

聚丙烯酰胺凝胶薄层等电聚焦*

杨寿钧

(中国科学院微生物研究所, 北京)

自 Awdeh^[1] 和 Leaback^[2] 等以聚丙烯酰胺凝胶作抗对流支持介质进行薄层等电聚焦以来, 又出现过以 Sephadex^[3]、Agarose^[4]、醋酸纤维素^[5]等作抗对流介质的报道。当前应用最多的是聚丙烯酰胺凝胶和 Agarose 凝胶, 现以前者为例介绍方法的原理、操作和应用。

聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦时所用凝胶, 有圆柱型和薄层型两种, 后者较前者具有以下优点:

1. 可在同一薄层上同时比较多个样品;
2. 样品和标准等电点的蛋白质可在同一薄层上电泳, 便于对照;
3. 样品可用各种方法悬于凝胶上, 不受位置限制, 从而避免了圆柱凝胶中样品和电极附近极端 pH 相接触的危险;
4. 导电溶液的种类和浓度无严格限制;
5. 同一薄层上的样品电泳后可用不同方法检测(如直接染色, 活性测定, 免疫沉淀等);
6. 可以用表面微电极直接在凝胶表面测定 pH 值;
7. 染色、脱色和分段等操作简单易行, 可省去处理多数圆柱凝胶的时间。

由于上述优点, 而且仪器设备简单; 样品用量少, 一般只需数微克到十几微克; 分辨率高, 即使化学结构上相差一个氨基或只有很小的电荷差异的两种化合物也能分离开。因此, 这种方法已被广泛应用于多种科研与应用领域。

基本原理

在直流电场中, 带电荷的蛋白质分子将依其所带电荷极性及其大小之不同, 以不同迁移率向正负两极移动。如图 1 所示, 矩形代表蛋白质分子, “+”、“-”号表示所带电荷, 差值表示

净电荷。电场中从阳极到阴极由载体两性电解质形成稳定的 pH 梯度 (pH3—11), 蛋白质的正电基团(氨基和胍基等)在 pH 值比它的解离常数低时, 通常带正电荷; 负电基团(羧基等)在 pH 值比它的解离常数高时, 通常带负电荷。如果一个蛋白质分子处在低于它的等电点的 pH 环境中, 带正的净电荷, 并向阴极移动; 在 pH 值和它的等电点相等处, 净电荷为零, 即停止泳动。相反, 如果蛋白质分子所处环境的 pH 值高于等电点处, 将带净的负电荷, 向阳极移动。这样, 经过电泳, 不同等电点的蛋白质将集中在相当于它的等电点的位置上, 从而实现了分离。测定某蛋白质聚集区带所处位置的 pH 值, 就是该蛋白质的等电点。

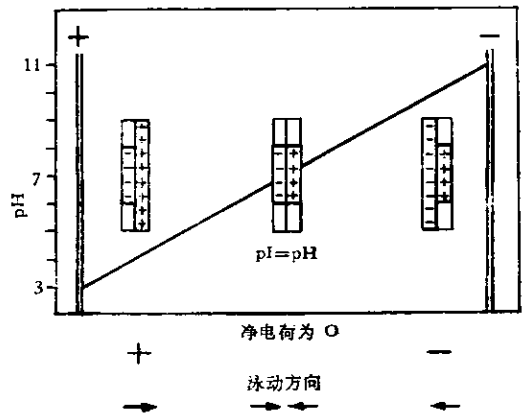


图 1 蛋白质在电场中等电聚焦示意图

操作方法^[6-9]

