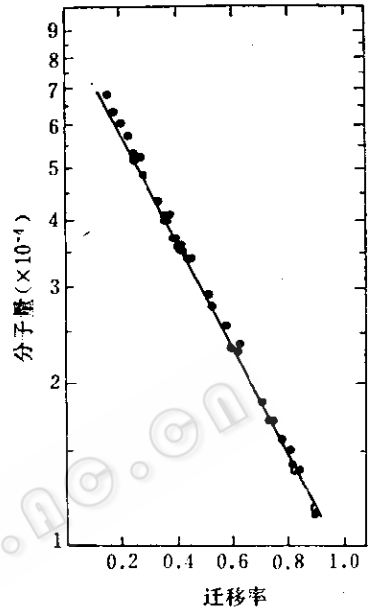


图2 37种不同多肽链用 SDS 凝胶电泳测分子量

一、基本原理

SDS 和蛋白质的结合取决于 SDS 单体的浓度,当它在水溶液中的单体浓度为 0.5 毫克分子以上时,蛋白质和 SDS 结合成复合物;当单体浓度大于 1 毫克分子时,大多数蛋白质以 1.4 克 SDS/克蛋白质的比例结合,蛋白质和 SDS 结合后,带上大量 SDS 的阴离子,所结合的 SDS 负电荷大大超过了天然蛋白质的原有电荷,因而就消除了不同蛋白质之间原有电荷的差异,因此 SDS-蛋白质复合物之间的不同迁移率便比较单纯地反应了蛋白质分子量的差别。

与 SDS 结合的蛋白质,其构型发生改变,如增加了螺旋构型。由亚单位组成的蛋白质和 SDS 结合后大多数都解离成亚单位,因此用这个方法测得的分子量是亚单位的分子量。通过 SDS-蛋白质复合物的流体动力学和光学性质的研究证明,复合物是椭圆形或杆状,它的短轴

总是大约为 18 Å, 与蛋白质的种类无关, 而它的长轴与分子量成比例^[16]。

二、方 法

这里主要介绍的是常用的 SDS-磷酸系统。

(一) 原料

用分析试剂 SDS, 纯度不够时可以在乙醇中进行重结晶^[17]。

其他原料和设备与聚丙烯酰胺凝胶电泳所用相同。

(二) 操作

1. 溶液的配制:

丙烯酰胺溶液 A: 22.2 克 Aa, 0.6 克 Bis, 加水到 100 毫升。

丙烯酰胺溶液 B: 44.4 克 Aa, 1.2 克 Bis, 加水到 100 毫升。

凝胶缓冲液: 7.8 克 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 38.6 克 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 克 SDS 溶成 1000 毫升。

过硫酸铵液: 15 毫克/毫升水

加速剂 TEMED

样品处理液: 50 毫升 pH 7.0 的 0.02 M 磷酸缓冲液, 1 毫升 β -巯基乙醇, 1 克 SDS。

透析缓冲液: 100 毫升 pH 7.0 的 0.01 M 磷酸缓冲液, 0.1 克 SDS, 0.1 毫升 β -巯基乙醇。

加样液: 10 毫升透析缓冲液, 1 毫升 β -巯基乙醇, 5 毫升甘油, 0.6 毫升 0.05% 溴酚蓝液。

电极缓冲液: 凝胶缓冲液(溶液 3) 用水稀释 1 倍。

染色液: 1.25 克考马斯亮蓝溶于 454 毫升 50% 甲醇中然后加入 46 毫升冰醋酸。

脱色液: 75 毫升冰醋酸, 50 毫升甲醇, 875 毫升水。

2. 制备凝胶: 管长 10 厘米, 内径 5—6 毫米, 凝胶长 7.5 厘米。根据所需要的丙烯酰胺凝胶浓度, 从表 2 查出各种溶液的体积。除 TEMED 外将其他各溶液混合, 抽气, 抽气后加入 TEMED。制备凝胶的方法同聚丙烯酰胺凝胶电泳。

3. 样品处理: 取三种以上已知分子量的标

表 2 制备各种浓度的 SDS 磷酸凝胶的配比

溶液(毫升)	丙烯酰胺最终浓度(%)					
	20	15	10	7.5	5	3.3
丙烯酰胺溶液 A(1)	—	—	13.5	10.1	6.75	4.5
丙烯酰胺溶液 B(2)	13.5	10.1	—	—	—	—
水	0	3.4	0	3.4	6.75	9.0
凝胶缓冲液(3)	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0
过硫酸铵液(4)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
TEMED (5)	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045

