

测定多肽分子量的 SDS 聚丙烯酰胺电泳

郭燕捷 陶 陵 姚志建

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京)

提 要

一般说来,十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺电泳(SDS-PAGE),分离分子量 10,000 以下的多肽样品效果不佳。本文介绍了一种用强电解质离子为前导离子和拖尾离子、加尿素的 SDS-PAGE 系统,可对分子量 2,000—20,000 范围内的蛋白质多肽样品进行分子量的测定。

对蛋白质分子量的测定,最常用的是十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)^[1,2],但是这种方法最适用的样品分子量范围是一、二万到二、三十万道尔顿。对于分子量较低的多肽则缺乏简便灵敏的分子量测定方法^[3]。随着生物活性多肽研究的进展,现在已有愈来愈多的结果表明不少分子量低于一万的多肽常具有重要的生物学作用,因此在多肽研究中很需要一种既稳定可靠又简便实用的分子量测定方法。

最近,Anderson 等发展了一种分别利用两种电泳迁移率快的强电解质离子为前导离子及拖尾离子的不连续电泳系统^[4]。我们在此基础上,又着重选择了在样品分子量 2,000—20,000

区域内能获得较满意分离效果电泳条件,通过二年多的实际应用,认为可做为一种多肽分子量测定的常规方法。

材 料 和 方 法

试剂

(一)分离胶缓冲液并用做下槽缓冲液的贮存液: 1M 三羟甲基氨基甲烷(Tris,浙江黄岩人民化工厂产), 0.2% 十二烷基硫酸钠(SDS,西德 Serva 公司产)的溶液,配制时用浓硫酸调 pH 至 7.8。用做下槽缓冲液时,需稀释 5 倍。

(二)上槽缓冲液: 0.074M Tris、0.1% SDS 的溶液,配制时用浓盐酸调 pH 至 7.8。

后来在制板时试加入 10% 的硅酸锌锰 K-35,层析后紫外灯($\pm 260\text{nm}$)下背底显荧光,在有饱和二糖处为清晰的暗点,从而易于观察。

(4) 纤维素板上杂质对层析结果的影响

铺好的板干燥后(在室温或 50℃ 烤 2 小时),先用展层的推进剂展层 9 小时(20℃ $\pm$ 4℃),待板上杂质(淡黄色)推向顶端时取出,彻底干透后,再点样、层析。这样,二糖的层析点可更为清晰。

此法操作简便,结果可靠,不需特殊仪器与试剂,且较滤纸层析法省时。在制板时加入 10% 硅酸锌锰 K-35 可得较清晰图谱。

参 考 文 献

- [1] Sakaru, Suzuki: *J. Biol. Chem.*, **235**, 3580—3588, 1960.
- [2] Hidehiko, Saito, et al.: *Ibid.*, **243**, 1536—1542, 1968.
- [3] Sakaru, Suzuki, et al.: *Ibid.*, **243**, 1543—1550, 1968.

【本文于 1986 年 6 月 28 日收到】

(三) 分离胶贮存液: 17.1 克丙烯酰胺, 0.9 克 N, N'-甲叉双丙烯酰胺, (以上皆为浙江黄岩人民化工厂产) 加蒸馏水至体积为 50 毫升, 过滤备用。

(四) 层积胶贮存液: 2.5 克丙烯酰胺, 0.63 克 N, N'-甲基双丙烯酰胺, 加蒸馏水至 50 毫升, 过滤备用。

(五) 2.4% 过硫酸铵溶液, 用时新鲜配制。

(六) 样品缓冲液: 1% SDS、8M 尿素、1% 巯基乙醇(上海试剂四厂产)、0.01M 磷酸的溶液, 配制时用 Tris 调 pH 至 6.8, 并滴入几滴 1% 的溴酚蓝溶液。

(七) 四甲基乙二胺 (TEMED)。

(八) 染色液: 将 0.25% 考马斯亮蓝 R-250 (瑞士 Fluka 公司产) 溶于水、甲醇、醋酸 (5:5:1) 混合的溶剂中。

(九) 脱色液: 15% 甲醇、7.5% 醋酸的水溶液。

(十) 标准蛋白溶液: 各种标准蛋白分别购自 Pharmacia 公司和 Fluka 公司。

除以上试剂, 其余均用北京化工厂产品。

制胶:

通常先在垂直板型电泳装置 (15 × 15 厘米) 中制成分离胶 (厚度为 1—1.5 毫米), 按下下列配方:

称取 9.6 克尿素, 加 3.2 毫升溶液(一), 7.1 毫升溶液(三), 加入约 2—3 毫升蒸馏水, 搅拌至尿素完全溶解, 然后加入 8 微升 TEMED, 0.33 毫升溶液(五), 最终体积用蒸馏水补充至 20 毫升。溶液立即倾入制胶模板中, 至距上沿约 3 厘米, 滴 1—2 滴水。

待分离胶聚合凝结后, 用滤纸吸出胶层顶端的水层, 并倾入按下列组成配制的层积胶溶液: 1.0 毫升溶液(一), 2.5 毫升溶液(四), 0.1 毫升溶液(五) 及 5 微升 TEMED, 加水至最终体积 5 毫升。嵌入梳形样品槽模具。

电泳

取适量样品, 溶于样品缓冲液中, 60℃ 保温 10 分钟 (或 100℃ 5 分钟), 加样 5—10 微升, 立即通电。电流 10 毫安, 待染料前沿进入分离

胶后加大电流至 30 毫安。全部电泳约需 8—10 小时。

显色

电泳完成后, 立即取出凝胶, 并在染料前沿做标记, 然后直接浸入染色液中。染 1—2 小时。换成脱色液, 在室温或 37℃ 下浸洗, 至本底清亮色带清晰。

结果与讨论

为了能在 SDS-PAGE 上对多肽进行分子量测定, 就必须制备网眼较细密的凝胶。为此一般有两个可供选择的方法, 一是在制胶时加入一些能降低聚丙烯酰胺凝胶网眼孔径的溶质分子, 如尿素; 二是增加聚合时单体的浓度和交联度。

在聚合时加入尿素的效果, 如图 1 所示。当

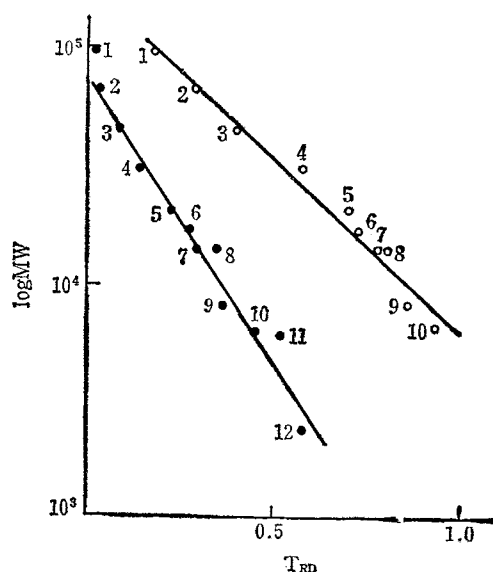


图 1 尿素对 SDS-PAGE 分离效果的影响

● 胶浓度 = $T = 15\%$ 、8M 尿素, ○ 胶浓度 = $T = 15\%$ 、无尿素,

样品: 12 种标准蛋白, 其名称及分子量如下:

1. 磷酸化酶 b MW 94,000
2. 牛血清白蛋白 MW 67,000
3. 卵清蛋白 MW 43,000
4. 碳酸酐酶 MW 31,000
5. 胰蛋白酶抑制因子(大豆) MW 20,100
6. 肌红蛋白 MW 16,949
7. 肌红蛋白片段 I 和 II MW 14,404
8. α 乳球蛋白 MW 14,400
9. 肌红蛋白片段 I MW 8,159
10. 胰蛋白酶抑制剂(肺) MW 6,500
11. 肌红蛋白片段 II MW 6,214
12. 肌红蛋白片段 III MW 2,512

$$\text{电泳迁移率} = T_{RD} = \frac{\text{样品迁移距离}}{\text{染料迁移距离}}$$

加入尿素后,有明显降低凝胶孔径的效果,各种分子量的蛋白质或多肽的电泳迁移率(T_{RD} 值)都表现同步的前移,说明 SDS 蛋白的复合分子因在较小的孔径中迁移而使 T_{RD} 值普遍降低。图 1 示含尿素时的分离结果与未加尿素的分离结果比较,虽前者分子量的关系直线斜率较大,但在低分子量区域,可以明显见到分辨情况改善。