一、仪器

由直流电源、冷却板、凝胶板和电极板等组

* 本文承张树政先生审改, 谨致谢意。

成。现有瑞典 LKB 公司成套装置,名 Multiphor 电泳仪出售,其结构如图 2 所示。

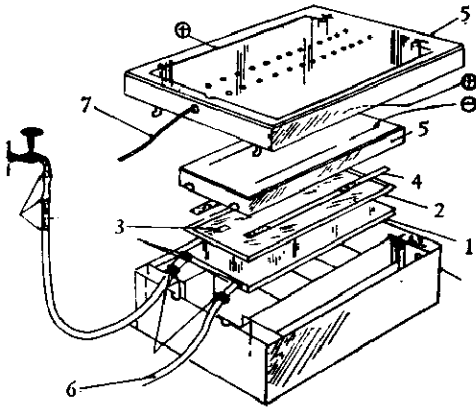


图 2 薄层凝胶等电聚焦仪

1: 冷却板 2: 凝胶板 3: 加样滤纸条 4: 电极滤纸条 5: 电极板 6: 循环水进出口 7: 电极电缆

直流电源要求量程为 50 mA, 1000—1200 V; 冷却板要求表面光滑, 传热快; 凝胶板可大可小, 随试验要求而定, 一般分析 25 个样品可用大小为 25 × 16.5cm 的, 样品少可用载玻片, 其厚度不宜超过 2mm。凝胶厚度, 一般分析鉴定以 1—2mm 为宜。

二、凝胶的制备

原料为丙烯酰胺和 N, N'-甲叉双丙烯酰胺 (Bis), 一般用化学试剂即可, 如纯度有问题, 应重结晶纯化。由于在等电聚焦中, 凝胶只作为抗对流的支持介质, 不利用其分子筛性质。因此, 凝胶浓度的选择只要所形成的孔径不阻碍样品分子移动即可。有人认为浓度为 5% 的凝胶, 交链剂浓度为 3% 较适宜于分析一般蛋白质样品^[4]。有时为了提高凝胶强度, 在其中加入适量甘油、蔗糖、尿素等。加入这些化合物可减少等电聚焦中常遇到的“坪现象”(plateau phenomenon)。

凝胶聚合可用化学聚合或光照, 通常多用后者。载体两性电解质具有四级胺性质, 可以代替四甲基乙二胺 (TEMED) 起促进作用, 故可省去后者。制备凝胶的贮备液和工作液列于表 1 中。贮备液可在 4°C 冰箱中保存一周。

载体两性电解质现有 Ampholine、Pharmalyte、Servalyte 等商品(一般浓度为 40%), 也可以自己合成^[10]。它们在凝胶中的浓度为 2%。凝胶要求的 pH 范围, 最好用不同 pH 范围的载体两性电解质组成, 这样可以避免 pH 梯度不平滑、靠近电极两端 pH 梯度变陡, 以及在 pH 5 附近出现坪现象。

操作时, 取两块大小相同的玻璃板, 中间夹橡皮垫圈, 垫圈厚度即为凝胶厚度, 四周用弹簧夹夹紧, 如图 3 所示, 垂直放置。按表 1 比例配制凝胶工作液, AB 液同放一只烧杯中, 其余

表 1 凝胶工作液配比

贮备液(重量/体积)或其它成分	制备不同 pH 范围凝胶所需体积(ml)			
	3.9—9.5	2.5—6.0	5.0—8.5	7.5—10.5
丙烯酰胺 29.1%(A)	10	10	10	10
N,N'-甲叉双丙烯酰胺 0.9%(B)	10	10	10	10
核黄素 0.004%	0.4	0.4	0.4	—
过硫酸铵 1%	—	—	—	0.4
蔗糖 25%	30	30	30	—
甘油 25%	—	—	—	30
(Ampholine)				
pH 3.5—10	2.8	—	—	—
2.5—4	—	1.2	—	—
4—6	0.2	1.2	—	—
5—7	0.2	0.6	1.5	—
7—9	—	—	1.5	0.2
9—11	0.4	—	—	3.6
蒸馏水	6.0	6.6	6.6	5.4
总体积	60	60	60	60
聚合方式	光照		聚合	化学聚合

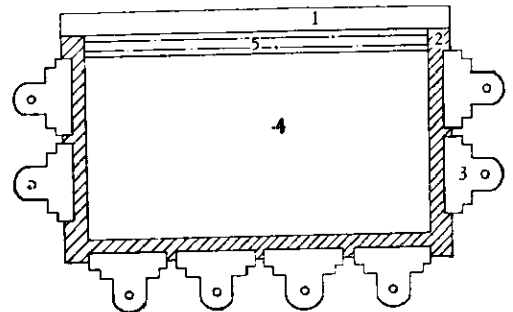


图 3 制备凝胶薄层的装置

1: 玻璃板 2: 垫圈 3: 弹簧夹 4: 凝胶液 5: 蒸馏水层

溶液和载体两性电解质放在另一只烧杯中，两烧杯放在真空干燥器中，室温下抽气 10 分钟左右，待溶液不再有气泡产生，停止抽气，取出烧杯，将溶液充分混合，用注射器将溶液沿玻璃板壁缓缓加入两板之间。加时注意勿产生气泡。最后加一层厚约 2—3mm 的蒸馏水在凝胶液上，在日光灯下照射 0.5—1 小时，使凝胶完全聚合。