准蛋白质配成 2 毫克/毫升水溶液, 取出 1 毫升蛋白质溶液加 1 毫升(等体积)样品处理液, 置于 37℃ 水浴作用 2 小时(或 100℃ 3—5 分钟), 取出, 在室温下对透析缓冲液透析过夜, 欲测样品同上处理。

4. 电泳: 于每根凝胶管中分别加入约 50 微升上述处理过样品液, 加入等体积加样液, 使各标准样品和欲测样品在同一电泳槽(同聚丙烯酰胺凝胶电泳槽)中进行电泳, 电流: 8 毫安/管, 电泳时间一般需 5 小时。

5. 染色和脱色: 取出凝胶(方法同聚丙烯酰胺凝胶电泳法)置于 25 毫升试管中, 加入染色液染色 2 小时, 然后用脱色液脱色, 直至背景颜色褪尽为止。

6. 绘制标准曲线: 由实验量出各种标准蛋白的移动距离以及溴酚蓝的移动距离, 算出标准蛋白质相对于溴酚蓝的相对迁移率。在半对数坐标纸上, 以标准蛋白质的分子量作纵坐标, 以相对迁移率作横坐标作图得出标准曲线。

7. 查出分子量: 按上述方法求出欲测蛋白质的相对迁移率, 在标准曲线上查出对应的分子量。

三、工作中一些问题

(一) 凝胶浓度的选择

根据经验, 10% 凝胶适用于分离分子量范围为 10,000—70,000 的物质, 5% 凝胶适用于分子量范围 25,000—200,000, 3.3% 凝胶可以分离特别高的分子量, 如高至 1,000,000 的成分也能进入这种凝胶, 15% 凝胶可用于分离分子量在 50,000 以下的成分。

在制备凝胶的过程中,由于 SDS 的存在,抽气时泡沫很多,影响抽气的完全,因此也可以把 SDS 固体在抽气后加入凝聚。

(二) 蛋白质和 SDS 的不正常结合

大多数蛋白质在 SDS 系统中移动距离只取决于分子量。但有时出现一些不正常现象,这是由于有些蛋白质和 SDS 结合量的不正常或它们原有电荷特殊等因素造成的。例如酸性蛋白质(如胃蛋白酶)因带负电与 SDS 相互排斥,结合量便少。核糖核酸酶和牛血清清蛋白有相当牢固的二硫键,因此每克蛋白质只能结合 0.9 克 SDS。糖蛋白与 SDS 的结合量较小是由于只有蛋白质部分和 SDS 结合,然而碳水化合物这部分在电泳迁移率上起一定的作用。SDS 结合量的减少对电泳迁移率可能有两种影响:一是由于净电荷的降低使电泳迁移率减小;二是由于键合作用的降低减少了摩擦力,因此增加了迁移率。在大多数情况下,第一种影响是显著的,也就是由于蛋白质和 SDS 结合量的降低,使电泳迁移率减小,使测得的分子量偏高。另外,有些蛋白质虽然和 SDS 的结合量是正常的,但由于它原来带有很大的正电荷,在电泳时使迁移率降低,因而测得的分子量偏高,如组蛋白 F₁ 在 SDS-磷酸凝胶上测得分子量为 35,000,而实际上它的分子量为 21,000^[16]。

(三) 低分子量蛋白质的分离

低分子量蛋白质在进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳时常出现一些不正常情况。例如在 Q β 噬菌体的各种变异株的外壳蛋白(分子量 14,000)之间,自身所带的电荷有小的差异,这种差异在 SDS 凝胶上也能反映出来^[18]。这个例子可以说明在 SDS 凝胶电泳中,小分子量的多肽链的原有电荷和构型对电泳迁移率的影响要比大分子量多肽链为大。因此,在测定小分子量蛋白质时,误差可能达 20% 或更大些,需用别的方法校正。

(四) 蛋白酶的影响^[16]

Pringle 把一些蛋白酶和 SDS 及 β -巯基乙醇在室温作用后,进行 SDS 凝胶电泳时,观察不到区带。还有很多蛋白质制剂,由于混有少量

蛋白酶,当它在室温与 SDS 和 β -巯基乙醇作用时,发生广泛的蛋白质降解作用。这是由于在室温条件下,蛋白酶失活非常慢。为了防止这种蛋白降解作用,处理样品时可以选用 100℃ 作用 3—5 分钟,这时几乎可使蛋白酶立即全部失活,而很少发生蛋白质降解作用。此外,蛋白质在盐酸胍中的烷化作用可以减少蛋白质的分解作用。