实验表明,在加入尿素的同时,胶的浓度(T)对样品的电泳迁移率仍有明显的影响。图 2 以分子量 2,000—20,000 区域内的多肽、蛋白质为例,比较了它们在都含 8M 尿素的不同胶浓度下(交联度 C 皆为 5%)的 T_{RD} 值,表明随着胶浓度的增加 T_{RD} 值明显降低。分子量 2,512 的肌红蛋白片断的谱带在 $T = 8\%$ 的胶上,由于十分接近染料前沿,故难以测量出正确的 T_{RD} 值。

为了进一步选择对分子量 2,000—20,000 的多肽最适宜的电泳条件,希望能找到在此分子量范围内,样品谱带处于电泳凝胶中最宜进行比较的中间区域,并且在不同分子量之间有较合理的间隔和 T_{RD} ,以便与分子量对数之间能较好地符合线性规律。图 3 给出了几种不同

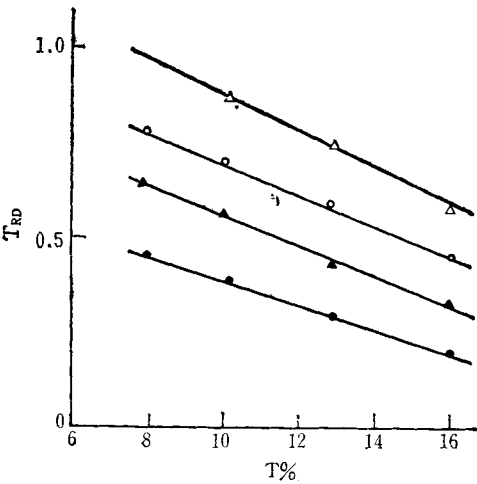


图 2 胶浓度对电泳迁移率的影响
 $\triangle$ 肌红蛋白片段 III MW 2,512 $\circ$ 胰蛋白酶抑制剂(肺) MW 6,500 $\blacktriangle$ α 乳球蛋白 MW 14,400
 $\bullet$ 胰蛋白酶抑制因子(大豆) MW 20,100

条件下的电泳图谱的照片。比较的结果可以看出,12.8% 胶浓度的电泳谱最能符合上述要求。图 4 显示了这一条件下 T_{RD} 值与分子量对数的关系。反复实验的结果表明, T_{RD} 值的重演性良好。

我们选用的蛋白标准品中,发现少数样品的分子量与电泳迁移率之间的关系与大多数样

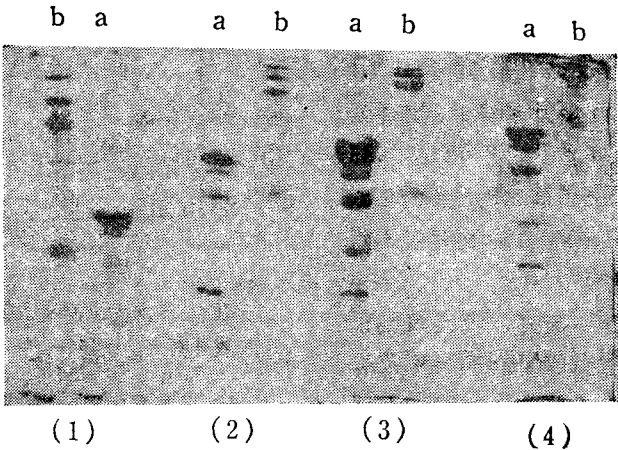


图 3 几种电泳条件电泳谱的比较
 (1) $T = 8\%$ (2) $T = 10.5\%$ (3) $T = 12.8\%$ (4) $T = 16.0\%$
 皆含 8M 尿素, $C = 5\%$

