

一种简便的薄层等电聚焦分析电泳装置

李士鹏

王锦兰

胡勿秋

(中国科学院发育生物学研究所,北京)

(中国科学院生物物理研究所,北京)

薄层等电聚焦分析电泳是近年来发展起来的一种高分辨率的蛋白质分析技术。等电聚焦是利用两性载体电解质,在外加电场的作用下,形成稳定的 pH 梯度,使得蛋白质、酶及多肽按其各自不同的等电点聚焦在相应的 pH 位置上,以便达到分离的目的。薄层等电聚焦分析电泳可以在一块薄层胶片上分析多个样品,操作方便、分辨率高,所以被人们广泛地采用。本文介绍一种简便的薄层等电聚焦分析电泳装置,它适用于我们现有的一般实验室条件,无需进口成套贵重设备,同样能得到满意的分析结果。

1. 电泳装置的配备

我们自制了简易的电极架(图1)。上架用两条长 25cm、直径 0.3 或 0.5mm 的铂金丝为平行的正负电极,它们之间的距离为 8cm 宽。下架用以支撑载有薄层胶片的玻璃板。在上架的两端各有一孔,相应地在下架的两端各有一突出的锥形小柱,以便固定上下架成为一体。

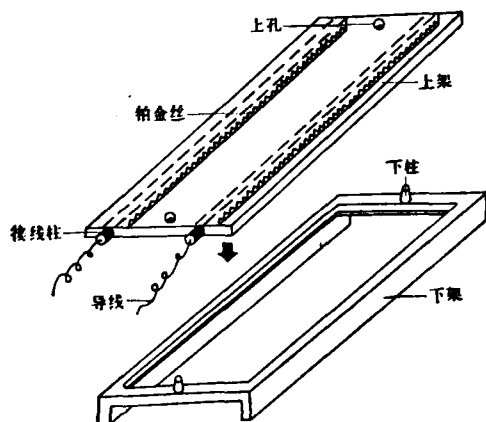


图1 自制简易的电泳架

箭头表示上架与下架装配成一体的方向

供电装置一般用国产 0—600V 的电泳仪即可,若用 0—1200V 的电泳仪更好。这是因为升高施加的电压,就可以缩短聚焦电泳的时间。

2. 薄层胶片的灌制

(1) 配制凝胶溶液 我们所用的聚丙烯酰胺凝胶,胶浓度为 7.5%,交联度为 3%。两性载体电解质系 Ampholine® 或 Pharmacilyte™、(pH 范围 3.5—10.0),在凝胶中的浓度为 2%。凝胶溶液的具体配方如下:

29.1%(W/V) 丙烯酰胺 2.5ml

0.9%(W/V) 甲叉双丙烯酰胺 2.5ml

四甲基乙二胺

40% Ampholine® 或 Pharmacilyte™ 0.5ml

87%(V/V) 甘油 1.2ml

加重蒸水至 10ml

抽气后加 1%(W/V) 过硫酸铵 0.2ml

(2) 制胶室 我们选择 1mm 的橡胶垫片切割形成胶片框,胶片框右上方留一缺口,然后用几个文具夹把胶片框夹在两层玻璃板之间,玻璃板厚 2mm。这样制得的胶室厚度小于 1mm,宽度为 9cm,长度由所分析的样品多少自行决定。为了避免凝胶溶液的渗漏,可以在胶片框上涂以少许的真空硅油或凡士林油,也可以在胶室的边缘封上一层透明胶带及一层橡皮膏。

(3) 灌胶 把配好的凝胶溶液吸入一支注射器中,通过胶片框缺口,直接灌入制好的胶室之中。注意灌胶时胶室要保持一个倾斜的角度,以便避免在所灌入的凝胶溶液中产生气泡,这样灌满凝胶溶液的胶室在室温条件下放置 2

小时,溶液即凝固成胶了。

(4) 保存 如果当天就要进行电泳,凝固的薄层胶片需在 4℃ 冰箱中放置 1 小时,然后取出使用。如果当天不使用,则可以把凝固的薄层胶片放入一个低温的湿室环境内保存。我们用普通的大号培养皿,按其大小剪好两张圆形滤纸片,滴上少许蒸馏水使之浸湿,贴在培养皿内的上下表面,即成为一个简易的湿室。这样把薄层胶片放入其中,保存在 4℃ 冰箱内,可供数周内使用。

