

聚丙烯酰胺凝胶电泳的初步经验

王兴娟 马立人

聚丙烯酰胺凝胶电泳是目前认为具有较高分辨能力的分离和分析蛋白质等物质的一种方法。为了鉴定一些生物化学制剂的纯度以及观察在疾病中血清蛋白的变化情况,我们初步建立了这一方法,并用以观察了人、狗血清的电泳情况和一种酶分离的电泳图谱。

一、原 理

1. 聚丙烯酰胺凝胶是由丙烯酰胺单体(以后简称单体)在水溶液中聚合而成的亲水性高

聚物,是一种透明而不溶于水并有韧性的凝胶。

2. 制备凝胶时需要的原料是: 丙烯酰胺, 亚甲基双丙烯酰胺(双体, 用作交联剂)。在水溶液中用催化剂引发聚合。常用的催化剂有: 二甲氨基丙腈(DMAPN); 过硫酸铵, 四甲基乙二胺; 过硫酸铵或加核黄素后用紫外光(波长253.7毫微米)引发聚合。

3. 聚合时丙烯酰胺分子通过加成反应形成长链, 双体的作用是在长链之间形成交联, 成为具有三维网状结构的凝胶(见图1)。所以在凝胶电泳中除了具有电泳的分离外还具有分子筛

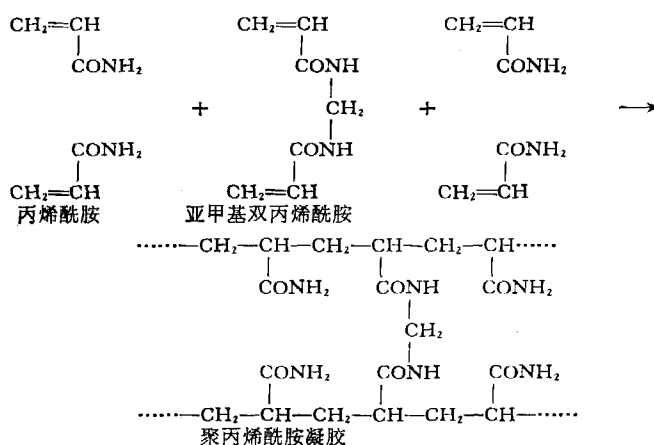


图1 聚丙烯酰胺凝胶的形成

作用,从而增高了它的分辨能力。

4. 聚合时,根据分离的需要,可以用改变单体溶液浓度或增减双体比例的办法制成孔度大小不同的凝胶。在分离血清蛋白时,我们采用的丙烯酰胺总浓度为6.5%,内含单体96%,双体4%(T=6.5, C=4%)。

5. 聚合物分子中含有很多酰胺基,所以凝胶具有良好的亲水性。能在水中溶胀但不溶解。

二、实验材料和方法

1. 设备

进行凝胶电泳的装置见图版4。

1) 直流电源 如果一次进行电泳的管数在20管以内可以用最大电流300毫安的整流器(硅或硒整流器),调压范围0—300伏。

2) 电泳装置 包括二个缓冲液槽和电泳

管。液槽可以用玻璃或塑料制成,在底部钻孔。插入电泳管,用有孔橡皮塞固定。电泳管选用孔径均匀一致的玻璃管切制。长10厘米,内径5毫米。脱色用玻璃管长10厘米,内径8毫米。底部稍拉尖,用半透膜及橡皮圈套住底部。

3) 凝胶管架 灌装凝胶管时使管保持垂直位置,用有机玻璃制成。

2. 操作方法

1) 凝胶管的制备 将电泳玻管用小橡皮塞塞住底部,然后灌入新配的凝胶溶液(方法见下文)。每管加至液体高度为7.5厘米。为了保证凝胶表面平整可用注射器通过细针头小心地加一层(高约1厘米)蒸馏水于表面上,勿使与凝胶液混合,室温放置。如果条件合适溶液于30—60分钟内聚合而成凝胶。

凝胶溶液的配制方法如下:

溶液甲: 丙烯酰胺(氯仿重结晶)25克,双体(甲醇重结晶)1克,加水配成100毫升溶液。必要时用三羟甲基氨基甲烷调pH至7.0。

溶液乙: 二甲氨基丙腈1毫升,三羟甲基氨基甲烷0.85克(也可用0.625克氨三乙醇或氨乙醇)加水至100毫升。

溶液丙: $K_3Fe(CN)_6$ 分析纯0.075克,加水至100毫升新配。用作阻聚剂以延缓凝聚时间。使操作方便,如凝聚时间已足够长可以用蒸馏水代替。

溶液丁: 过硫酸铵(二级)2.8克加水至100毫升新配。必要时用氨水调pH至7.0。

溶液甲及乙配后可在冰箱中保存数月。溶液丙及丁用时新配。

临用前将溶液甲、乙、丙、丁等量混合。

2) 准备 把已灌装凝胶的玻管通过有孔橡皮塞安装在上面液槽的底孔中,在上下两槽内分别注入缓冲液。装上后电泳管下端应浸没在下槽的缓冲液中,管下端勿留气泡。

血清电泳可以用巴比妥缓冲液pH=8.6,离子强度0.05(配法:巴比妥钠10.3克,二乙基巴比土酸1.84克,加水至1升,温热使溶。加硫柳汞0.1克防腐)。

3) 加样 在资料介绍的方法中,一般还在

凝胶之上再加一层大孔凝胶,样品聚合在最后的另一层凝胶中(图2)。在我们的试验中省略

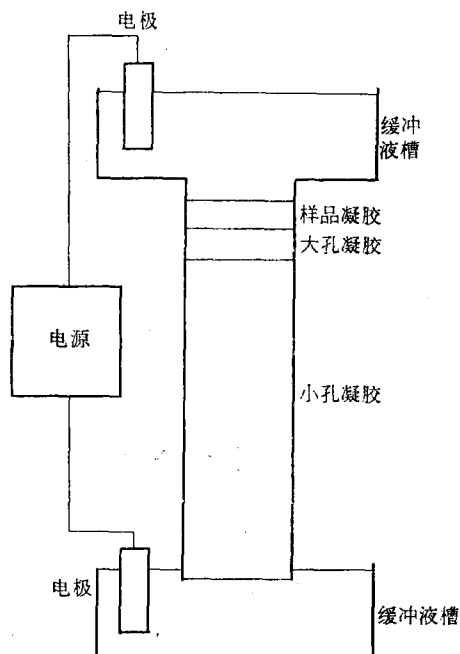


图2 凝胶电泳装置示意图

了这一步。在血清样品中加入少量蔗糖以增加密度,用血红蛋白吸管直接小心地加在凝胶表面上,加样量一般为7微升血清。如果在样品中混入少量溴酚兰指示剂就可以在电泳过程中观察前沿移动的情况。

4) 电泳 在二液槽中安放白金丝电极;正极在下,负极在上。接通电源进行电泳,电场强度10伏/厘米左右,视室温高低而定。室温较高时宜用较低的电压以免发热过度影响分离。蛋白质向正极移动。待染料前沿移动至管底近处,停止电流。电泳时间为1—2小时。

电泳完毕取下凝胶管,用细长针头沿管壁注蒸馏水,使凝胶与管壁剥开。然后用橡皮球压出凝胶条。

5) 染色及脱色 电泳后的凝胶条在1%氨基黑10B在7%醋酸溶液中固定并染色1小时以上。

染色后的凝胶条用7%醋酸洗涤数次。置于脱色玻管中,在同一电泳装置中电解脱色。此时改用7%醋酸充装在液槽中。通电后过剩

的染料泳向正极。脱色时电场强度 25 伏/厘米, 电流 10—15 毫安/管。3—4 小时脱色完毕。增高电压可以加速脱色。有色的醋酸溶液通过盛有活性炭的漏斗过滤, 即可除去染料, 重新使用。

6) 保存与记录 脱色后的凝胶可以装在盛有 7% 醋酸的有塞试管中保存数年。也可以自然干燥后保存, 在需要观察时再浸在 7% 醋酸中溶胀成原来形状。

记录可以用照相摄影。也可以用光密度计进行描记。光密度计的分辨力决定于其狭缝宽窄及光电管放大倍数。

三、实验结果

1. 电泳条件的选择

为了选择血清蛋白电泳较合适的条件, 我们分别对单体浓度、双体浓度、配制凝胶时所用不同正离子、各种电压、二甲氨基丙脒的浓度、过硫酸铵的浓度等条件进行了试验。结果如图版 5—8。

根据以上试验结果, 我们在分离血清蛋白时选用的条件是: 单体浓度 6.25—6.5%, 双体占总丙烯酰胺量的 4—5%, 正离子采用三羟甲基氨基甲烷, 二甲氨基丙脒及过硫酸铵浓度分别为 0.25% 及 0.7%。电泳电压以 7—10 伏/厘米较为合适。但电泳时间较长, 约 2—3 小时, 室温低时可以电压稍高。如果室温较高则可以在冰箱中进行电泳。

2. 人血清及其酒精分划部分的凝胶电泳

采用上述条件我们进行了正常人血清的凝胶电泳。一般可以分成 15—20 条区带。我们也根据 RaFmand 介绍的两向电泳方法比较了纸电泳和凝胶电泳各区带的相对关系。纸电泳上的 α_2 区带在凝胶电泳中可被分离成 10 条以上区带。但纸电泳中 α_1 区带的一部分则与凝胶电泳中白蛋白区带相重合。二种电泳方法所得的图谱见图版 9。