图中 a 行,含下列标准蛋白:肌红蛋白、肌红蛋白片段 I 和 II,肌红蛋白片段 I,肌红蛋白片段 II、肌红蛋白片段 III。(顺序由上至下)
 图中 b 行,含下列标准蛋白:磷酸化酶 b,牛血清白蛋白,卵清蛋白,碳酸酐酶,胰蛋白酶抑制因子(大豆), α 乳球蛋白。(顺序由上至下)

品分子所获得的标准曲线偏离较大,如分子量 6214 的肌红蛋白片段。此时可再选用一些分

子量与它相近的其它标准品来测试,如我们又选用了分子量为 6500 的胰蛋白酶抑制剂(肺)。总之,如果尽可能多地选用一些标准样品,其所获得的标准曲线也必然更接近实际。

最后应该指出的是,不合适的固定染色液有时会使小分子量多肽的谱带丢失。如我们曾选用含 30% 乙醇、7.5% 醋酸的水溶液配制染液,结果发现分子量约 2,000 的标准多肽的谱带丢失。但在同样的样品量及电泳条件下,换用由 50% 甲醇、10% 醋酸配制的固定染色液,进行固定和染色,这条谱带就能较好地显示。

参 考 文 献

[1] Shapiro A. L. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 28, 815, 1967.
 [2] Weber K. and Osborn M.: *J. Biol. Chem.*, 244, 4406, 1969.
 [3] Weber K. and Osborn M.: in *The Protein* (Third ed.), Vol. 3, 179—223, 1980.
 [4] Anderson B. L. et al.: *Anal. Biochem.*, 132, 365, 1983.

[本文于 1986 年 7 月 4 日收到]

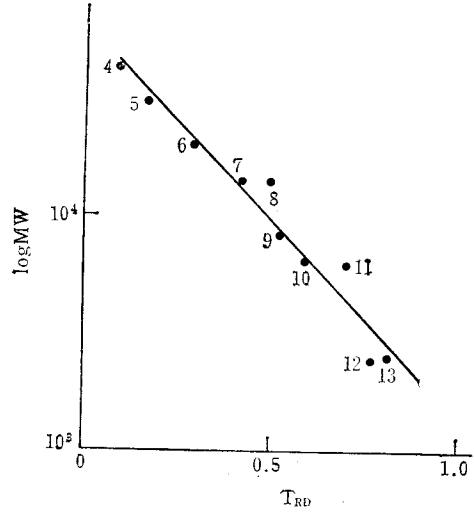


图 4 分子量对数与电泳迁移率的关系

$T = 12.8\%$ $C = 5\%$ 8M 尿素

样品: 13. 为胰岛素 A 链 MW2532 其余蛋白名称及分子量同图 1。

(上接第 72 页)

Western 印迹杂交,得到满意结果。

低脂奶粉能用于核酸杂交的机理,还不清楚。根据传统的杂交体系的原理,我们推测可能有两个作用:(1)占位效应:预杂交时奶粉中的生物大分子被吸附在硝酸纤维素膜的空白部分,从而降低了膜对探针 DNA 的非特异性吸附;(2)体积排阻效应:在杂交液中探针大分子间加入奶粉大分子时,可使探针的相对浓度增加,减少了探针 DNA 的复性,从而使特异性杂交的程度有所提高。

参 考 文 献

[1] Miller, J. A.: *Science News*, 126, 104, 1984.

[2] Johnson, D. A. et al.: *Gene Anal. Techn.*, 1, 3—8, 1984.
 [3] Reed, K. C. and Mann, D. A.: *Nucleic Acid Res.*, 13, 7207, 1985.
 [4] Brinboin, H. C. and J. Doly.: *Nucleic Acid Res.*, 7, 1513, 1979.
 [5] Shoyab, M. and A. Sen: *Method in Enzy.*, 68, 191, 1979.
 [6] Danner, D. B.: *Anal. Biochem.*, 125, 139, 1982.
 [7] Rigby, P. W. et al.: *J. M. B.*, 113, 237, 1977.
 [8] T. Manialis. et al.: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 446, 1982.
 [9] Benton, W. D. and R. W., Davis.: *Sciences*, 196, 180, 1977.
 [10] Thomas, P. S.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 77, 5201, 1980.
 [11] Southern, E. M.: *J. Mol. Biol.*, 93 503, 1975.

[本文于 1986 年 8 月 2 日收到]