

讲 座

SDS 电泳技术的实验考虑及最新进展

郭 尧 君

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100080)

提 要

水平薄层 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳是测定分子量的好方法。本文简述了方法的原理, 技术的实验考虑和最新进展。提供了制胶的方法。指出了配制 SDS 电泳样品的关键。同时介绍了新的银染色方法和不使用缓冲液和滤纸桥, 而使用缓冲液凝胶条作电极的最新进展。

关键词 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(或 SDS 电泳), 银染色, 缓冲液凝胶条

与光散射、渗透压、超离心(蔗糖密度梯度离心)及层析方法(凝胶过滤)相比, 用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质亚基并测定它们的分子量, 可以避免使用昂贵的仪器和分离介质, 所以是一个既快又经济又比较精确的方法。

SDS 电泳过去大部分用管状或垂直板状凝胶来进行。使用圆盘电泳时, 标准与未知蛋白不能加在同一管凝胶中, 因而难以精确测定分子量。使用垂直平板电泳, 虽然克服了以上缺点, 但一块胶通常只能分析 6—10 个样品, 且胶层厚(一般为 2mm), 分辨率低。干燥时, 由于凝胶收缩而导致分子量测定的误差。SDS 电泳如果在水平薄层凝胶中进行, 这样不仅一块胶可以分析几十个样品, 便于在相同条件下与标准比较可得到精确的数据, 而且胶层薄(0.5 mm), 电泳时间短, 分辨率高。再则薄层胶电泳后便于干燥保存(只要在甘油溶液中浸泡一定时间后, 在室温下自然干燥, 不需要凝胶干燥器)。水平薄层 SDS 电泳的另一个优点是便于作为双向电泳的第二向。

SDS 电泳的原理

SDS 电泳技术首先在 1967 年由 Shapiro 建立, 1969 年由 Weber 和 Osborn 进一步完善。他们发现, 在样品介质和聚丙烯酰胺凝胶系统中加入十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)后, 则蛋白质分子的电泳迁移率主要取决于它的分子量大小, 其它因素可以忽略不计。

SDS 是一种阴离子去污剂, 它能破坏蛋白质分子之间以及与其它物质分子之间的非共价键。在强还原剂例如巯基乙醇或二硫苏糖醇的存在下, 蛋白质分子内的二硫键被打开并解聚成组成它们的多肽链。解聚后的蛋白质分子与 SDS 充分结合形成带负电荷的蛋白质-SDS 复合物。复合物所带的 SDS 负电荷大大超过了蛋白质分子原有的电荷量, 这就消除了不同种类蛋白质分子之间原有的电荷差异, 蛋白质-SDS 复合物在水溶液中的形状像一个长椭圆棒。椭圆棒的短轴对不同的蛋白质亚基-SDS 复合物基本上是相同的, 约为 $18 \text{ \AA}$ 。但长轴的

长度则与蛋白质分子量的大小成正比,因此这种复合物在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶系统中的电泳迁移率不再受蛋白质原有电荷的影响,而主要取决于椭圆棒的长轴长度即蛋白质及其亚基分子量的大小。当蛋白质的分子量在 15000 到 200000 之间时,电泳迁移率与分子量的对数呈线性关系。

$$\log MW = -b \cdot m_R + K$$

式中, MW 为蛋白质的分子量, m_R 为相对迁移率, b 为斜率, K 为截距,在条件一定时, b 和 K 均为常数。由此可见, SDS 电泳不仅可以分离蛋白质,而且可以根据迁移率大小测定蛋白质亚基的分子量。这个规律对大部分蛋白质是适用的,只有少数蛋白质例外。

SDS 聚丙烯酰胺凝胶的组成与聚合

水平薄层 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳可使用均匀胶,也可使用梯度胶。前者制胶比较简便,后者制胶比较复杂,但由于聚丙烯酰胺浓度梯度在电泳分离时起到了分子筛的作用,使分辨率大大提高。适合于复杂成分的样品分析。