3. 样品的预处理

样品的高盐浓度影响两性载体电解质的 pH 梯度的形成,从而导致区带的歪倾,对这样的样品需要事先透析除盐。样品的低盐浓度有时不利于蛋白质的溶解,常用 1% 甘氨酸或两性载体电解质为溶剂溶解这样的蛋白质样品。如某些蛋白质在其等电点附近沉淀析出,可以在凝胶中加入尿素,无离子或两性离子去垢剂助溶。此外,样品应预先去除颗粒,以免它们停留在加样处,造成拖尾现象。

4. 样品的施加

拉开部分胶片框,用两个小钢铲插入薄层胶片和上层玻璃板之间,固定一个小钢铲,旋转另一个小钢铲,揭去上层的玻璃板。注意要小心地操作,避免薄层胶片脱离下层的玻璃板。

样品直接加在薄层胶片上,有许多种方式。我们是用一叠 8 层的擦镜纸,剪成 $0.4 \times 0.5 \text{ cm}^2$ 的小方块,先贴在胶片上,再用微量注射器滴加一定量的样品,亦可以把这种小块直接浸入样品溶液中,再贴在胶片上,这样的加样量大约为 $10 \mu\text{l}$ 。加样量一般按所分析样品中蛋白质的类型和数目定。用考马斯亮兰染色,一般可加蛋白质 50—150 μg ,用酶活性染色,可依所显示的酶的区带的深浅程度来调整酶样品的浓度。

5. 电极液的施加

电极液采用 1M H_3PO_4 为正极液、1M NaOH 为负极液,以适应 pH3.5—10.0 范围的两性载体电解质形成相应的 pH 梯度。

我们用 3 片为一叠的 1cm 宽的 Whatman 1[#] 滤纸条来浸湿电极液,然后分正负极、贴加在

薄层胶片的两端。电极滤纸条要贴加得平行,以便使铂金电极丝正好压在它们的上面。

6. 电泳的条件

把载有加好样品和电极滤纸条的薄层胶片放在电极架的下架上,盖好上架,成为一体。在它的上面再负一个重物,使得电极丝和电极滤纸条充分接触。接通正负电极,即可开始电泳。

这种简便的薄层等电聚焦电泳在 4℃ 冰箱中进行。所给的条件是:起始电压为 60V,15 分钟后调至 120V,转而恒流,每 cm 胶片长度 0.8—1.0mA,约 1 小时左右,电压便上升到 600V—700V,再转而恒压 600V 或 700V,维持 3—3.5 小时即可结束电泳。

7. pH 梯度的测定

把 $1 \times 7 \text{ cm}^2$ 的薄层胶片切下来,从正极端到负极端切分为 14 等份,每份加 0.1ml 重蒸水,搅碎后用微量电极^[1]在一般的酸度计上测定它们的 pH 值,依此数据描绘出 pH 曲线。

8. 染色及保存

蛋白质染色步骤如下:(1)5% 磷基水杨酸 + 10% 三氯醋酸 (W/V) 固定 1 小时,(2)过脱色液 [35% 无水乙醇 + 10% 冰醋酸 (V/V)] 45 分钟,(3)在用脱色液配制的 0.2% 考马斯亮兰 R250 的染色液溶液 (W/V) 中染色 30 分钟,(4)置脱色液 (同 2) 中,37℃ 温箱内过夜。

小肽染色步骤如下:(1)10% 三氯醋酸固定过夜,(2)染色 3 小时,染色液的配制是用 50 ml 0.2% 考马斯亮兰 G250 加 50ml 2N H_2SO_4 ,不断地摇动 3 小时,过滤,取 9ml 滤液加 1ml 10 N KOH,然后加 1.36ml 100% 三氯醋酸。^[2](3)用蒸馏水漂洗背景。