聚丙烯酰胺凝胶等电点聚焦电泳

聚丙烯酰胺凝胶聚焦电泳是将两性电解质载体结合在聚丙烯酰胺凝胶中,通电时产生 pH 梯度,蛋白质在这种 pH 梯度中,各自移向它们对应的等电点 pH 部位。这种根据蛋白质等电点的差异进行分离鉴定的方法,可以分离等电点相差仅 0.1 个 pH 单位的蛋白质,并且可以减少扩散的影响,区带集中,灵敏度高,浓度在 0.003% 以上即能分离。所需设备简单,可以利用一般的聚丙烯酰胺凝胶电泳装置。用这种方法可以粗略地测知蛋白质的等电点。这个方法还可与其他凝胶电泳方法相结合,构成双向电泳以提高分辨率。把这种方法和 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳结合起来进行双向电泳可以把大肠杆菌的蛋白质分成 100 个不同的成分^[19]。

一、方 法

(一) 原料

Ampholine, 是一种两性电解质载体,是脂肪族多氨基多羧酸类的混合物。一般商品是 40% 浓度的水溶液。有各种 pH 范围可供选用,瑞典 LKB 公司出产。现在我国已经能自己合成。

其他原料与聚丙烯酰胺凝胶电泳所用相同。

(二) 设备

玻璃管内径 5 毫米,长 65 或 120 毫米。

其他与聚丙烯酰胺凝胶电泳装置相同。

(三) 操作

1. 制备凝胶: 先按表 3 配制工作贮液。表

3 列出了光聚合以及化学聚合二种制备方法,光聚合作用只适用于两性电解质在酸性范围到pH5—8 时,化学聚合对所有的 pH 范围都适用。

表 3 凝胶等电点聚焦系统

编号	凝胶的工作贮液	配制体 积 比		电 极 液		电泳条件
		光聚合	化学聚合	上槽, ⊕	下槽, ⊖	
1	Aa 30.0 克 Bis 0.8 克 H ₂ O 到 100 毫升	3.0	3.0	0.2% 硫酸	0.4% 乙醇胺	恒定电流 2 毫安/管, 350 伏, 20℃ 3 小时(65 毫 米长) 或 5 小时(120 毫 米长)
2	TEMED 1 毫升 核黄素 14 毫克 H ₂ O 到 100 毫升	0.8	—			
3	TEMED 1 毫升 H ₂ O 到 100 毫升	—	0.8			
4	Ap 70 毫克 H ₂ O 到 100 毫升	—	4.1			
	H ₂ O	8.2	4.1			
5	40% Ampholine	0.3	0.3			

采用光聚合方法时,按表 3 将溶液 1 和 5 以及溶液 2 和水分别混合,抽气,然后混合制备凝胶。采用化学聚合方法时,将溶液 1 和 5,水以及溶液 3 和 4 分别混合,抽气,然后混合制备凝胶。制备凝胶的方法和顺序同聚丙烯酰胺凝胶电泳的方法。

2. 样品准备和加样:将蛋白质样品 1—5 毫克,加水 1 毫升,加入蔗糖 100 毫克制备成样品层。另外在载体两性电解质(40%)0.05 毫升和蔗糖 100 毫克中,加水到 2 毫升制成两性电解质层。

在凝胶顶部先充满两性电解质层,把样品层(30—300 微克)加在凝胶和两性电解质层之间,其他操作都与聚丙烯酰胺凝胶电泳相同。阳极在上部,盛 0.2% H₂SO₄,阴极在下部,放 0.4% 乙醇胺溶液,室温(20—25℃)电泳,对长管(120 毫米),电流 1 毫安/管,对短管(65 毫米),电流 2 毫安/管,电泳时间:长管 5 小时,短管 3 小时。

3. 染色、脱色、保存:由于载体两性电解质染色很深,干扰色带,因此必须在染色前先把它

除去,可以把电泳后的凝胶放在 5% 三氯乙酸中反复洗涤,不时振动,1—2 小时更换一次,至少洗 5 次。或采用电泳洗涤:把凝胶取出后放在大一些的玻璃管中,管的下端收缩些,以存住凝胶,用 2.5% 三氯乙酸 10 毫安/管电泳过夜。将除去两性电解质的凝胶用氨基黑或考马斯亮蓝染色液染色(染色液配法同前),染色 1 小时后,用 7% 醋酸脱色,保存于 7% 醋酸中。