凝胶的性质对能否得到分子量与相对迁移率的线性关系是非常重要的。丙烯酰胺的不纯会影响凝胶的聚合以及谱带的分离,出现拖尾现象。凝胶的聚合常采用化学聚合,即用适量的过硫酸铵作为催化剂,四甲基乙二胺作为加速剂。为了保证电泳时得到最佳分离效果,应尽可能减少过硫酸铵和四甲基乙二胺的量,使聚合大约在 40min 到 1h 左右完成^[1]。聚合太慢或聚合不充分会使电泳带畸变。聚合太快,过量的过硫酸铵或四甲基乙二胺会影响样品的分离,且凝胶在干燥保存时会发生龟裂。为此,聚合时温度宜在 30—50℃。制好的凝胶要在室温下放置 12h 再使用,以使凝胶充分聚合。不能放在冰箱中,以防 SDS 在凝胶中结晶。自制的 SDS 凝胶在保湿盒中可保存四天左右。

凝胶浓度的选择取决于被分离的蛋白质的分子量。如果采用均匀胶,Weber 的实验指出,在以下浓度时,分子量的对数与电泳迁移率呈直线关系,见表 1。表 2 为 SDS 聚丙烯酰胺

均匀凝胶的配方。

表 1 凝胶浓度与分子量测定的关系

凝胶浓度	交联度	分子量
5%	2.6%	25000—200000
10%	2.6%	10000—70000
15%	2.6%	10000—50000

表 2 SDS 聚丙烯酰胺均匀胶的配方

溶液	凝胶的浓度 T 与交联度 C		
	T = 5.1%, C = 2.6%	T = 7.5%, C = 2.6%	T = 10.2%, C = 2.6%
蒸馏水	14.9 ml	7.4 ml	—ml
缓冲液贮液 ¹⁾	33.0	33.0	33.0
丙烯酰胺贮液 ²⁾	14.8	22.3	29.7
过硫酸铵贮液 ³⁾	3.2	3.2	3.2
四甲基乙二胺	0.1	0.1	0.1
总体积 ⁴⁾	66.0	66.0	66.0

- 1) 500 ml 缓冲液中含 1g SDS。缓冲液的离子强度为 0.1 或 0.2 mol/L。
- 2) 22.2g 丙烯酰胺, 0.6g 甲叉双丙烯酰胺用蒸馏水溶解搅拌配制成 100ml 溶液。过滤后贮存在棕色瓶中,在 4℃ 可保存 1—2 周。
- 3) 150 mg 过硫酸铵加 10 ml 蒸馏水,新鲜配置为宜。
- 4) 溶液总体积取决于制胶模具的大小。

使用均匀浓度的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶来分析测定分子量范围很宽的蛋白质是有困难的。特别是低分子量的点容易偏离直线。Dunker 和 Rueckert 指出, 10% 的胶可分析的最小分子量为 1 万。5% 的胶可分析最小分子量为 2 万。为了分析宽范围的分子量的样品,并提高分辨率,必须使用 SDS 聚丙烯酰胺梯度凝胶。

聚丙烯酰胺凝胶浓度梯度的选择应根据样品成分的分子量范围。如梯度 8—25 适合于分子量范围为 10000 到 300000 的样品。梯度 10—15 适合于 10000 到 250000 的样品。梯度 4—15 适合于 30000 到 300000 的样品。

1980 年 Görg 等^[2,3]介绍了用水平薄层聚丙烯酰胺小孔梯度凝胶作 SDS 电泳。由于胶层薄 (0.5mm), 冷却效果好,能使用高场强,因

此分辨率高,分离时间短,且由于胶层薄,染色、做薄层小孔梯度凝胶的配方。梯度的线性情况可在凝胶中加入一点溴酚蓝后用光密度计扫描来检查。

表3 SDS 聚丙烯酰胺小孔梯度凝胶的配制
(T: 4—22.5%, C: 3%)