三、样品的预处理和加样方法

样品可直接溶于蒸馏水或缓冲液中，缓冲液浓度一般为 0.01—0.05M，不应超过 0.05M。当样品要求较高离子强度时，可用 1—2% 的载体两性电解质溶液代替缓冲液。

样品电泳前必须使其中盐浓度降至 0.5mM 以下，可用透析法除盐。否则含盐样品电泳时易生热，影响分离效果。

分析样品的上样量，取决于检测方法的灵敏度。用 Coomassia blue R250 直接染色，可检测 1 μ g 蛋白质；用活性测定、免疫沉淀、放射自显影等方法检测则更灵敏。一般上样量以 10—15 μ g 为宜。

上样方法是：取 1.0 \times 0.5cm 的 Whatman 3mm 滤纸条，蘸取样品溶液或将滤纸直接放在凝胶表面。若样品过稀，可在凝胶表面挖一小洞或小槽，放入样品。样品可放在稍离电极的

任何地方。

四、电极溶液

用于不同 pH 范围的电极溶液见表 2。电泳时，取两条长度与凝胶相等，折叠成多层，宽约 1.0cm 的滤纸条，分别用正负电极液蘸湿，放在凝胶表面两端，盖上电极板，让电极板的铂丝直接压在滤纸条上。电极板的正负极与电源相同的电极联结。

五、电流、电压和聚焦时间

开始电泳时，电流一般较大，易发热，故需控制电流在一定范围内。如采用功率恒定的电源，则每次电泳均应用相同的恒定功率。一般电源，则需先在低电压下电泳 30 分钟，待电流下降后，升高电压继续电泳直到蛋白质聚焦完全。表 3 为大小是 24 \times 10 \times 0.2cm 凝胶板在不同 pH 范围下等电聚焦时，所用电流、电压和聚焦时间。

需特别指出的是，有时已经聚焦的蛋白质区带会随着聚焦时间延长而慢慢向电极两端漂移(图 4)，即发生“坪现象”。关于它的原因，Wiles 认为是由于载体两性电解质的不稳定性^[11]，Fawcett 则认为主要由于电渗造成^[12]。但均不能解释现象的本质，尚须进一步研究。不过，“坪现象”对等电聚焦的结果和重复性并无

表 2 电极溶液

凝胶的 pH 范围	负 极	正 极
3.5—9.5	1M NaOH	1M H ₃ PO ₄
2.5—6.0	0.5%, pH5—7 的 Ampholine	1M H ₃ PO ₄
5.0—8.5	0.1 或 1.0M NaOH 或 1% pH8—10 的 Ampholine	0.1 或 1.0 M H ₃ PO ₄ 或 1% pH5—7 的 Ampholine
7.5—10.5	1M NaOH	0.1% pH7—9 Ampholine

表 3 不同 pH 范围下凝胶薄层等电聚焦时所用电流、电压和聚焦时间

pH 范围	电 流 (mA)		电 压 (V)		聚焦时间 (小时)
	开始	终止	开始	终止	
3.5—9.5	80	25	400	1000	1.5
2.5—6.0	100	30	600	900	2.0
5.0—8.5	80	25	800	1500	1.5—2.0
7.5—10.5	50	15	500	1000	2.5