酶活性染色依特异的组织化学方法进行。

染色后的胶片可放在 20% 甘油中或放在湿室的环境中,在冰箱中保存。也可以制成干片。

9. 等电点的测定

测量染色后所分离的区带距正极端的长度,按 pH 曲线找出其相应的等电点。

10. 两个实例

(1) 北京鸭乳酸脱氢酶 (LDH) 同工酶的

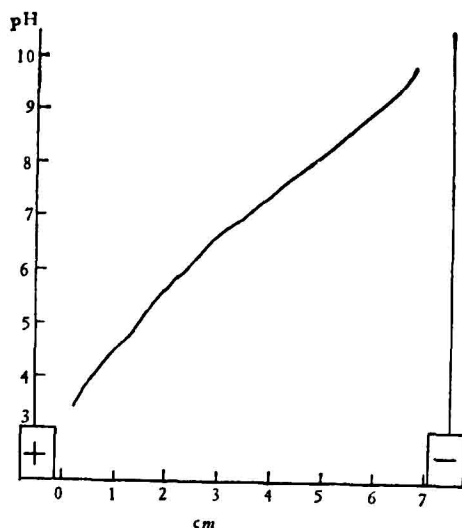
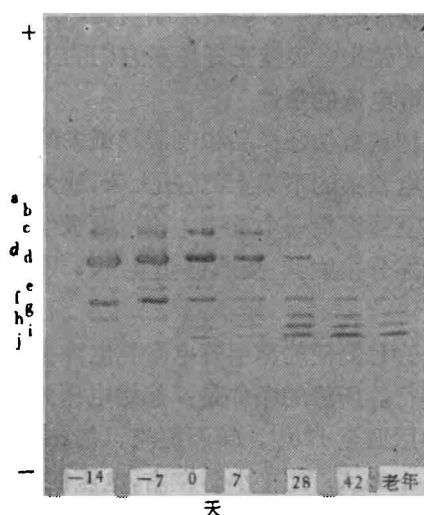


图2 北京鸭肝七个不同发育阶段 LDH 同工酶薄层等电聚焦电泳图谱及相应的 pH 曲线
初生鸭(0天)鸭黄(+7天)的肝 LDH 同工酶可被区分为十一区带

表1 北京鸭肝 LDH 同工酶各区带的等电点

LDH	1					2		3		4	5
区 带	a	b	c	d'	d	e	f	g	h	i	j
等 电 点	6.0	6.1	6.6	6.8	6.9	7.3	7.5	7.6	7.7	7.8	8.0

等电聚焦分析及等电点测定 图2表示北京鸭七个不同发育阶段的肝脏 LDH 同工酶的薄层等电聚焦分析电泳酶谱及其 pH 曲线。表1表示所分离的 LDH 同工酶十一条区带的等电点^[3]。

(2) 眼镜王蛇中 L-氨基酸氧化酶等电聚焦分析及等电点测定 图3表示眼镜王蛇中 L-氨基酸氧化酶呈现一条稍宽的条带, 仔细分辨它可能是由 2—3 条更细的区带所组成, 它们的等电点都在 pH4.1 左右^[4]。

以上介绍的这种简便的电泳装置, 北京六一仪器厂已经初步生产。

我们的工作, 曾得到雷克健同志的指导, 特此感谢。

参 考 文 献

- [1] 雷克健:《生物化学与生物物理学进展》, 38, 1981。
- [2] Righetti, P.G. et al.: *J. of Chromatography*, 157, 243, 1978。
- [3] 李士鹏: (待发表)。
- [4] 雷克健等:《动物学研究》, 增刊 2, 43, 1981。

【本文于 1983 年 4 月 6 日收到】

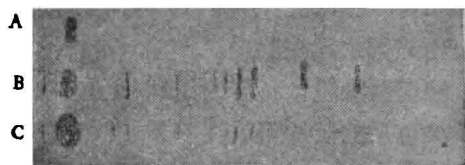
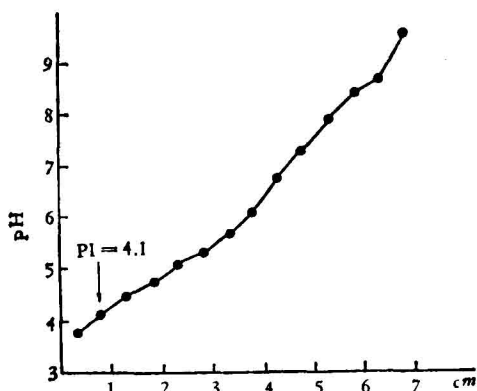


图3 眼镜王蛇中 L-氨基酸氧化酶薄层等电聚焦电泳及等电点测定

上图为经聚焦电泳后板上相应距离的 pH 值
下图为经 Coomassie 亮兰 R250 染色等电聚焦结果

A. 纯化后的 L-氨基酸氧化酶

B. 粗酶

C. 粗酶经 CM-Sephadex C25 分离后峰 1。