贮液	凝胶尺寸及溶液体积					
	65 × 125mm		120 × 250mm		195 × 250mm	
	重溶液	轻溶液	重溶液	轻溶液	重溶液	轻溶液
丙烯酰胺贮液 (ml) ¹⁾	0.7	3.8	1.3	7.5	2.7	15.0
凝胶缓冲液 (ml) ²⁾	1.2	1.2	2.5	2.5	5.0	5.0
甘油(87%) (ml)	1.4	—	2.8	—	5.6	—
蒸馏水 (ml)	1.7	—	3.4	—	6.8	—
四甲基乙二胺 (μl)	3.0	3.0	5.0	5.0	10.0	10.0
总体积 (ml)	5.0	5.0	10.0	10.0	20.0	20.0
体积消耗 (ml) ³⁾	5.0	2.0	9.0	6.0	15.0	12.0
40% 过硫酸铵 (μl)	5	2	9	6	15	12

- 1) 29.1g 丙烯酰胺, 0.9g 甲叉双丙烯酰胺用蒸馏水溶解搅拌配制成 100ml 溶液。过滤后贮存在棕色瓶中, 在 4℃ 可保存 1—2 周。
2) 1.5mol/L Tris-HCl, pH 8.8, 0.4g SDS。
3) 体积消耗是指在灌梯度胶前先将 3ml 重溶液注入模具中。

缓冲液与缓冲液凝胶条

与等电聚焦技术相反,缓冲液是 SDS 电泳分离系统中很重要的介质。一般来说,在蛋白质稳定的 pH 范围,凡不与 SDS 发生相互作用的缓冲液都可以使用,但缓冲液的选择对蛋白带的分离和电泳的速度是非常关键的。

在 SDS 电泳系统中需要使用样品缓冲液,凝胶缓冲液以及电极缓冲液。样品缓冲液与凝胶缓冲液常采用同一种系统。系统的选择主要考虑对蛋白质样品的稳定性和溶解性的影响。样品缓冲液的离子强度一般低于凝胶缓冲液(如十分之一),但 SDS 的含量应高于凝胶缓冲液。电极缓冲液可以采用相同的缓冲系统也可以采用不同的缓冲系统。它主要影响电泳速度。如磷酸缓冲系统由于它的高导电性,只能使用低场强,所需的电泳时间是使用咪唑缓冲液的一倍。

电极缓冲液一般只能使用四五次。多次使用会影响电泳结果与电泳速度。用后的电极缓冲液由于阳、阴离子各自向负、正电极移动,所以再行使用时要混合阳、阴极缓冲液,然后再分

置使用。
长期以来一直使用电极缓冲液和搭纸桥进行 SDS 电泳,由于需要经常配置大量的缓冲液给实验带来很多麻烦。近几年 Pharmacia LKB 公司推出了一种新技术,用凝胶条来代替缓冲液和滤纸桥。缓冲液凝胶条是用不同缓冲液配制的聚丙烯酰胺凝胶或琼脂糖凝胶制成的。电泳时将凝胶条放在凝胶表面上与电极接触便可以了。使用凝胶条不仅不需要再配置缓冲液和搭纸桥,而且可以大大缩短电泳时间。使用电极缓冲液时,SDS 电泳一般需要 2—4 小时。但使用凝胶条只要 1h 左右,溴酚蓝便可以到达前沿。

样品的制备

制备 SDS 电泳样品的要求是使蛋白质变性和断开二硫键,并与 SDS 充分结合。
冻干的蛋白质可溶解在样品缓冲液中(如 0.15 mol/L tris-HCl, 1% SDS)。对含有高盐离子强度的缓冲液或硫酸铵的样品必须先对 0.01 mol/L 的相应缓冲液(含 0.1% SDS)透析。如有必要应离心去掉不溶性颗粒,以防止

电泳时的拖尾。

加有 SDS 的样品溶液在 100℃ 水浴中保温 2—5min。对温度敏感的蛋白质可预先在 37℃ 保温 3h, 冷却后在 250 μ l 样品中加 10 μ l 溴酚蓝 (0.01%) 和 10 μ l 巯基乙醇。加样前充分混合溶液。配置后多余的样品应放置在 -20℃, 可保存一周。但保存 2 天后应再加适量的巯基乙醇。