明显影响。采用高场强、缩短聚焦时间、提高载体两性电解质浓度,均可克服 pH 梯度的漂移。

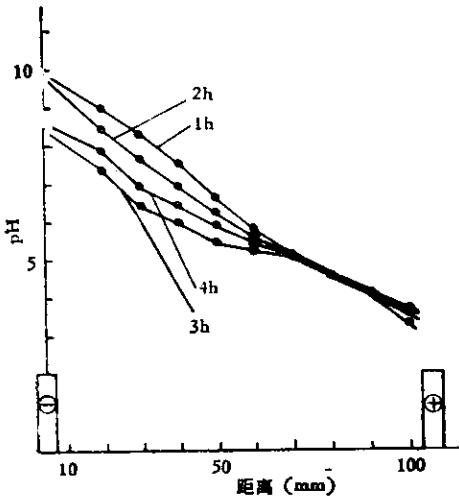


图4 pH3.5—9.5 的载体两性电解质的梯度, 在 1100 v 聚焦不同时间后的变化

六、染色、脱色和保存

聚焦后的凝胶需经染色才能确定蛋白质的区带, 常用染色剂是 Coomassie blue R250。由于载体两性电解质也能被染色, 故需先除去。方法是将凝胶板浸泡在 10—15% 三氯醋酸溶液中, 每隔 3—4 小时换一次溶液。10—12 小时后, 即可将其除去。用此法可同时固定蛋白质区带。染色在室温或 60℃ 下进行 2 小时或 15 分钟, 然后用脱色液浸泡到底色清亮为止。

蛋白质区带还可以用活性测定^[43]、免疫沉淀^[44]和放射自显影法^[43]确定, 且灵敏度更高。

染色液配制方法是: 0.75 g Coomassie blue R250 溶于 225ml 甲醇中, 搅拌 5—10 分钟, 待全部溶解后加入 465ml 蒸馏水, 混匀, 加入 22.5g 磺基水杨酸和 75g 三氯醋酸。脱色液的组成是冰醋酸:水:95%乙醇 = 1:8:3(体积比)。

为长期保存等电聚焦图谱, 可用玻璃纸包裹凝胶板, 除尽气泡, 再固定在玻璃板上, 50℃ 烘箱放置 24 小时, 即可得到透明清亮的干燥胶片, 以备长期保存。

七、等电点(pI)的测定

把待测样品和等电点已知的不同标准蛋白质在同一块薄层凝胶上电泳, 然后量出标准蛋白质区带的泳动距离, 对其等电点值作图。由标准曲线上可根据样品泳动距离求出样品的 pI 值。如果无标准蛋白质可用, 则将电泳后的凝胶板, 于三氯醋酸浸泡、固定前, 从边缘切除一条宽约 1.0cm 的空白凝胶, 以 0.5cm 的间距从正极向负极切成小段, 浸泡在 2—3ml 除去 CO₂ 的蒸馏水中 2—3 小时(室温下), 测定浸泡液的 pH 值, 将此值对分段距离作图, 得 pH-距离直线, 同样以此标准曲线可由蛋白质区带的距离求出该区带的 pH 值, 即为 pI。

八、双向电泳

等电聚焦法可与 SDS 凝胶电泳、免疫扩散电泳、聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳等结合进行双向电泳。这样可以提高电泳分离的分辨率。双向电泳的步骤如图 5 所示。

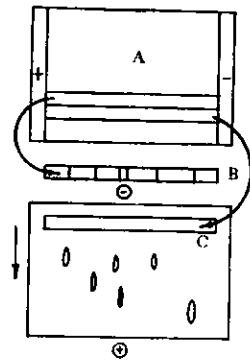


图5 双向电泳步骤
聚焦后(A), 取大小相等的两条带(B,C), 将B染色, 将C放在 SDS 聚丙烯酰胺平板凝胶上, 在垂直于等电聚焦方向进行第二次电泳, 然后染色。

可用薄层凝胶等电聚焦双向电泳测定蛋白质的 pH-迁移率曲线^[45]。具体方法是: 在凝胶中央切出一条槽, 容积为 10 × 0.15 × 0.10cm, 以此作为样品槽。先不加样品通电, 载体两性电解质在凝胶板上由正极到负极形成平滑的 pH 梯度, 停止通电。取下电极上的滤纸条, 将