4. pH 梯度的测定:两条凝胶同时电泳,其中一条加样品,另一条不加样品。电泳后将含有样品的凝胶染色,另一条不含样品的凝胶等分成 10—20 段,每一小段溶于少量蒸馏水(1—2 毫升)中,测定提取液的 pH,或者用微量玻璃电极直接接触到凝胶表面测出。对照染色凝胶可以找出区带所在位置的 pH。

二、工作中一些问题

(一) 凝胶浓度的选择

采用聚丙烯酰胺凝胶作为稳定 pH 的支持基质,是因为它在 pH3—10 范围内含很少带电基团,电渗也很低,稳定性也合适。但需要注意,聚丙烯酰胺凝胶等电点聚焦电泳虽然和聚丙烯酰胺凝胶电泳一样,也是采用聚丙烯酰胺凝胶作支持基质,但分离原理并不相同,它并不利用凝胶的分子筛作用,只是把凝胶作为稳定 pH 梯度的一种介质,而分离作用仅取决于 pH。因此选择凝胶浓度的原则也就不一样,在凝胶等电点聚焦电泳中,对凝胶孔径的要求并不严格,只要使区带聚集时不受太大的阻力就可以。一般 7.5% 浓度的凝胶可以允许分子量约 10 万的蛋白质移动,分子量大时,可采用较低的凝胶浓度,当凝胶浓度太小时,可加入琼脂糖(agarose)以增加凝胶强度。

(二) 聚合方法的选择

化学聚合虽是一种比光聚合更可靠的方法,而且适用的 pH 范围也较广,但有时在凝胶电泳中发现有假相形成。因此,常在 pH 4 或 8, 25—50 伏电压下电泳 30 分钟除去残存的过硫酸盐以避免出现不正常现象^[20]。但 Wrigley 发现用化学聚合的凝胶进行血红蛋白的等电聚

焦电泳时,预先电泳 80 分钟还不能避免不正常情况^[21]。因此在合适的 pH 范围内尽可能采用光聚合的方法。采用光聚合方法,当凝胶溶液的 pH 大于 7 而聚合困难时,可以加适量稀硫酸使 pH 降低至 7 左右。

(三) 凝胶中 pH 梯度的形成

在 pH 梯度形成的过程中,凝胶的电阻增加,但当梯度确立后,电阻为常数。对 pH3—10 范围 15 分钟就能建立 pH 梯度,但对窄的 pH 范围确立梯度所需的时间较长,pH10 以上的梯

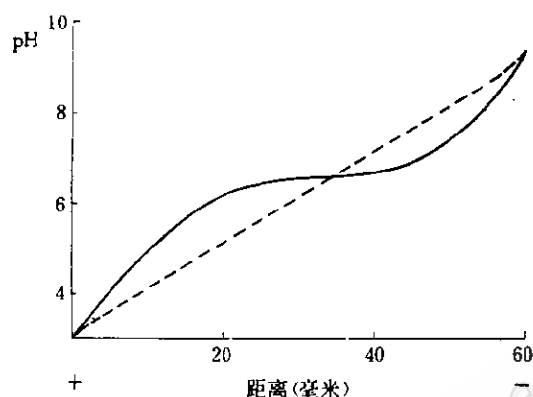


图3 凝胶不同距离的 pH 变化

度需电泳 30 分钟才能确立。图 3 表示了凝胶不同距离的 pH 变化,实线为聚焦电泳 10 分钟,虚线表示电泳 30 分钟。凝胶内含 pH3—10 载体两性电解质^[20]。

但需要注意,蛋白质聚焦的时间往往比确立 pH 梯度的时间要长,尤其在窄的 pH 范围内,区带集中的时间要比在宽 pH 范围内长一些。因此必须保证充分的时间使每一个成分能够移动到它的等电点 pH 部位,具体时间最好通过实验决定。

(四) pH 和凝胶长度的影响

利用窄的 pH 范围的电解质以及增加凝胶管的长度,可以提高分辨能力。在常规的凝胶电泳中,管子的长度约 65 毫米比较合适,因为延长电泳会增加区带的扩散,因此增加管子的长度优越性不大。然而在凝胶等电点聚焦电泳中,区带的分离决定于 pH,扩散的影响不大,因此两倍长的凝胶对分离是有利的。例如 Wrigley