值得注意的一个改进是用二硫苏糖醇 (dithiothreitol, DTT) 代替巯基乙醇。这是一种有效的还原试剂, 并且不像巯基乙醇那样气味难闻。

对于成分简单的样品, 如用考马斯亮蓝染色, 其样品终浓度可为 0.2—2.0mg/ml。但对天然样品, 如体液, 可能有较多的带、浓度应略高。但总的来说, 样品浓度应尽可能减到最小, 这一方面可使样品带细窄以提高分辨率。另一方面, 可减轻拖尾, 使样品中的一些低浓度成分得到显示。再则过量加样会改变蛋白质的相对迁移率而影响与分子量对数的线性关系。一般来说, 作 SDS 电泳的样品, 其每种蛋白的浓度如用考马斯亮蓝染色, 应为 20—30ng/ μ l, 如用银染色, 应为 0.3—0.5ng/ μ l。

与 SDS 的结合

SDS 电泳的成功关键之一是样品制备过程中蛋白质与 SDS 的结合程度。影响它们结合的因素主要有三个: (1) 溶液中 SDS 单体的浓度。SDS 在水溶液中是以单体和分子团 (micellae) 的混合形式存在。能与蛋白质分子结合的是单体。单体的浓度与 SDS 总浓度、温度与离子强度有关。在一定温度和离子强度下, 当 SDS 总浓度增加到某一定值时, 溶液中的单体浓度不再随 SDS 总浓度的增加而升高。Reynolds 等在 1970 年时指出, 当单体浓度大于 1m mol/L 时, 大多数蛋白质与 SDS 结合的重量比为 1:1.4。如果单体浓度降到 0.5m mol/L 以下时, 二者的结合比仅为 1:0.4。这样就不能消除蛋白质分子原有的电荷差别, 也就不能进行分子量测定。为了保证蛋白质与 SDS

的充分结合, 它们的重量比应为 1:3 或 1:4。

(2) 样品缓冲液的离子强度。SDS 结合到蛋白质分子上的量仅决定于平衡时 SDS 的单体浓度, 不是 SDS 的总浓度, 而只在低离子强度的溶液中, SDS 单体才具有较高的平衡浓度。(3) 二硫键是否完全被还原。只有在蛋白质分子内的二硫键被彻底还原后, SDS 才能定量地结合到蛋白质分子上去并使之具有相同的构象。这也是为什么在样品煮沸并再冷却后, 要再加巯基乙醇或二硫苏糖醇的缘故。二硫键如不完全还原会给出蛋白质的电泳相对迁移率与分子量对数的非线性关系。

标准蛋白

在用 SDS 电泳技术测量未知蛋白的分子量时必须使用标准蛋白。所选择的标准蛋白的结构与行为应尽可能与未知蛋白相近, 分子量范围应略高于和低于未知蛋白的分子量。用与制备未知样品相同的方法制备标准蛋白样品, 然后可以在分离或混合状态下一起电泳。蛋白质在这两种状态下的相对迁移率应该是相同的。如有差别则表示混合状态下可能有蛋白质的相互作用, 或者是由于过量加样 (不管是哪种状态)。市售的标准蛋白是由一系列纯化的不同分子量的蛋白质组成的。已经确认在它们之间不会发生互相作用而且给出良好的线性关系。如 Pharmacia 公司现有四种分子量标准。其分子量范围分别为 2512—16914, 14000—94000, 53000—212000, 67000—670000。原 LKB 有一种低分子量标准是用不同聚合体的二乙焦碳酸盐 (diethylpyro carbonate) 组成的。它必须使用磷酸缓冲液系统。

电泳与电参数

在电泳时不管是使用缓冲液凝胶条还是使用滤纸电极芯, 阳、阴极必须平行放置, 而且凝胶条和电极丝之间必须接触良好。对凝胶进行预电泳是为了得到恒定的电参数和恒温的条件以及去除带电的反应物和不纯物。过长时间的预电泳有可能在凝胶中引入电解产物。所以通