样品加到槽内,在垂直于第一向的方向进行第二次电泳。蛋白质将在不同 pH 环境中带有不同电荷,环境的 pH 值离该蛋白质等电点愈远,

所带净电荷愈多,电泳迁移率也愈大,可绘出蛋白质的 pH-迁移率曲线。利用此曲线可找出蛋白质电泳的最适 pH 条件^[16],从而更有效地分

表 4 薄层凝胶等电聚焦中易出现的故障及其原因,克服的办法

故障	原因	克服办法
1. 凝胶强度不好,粘稠。	聚合不完全。由以下原因造成。 1) 凝胶溶液抽气不充分。 2) 丙烯酰胺、双丙烯酰胺、过硫酸铵等溶液放置太久。 3) 丙烯酰胺和双丙烯酰胺质量差。	延长抽气时间。 前二种溶液必须一周内使用,后者要现用现配。 换用高纯度原料。
2. 凝胶收缩。	1) 电压太高。 2) 冷却不充分。	查对所用功率,对 16×25cm 凝胶,不应超过 25W,如只用部分凝胶,功率应按比例降低。 控制水温 and 流量。 (4—10L/h)
3. 凝胶局部收缩。	1) 样品中盐浓度太高,引起局部过热。 2) 电极滤纸条与电极极性不符合。 3) 水从凝胶边缘流出。这是由于在窄 pH 范围 (pH>7) 水向阴极电渗。由此造成电极滤纸条过饱和。	用透析或凝胶过滤等方法脱盐,必要时可加入 1% 甘氨酸。 重新查对,测试电极滤纸条的 pH 值,阳极的应比阴极的低。 用滤纸吸去多余的水。
4. 电流太低或没有电流。	1) 电源或引线故障。 2) 电极板和电极滤纸条间有弱电阻。	检查电源,按牵引线。 放直电极板,检查电极偶配的电极滤纸条是否与凝胶长度相等。
5. 电流随时间延长而增大。	1) 电极滤纸条与电极偶配相反。 2) 冷却不充分。	见 3 条 2)。 检查水温和流量。
6. 冒火花。	1) 电极板使用错误,引起短路。 2) 水从凝胶边缘流出。	更换电极板。 见 3 条 2)。
7. 得到的 pH 梯度从预期的 pH 偏离(表 2)。	1) 丙烯酰胺和双丙烯酰胺纯度不够,混有丙烯酸。 2) 丙烯酰胺和双丙烯酰胺贮备液放置太久,释放出丙烯酸。 3) 聚合后的凝胶贮存太久。 4) 电泳时间太长,特别是在窄的 pH 范围 (pH>7) 内梯度易向阴极漂移。	换用更纯的原料。 更换贮备液。 及时使用。 控制在 3 小时内。
8. 蛋白质区带歪斜。	1) 样品中含盐太多。 2) 电极与电极滤纸条间有弱电阻。	见 3 1) 条。 见 4 2) 条。
9. 蛋白质区带拖尾。	1) 样品中含颗粒状物质。 2) 样品中某些成分在上样部位沉淀。 3) 部分样品残存在上样滤纸条上。	加样前离心样品。 加 1% 甘氨酸或非离子型清洁剂。 改变上样方法。
10. 蛋白质区带染色线。	1) 某些低分子量蛋白质重新溶于脱色液中。 2) 保留液中甘油含量太高。	不染色。直接在黑色背景下检查照明面的蛋白质沉淀带,或改用其它检测方法。 控制甘油浓度在 10% 以内。
11. 脱色不完全,留有蓝色背景。	固定和漂洗时载体两性电解质未除尽。	延长漂洗和脱色时间。

离提纯。还可以据此揭示蛋白质的配体状况^[17], 研究大分子间相互作用, 以及直接测定两性化合物中阴性和阳性基团的解离常数^[15]等。

应 用

在生物化学研究中, 薄层凝胶等电聚焦广泛地应用于蛋白质的纯度鉴定和等电点测定^[18]。对于分子间差异极其微小的分子多型性的分离提纯和鉴定(如 γ -球蛋白^[7]和唾液蛋白组分^[19]), 易获得满意的结果。

在蛋白质化学研究中, 此种方法可测定蛋白质分子伴随着聚合、解离和化学修饰等发生的微小电荷变化^[20]。还可以研究蛋白质分子和其它化合物间的相互作用(如伴刀豆球蛋白A和碳水化合物的结合^[21])、酶和底物或酶和辅酶复合物之间的相互作用等^[22]。