将卵白蛋白(ovalbumin)在 pH3—10 范围内分离得 A₁ 和 A₂ 两成分,当改用 pH4—6 范围,管长 120 毫米时,可以分离得到 A₁, A₂ 和 A₃ 三个成分。

以上几种方法也都可以制备成垂直平板状的凝胶,进行垂直板型电泳。这种型式便于同时电泳几个样品,进行比较。并可用作制备目的。垂直板型凝胶电泳的装置可参考有关文献^[22,23]。

参 考 文 献

- [1] Gill, H. S. and D. Powell: *Phytopathol. Z.*, **63**: 23—29, 1968.
- [2] Gill, H. S. and G. A. Zentmyer: *Phytopathol.*, **68**:163—167, 1978.
- [3] Gottlieb, D. and P. M. Hepden: *J. Gen. Microbiol.*, **44**:95—104, 1966.
- [4] Davis, B. J.: *Annals N. Y. Acad. Sci.*, **121**: 404—427, 1964.
- [5] Maurer, H. R.: *Disc Electrophoresis and Related Techniques of Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, 2nd ed., Walter de Gruyter, Berlin, New York, 1971.
- [6] 张树政、王杨声:化学通报,1973 年第 1 期,30—38 页。
- [7] 乔克强、徐乃正、方荣祥:聚丙烯酰胺凝胶电泳,第一版,科学出版社,北京,1975。
- [8] Cooksey, K. E.: *Disc Electrophoresis, Methods in Microbiology* (ed. by Norris, J. R. and D. W. Ribbons) Vol. 5 B, Academic Press, London and New York, 1971, pp. 573—594.
- [9] Gabriel, O.: *Analytical Disc Gel Electrophoresis, Methods in Enzymology* (ed. by Colowick, S. P. and Kaplan, N. O.) Vol. XXII, Academic Press, New York, 1971, pp. 565—578.
- [10] Loening, U. E.: *Biochem. J.*, **102**:251—257, 1967.
- [11] Narayan, K. A., S. Narayan and F. A. Kummerow: *J. Chromatography*, **16**:187—193, 1964.
- [12] Peterson, R. F.: *The Applicability of Acrylamide Gel Electrophoresis to Determination of Protein Purity, Methods in Enzymology* (ed. by Colowick, S. P. and N. O. Kaplan), Vol. XXV, Academic Press, New York, 1972.
- [13] Hedrick, J. L. and A. J. Smith: *Arch. Biochem. Biophys.*, **126**:155—164, 1968.
- [14] Shapiro, A. L., E. Viñuela and J. V. Maizel: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **28**:815—820, 1967.
- [15] Weber, K. and M. Osborn: *J. Biol. Chem.*, **244**: 4406—4412, 1969.
- [16] Weber, K. and M. Osborn: *Proteins and Sodium Dodecyl Sulfate: Molecular Weight Determina-* (下转第 17 页)

(上接第 41 页)

- tion on Polyacrylamide Gels and Related Procedures, *The Proteins*, 3rd ed., (ed. by Neurath, H. and Hill, R. L.), Vol. I, Academic Pr., New York, 1975, p. 180.
- [17] Crestfield, A. M., K. C. Smith and F. W. Allen: *J. Biol. Chem.*, **216**:185—193, 1955.
- [18] Strauss, E. G. and P. Kaesberg: *Virology*, **42**: 437—452, 1970.
- [19] Patrick, H.: *J. Biol. Chem.*, **250**:4007—4021, 1975.
- [20] Wrigley, C. W.: Electrofocusing of Proteins (8.3 Gel Electrofocusing), *New Techniques in Amino Acid, Peptide, and Protein Analysis*, (ed. by Niederwieser, A. and G. Pataki), Ann Arbor Science Publishers, Inc., Michigan, 1971, pp. 316—332.
- [21] Wrigley, C. W.: *Sci. Tools*, **15**:17—22, 1968.
- [22] 中国科学院上海生物化学研究所代谢调节控制组: 生物化学与生物物理进展, 1974 年, 第 1 期, 52—55 页。
- [23] 中国科学院微生物研究所酶结构与功能研究组: 生物化学与生物物理进展, 1976 年, 第 4 期, 36—39 页。