常进行 20—30min 的预电泳就足够了。因为不纯物大部分是小分子，它们将以很高的速度迁移。

高湿度和低温度可能会引起凝胶上出现冷凝水。凝胶表面的冷凝水可能会引起带的畸变甚至烧胶。冷凝水的出现表明输入功率过高。在 SDS 电泳过程中，电压不应该有明显的变化。电压的急剧改变表明电泳状态的不正常，如有可能是滤纸电极芯从凝胶上脱开了。所以实验时应按时观察电参数的变化。表 4 和表 5 为均匀胶和梯度胶在 SDS 电泳时常用的电参数。

表 4 SDS 聚丙烯酰胺均匀胶电泳的电参数

缓冲液 ¹⁾	磷酸缓冲液 ²⁾ (0.1mol/L, pH 7.1)		咪唑缓冲液 ³⁾ (0.05mol/L, pH 7.0)	
	5%	10%	5%	10%
凝胶浓度	5%	10%	5%	10%
电流 (mA)	200	190	100	100
场强 (Vcm ⁻¹)	5	6	12	15
溴酚蓝前沿迁移 速率 (cmh ⁻¹)	1.5	1.2	4.0	3.2
电泳时间	4	5	1.5	2.5

- 1) 电泳时温度设置 5℃。
2) 使用磷酸缓冲液时，预电泳 30min，电流 150mA。
3) 使用咪唑缓冲液时，预电泳 30min，电流 80mA。

表 5 SDS 聚丙烯酰胺梯度胶电泳的电参数

分离距离 (cm)	电压 (V _{max})	电 流 (mA _{max})	功率 (W _{max})	时间 (min)	温度 (℃)
3	600	50	30	30	5
8	600	50	30	100	5
16	1200	50	30 [◇]	165	5

考马斯亮蓝染色和银染色

SDS 电泳常用考马斯亮蓝染色或银染色，后者比前者灵敏。

考马斯亮蓝染色方法很多，这里介绍 Pharmacia 公司最近介绍的一种最快的方法：

(1) 电泳后的凝胶立即浸泡在固定液(500ml 乙醇，100ml 冰醋酸，400ml 蒸馏水)中至少 30 min，如有必要凝胶可在固定液中过夜。

(2) 将固定后的凝胶在热的染色液 (0.29g 考马斯亮蓝溶解在 250ml 脱色液中，在使用

前边搅拌边加热至 60℃) 中浸泡 10min，然后用蒸馏水将凝胶淋洗一次。

(3) 多次变换脱色液 (250 ml 乙醇，80ml 冰醋酸，用蒸馏水加至 1000ml)，直至凝胶上背景脱净为止。为了加快脱色，可略加温度。以上各步最好用震荡器震荡染色缸。

(4) 为了防止凝胶干燥后的龟裂，脱去背景色的凝胶在保存液 (25ml 87% 甘油加 225 ml 脱色液)中浸泡 30min。然后将凝胶放在玻璃板上，再用保存液浸湿的玻璃纸包住凝胶在室温下晾干。在凝胶厚度超过 2mm 或凝胶浓度高于 10% 时，凝胶在干燥后容易发生龟裂。

1980 年 B. R. Oakley^[4] 建立了银染色法。此方法由于其灵敏度高适合于微量样品分析。但由于银染色常常有较深的背景影响弱带的显示，所以方法还在不断改进。Pharmacia LKB 公司根据 Heukeshoven 和 Dernick 1985 年^[5]以及 1986 年^[6]的方法作了进一步改进：

(1) 电泳后立即将凝胶浸泡在固定液 (同上述考马斯亮蓝染色的固定液)中至少 30min，如有必要，凝胶可在固定液中过夜。这一步可以使蛋白质沉淀并使 SDS 从凝胶中扩散出去。

(2) 将凝胶放在浸泡液 (乙醇 75ml，醋酸钠 17.00g，戊二醛 (25% W/V) 1.25ml，硫代硫酸钠 (5 H₂O) 0.50 g，用蒸馏水溶解后加至 250ml) 中 30min。