在临床检验中, 此方法被广泛地用于疾病的早期诊断。如正常人和肾炎病人尿蛋白的分析比较^[23]、与贫血症和其它疾病有关的异常血红蛋白的检验^[24]等。

这种方法还被应用于寄生虫、鱼类^[25]、霉菌^[26]和细菌^[27]等的分类学研究。

容易出现的故障及其原因,

纠正的办法

在薄层凝胶等电聚焦中, 有些易出现的故障, 现将其列于表4, 同时指出其原因和克服办法^[9], 供参考。

参 考 文 献

- [1] Awdeh, Z. L. et al.: *Nature*, **219**: 66, 1968.
- [2] Leaback, D. H. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **32**: 447, 1968.
- [3] Radola, B. H.: *Biochem. Biophys. Acta*, **194**: 335, 1969.
- [4] Rosen, A. et al.: *J. Immunol. Methods*, **28**: 1, 1979.
- [5] Harada, S.: *Clin. Chim. Acta*, **85**: 275, 1975.
- [6] Davies, H.: *Thin-Layer Gel Isoelectric Focusing*,

Isoelectric Focusing (ed. by Arbuthnott, J. P. and J. A. Beeley), Butterworths, London, 1975, pp. 97--113.

- [7] Vesterberg, O. and 長尾嘉信: 等電点電気泳動と等速電気泳動(宇井信藏編) 共立出版株式會社, 東京, 1978, p. 6.
- [8] Vesterberg, O.: *Science Tools*, **20**: 22, 1973.
- [9] Winter, A. et al.: *Application Note 250 LKB-Produkter*, Swedew, 1977.
- [10] 中国科学院微生物研究所酶结构与功能组: 生物化学与生物物理进展, **2**: 61, 1979.
- [11] Wiles, L. E. M. et al.: *Anal. Biochem.*, **49**: 109, 1972.
- [12] Faweett, L. S.: *Progress in Isoelectric Focusing and Isotachopheresis* (ed. by Righetti, P. G.). North-Holland Publ. Comp., Amsterdam, 1975, p. 25.
- [13] Righetti, P. G. and J. W. Drysdale: *Isoelectric Focusing*, Lab. Tech., *Biochem. Molecul. Biol.* (ed. by Work, T. S. and E. Work), North-Holland, Amsterdam, 1976, p. 1.
- [14] Catsimopoulos, N.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **209**: 144, 1973.
- [15] Righetti, P. G. and E. Gianazza: *Klectrophoresis 79* (ed. by Radola, B. J.). De Gruyter, Berlin, 1980, p. 73.
- [16] Rosengren, A. et al.: *Electrofocusing and Isotachopheresis* (ed. by Radola, B. J. and D. Graesslin), W. De Gruyter, Berlin, 1977, p. 165.
- [17] Krishnamoorthy, R. et al.: *FEBS Letters*, **94**: 319, 1978.
- [18] Righetti, P. G. and G. Tudor: *J. Chromatogr.*, **22**: 115, 1981.
- [19] Beeley, J. A.: *Fractionation of Human Salivary Proteins by Isoelectric Focusing*, *Isoelectric Focusing* (ed. by Arbuthnott, J. P. and J. A. Beeley), Butterworths, London, 1975, p. 240.
- [20] Hobart, M. J.: *Clues to Protein Structures from Isoelectric Focusing*, *ibid.*, p. 275.
- [21] Akedo, H. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **49**: 104, 1972.
- [22] Righetti, P. G. and J. W. Drysdale: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **209**: 163, 1973.
- [23] Vesterberg O. et al.: *J. Occup. Med.*, **18**: 473, 1976.
- [24] Krishnamoorthy, R. et al.: *Clin. Chim. Acta*, **69**: 203, 1976.
- [25] Bylund, G. et al.: *Z. Parasitenkd.*, **51**: 241, 1977.
- [26] Holmberg, K. and T. Wadstrom: *Electrofocusing and Isotachopheresis* (ed. by Radola, et al.). W. De Gruyter, Berlin, 1977, p. 443.
- [27] Wadstrom, T. et al.: *Progress in Isoelectrofocusing and Isotachopheresis* (ed. by Righetti, P. G.). North-Holland Publ. Comp., Amsterdam, 1975, p. 149.