(3) 用蒸馏水洗三次，每次 5min。
(4) 将凝胶在银溶液 (硝酸银 0.25g，甲醛 50μl，用蒸馏水加至 250 ml) 中放置 20 min。

(5) 接着在显色液(碳酸钠 6.25g，甲醛 25 μl，用蒸馏水溶解至 250ml) 中放置 2—10min，视蛋白带显示深棕色为止。

(6) 为终止反应，将凝胶放在终止液 (EDTA-Na₂ · 2H₂O 3.65 g，用蒸馏水加至 250 ml) 中 10min。

(7) 用蒸馏水洗三次，每次 5—10min。

(8) 如欲保存，将凝胶在保存液 (87% 甘油 25ml，用蒸馏水加至 250ml)中放置 20—30 min。然后将凝胶放在玻璃板上，再用保存液浸湿的玻璃纸包住凝胶在室温下晾干。注意不

要将凝胶加温,因为这会使银染色漂白。

以上银染色的每一步都应在日光下进行,并且均匀地震荡。银染色用的试剂纯度以及蒸馏水的纯度都极大地影响银染色的质量。如聚合的甲醛与戊二醛不能使用。蒸馏水要进一步作无离子处理。

分子量的测定

蛋白质的相对迁移率是用各个带的迁移距离除以溴酚蓝的前沿迁移距离得到的。所有的测量点应该在染料带的中央。

$$\text{相对迁移率} = \frac{\text{蛋白迁移的距离}}{\text{溴酚蓝迁移的距离}}$$

如果凝胶厚度较厚(如大于1mm),由于染色过程中凝胶的肿胀或收缩,所以必须测量固定前和干燥后的凝胶的尺寸来消除误差。

$$\text{相对迁移率} = \frac{\text{蛋白质迁移的距离}}{\text{干燥后的凝胶长度}} \times \frac{\text{固定前的凝胶长度}}{\text{溴酚蓝迁移距离}}$$

将样品与已知亚基分子量的蛋白(分子量标准)加在同一块凝胶上,电泳后,用每个标准蛋白的分子量的对数(纵坐标)对它的相对迁移率作图就能得到一条直线。量出未知样品的迁移率便可测出样品分子量。这样的标准曲线只对同一块凝胶上的样品的分子量测定才具有可靠性。

SDS 电泳测定分子量的局限性

SDS 作为一种既经济又快速的测定分子量

的方法,已得到普遍的应用。对大部分蛋白质来说,在比较广泛的分子量范围,蛋白质的迁移率和其分子量的对数确实存在着线性关系。但是 SDS 与蛋白质分子结合后会发生构象的变化,解离成亚单位,因此对于这样一类的蛋白质,SDS 电泳所测得的只是它们的亚基或单条肽链的分子量。为了测得完整蛋白的分子量,必须采用其它方法或测定分子中肽链的数目。还有一部分蛋白质在 SDS 体系中的相对迁移率与其分子量不呈线性关系,如电荷异常或构象异常的蛋白质,组蛋白 F₁ 本身带有大量的正电荷,结合的 SDS 不足以消除原来正电荷的影响。带有较大辅基的蛋白质(如某些糖蛋白)以及一些结构蛋白(例如胶原蛋白)。和一些含二硫键较多的蛋白质(如一些受体)等,它们在 SDS 体系中,电泳的相对迁移率与分子量的对数不呈线性关系。

参 考 文 献

- 1 郭尧君. 生物物理学报, 1988; 4(4): 389
- 2 Görg A, Postel W *et al.* *J Biochem Biophys Methods*, 1980; 3: 273
- 3 Görg A, Postel W *et al.* *Electrophoresis* 1981; 8: 257
- 4 Oakley B R, Kirsck D R *et al.* *Anal Biochem*, 1980; 105: 361
- 5 Heukeshoven J, Dernick R. *Electrophoresis*, 1985; 6: 103
- 6 Heukeshoven J, Dernick R. *Electrophoresis*, 1986; 1: 22

[本文于 1990 年 1 月 18 日收到, 3 月 18 日修回]