在正常人血清中后白蛋白 (PA)、转铁蛋白 (Tr) 和触珠蛋白 (HP) 均有不同的型, 见图 3,

图版 10。

一例骨髓瘤病人血清的和凝胶电泳自由电泳图谱的比较见图版 11、12。

我们也比较了酒精分划入血浆各部分的纸电泳和凝胶电泳图谱, 结果见图版 13。

从图中可见在纸上电泳检定时看来较纯的白蛋白和丙种球蛋白部分, 在凝胶电泳中可见明显的其他蛋白区带。

3. 放射病狗血清蛋白电泳的观察

放射病动物血清蛋白的改变可以在纸电泳中观察到。一般认为狗在照射后 α_3 球蛋白有增高。用凝胶电泳观察可以得到更深入的资

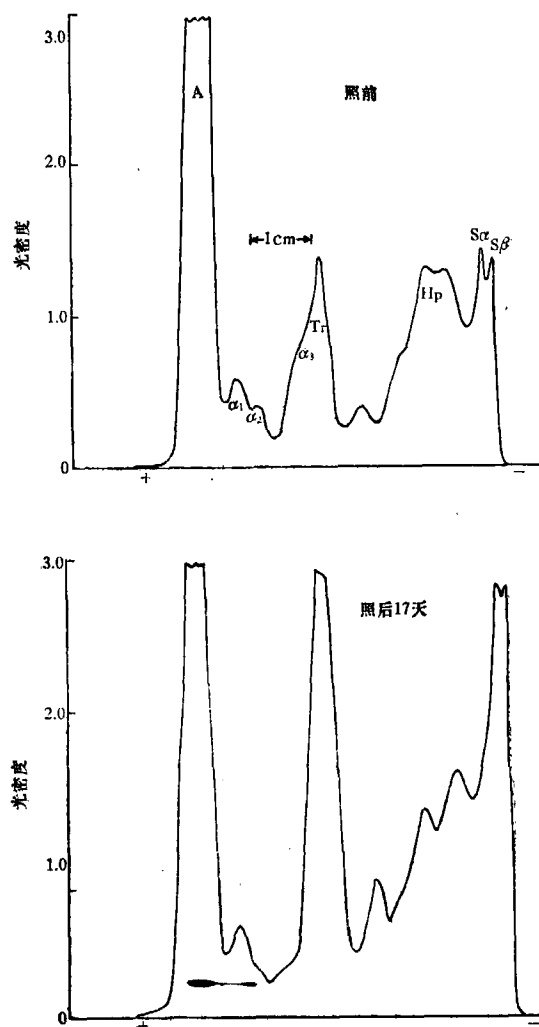


图 3 96 号狗在照前及致死量照后 17 天血清凝胶电泳描记
图描记器 JΦ3-10 型 光缝宽度 0.5mm

料。正常狗血清的凝胶电泳图谱大致与人相似。其主要区带有白蛋白, α_1 、 α_2 、 α_3 、Tr、 β_2 、HP、 $S\alpha_2$ 、 $S\beta$ 等。狗受致死量照射后第九天有明显变化,至极期时则可以观察到 α_3 、Tr、 $S\alpha$ 及 $S\beta$ 等区带有明显增高。我们用ДФ3-10型光谱仪用光密度计将电泳图谱进行了扫描,所得结果见图3,图版14。由于仪器的限制光缝最小只能达到0.5毫米,从而影响了其分辨力。但与正常血清对比可以见到其改变的情况,这远比纸电泳中所见更为明显。我们认为如果联系临床表现对变化的本质进行一些研究,将有助于了解放射病极期来到前后体内蛋白质代谢的一些情况。

4. 在分离正常人尿 DNase 时的凝胶电泳观察

用葡聚糖凝胶分离人尿中 DNase 时可以除去大部分其他蛋白质和杂质。但分离所得的制品用凝胶电泳观察还可以见到五条以上的蛋白质区带(见图版14)。将凝胶条在未染色前置于含大分子 DNA 的琼脂平板上,在37°温箱中保温2—3小时,再用5%三氯醋酸加至如此处理过的琼脂板上,可以看到乳白色本底上出现被酶水解后的透明斑点。将凝胶条用氨黑染色后显示其蛋白区带的位置。二者比较就可以确定具有酶活性的成分的相应电泳位置。我们的试验中观察到人尿 DNase 在凝胶电泳中至少被分离成二条以上有酶活性的区带。说明有同功酶的可能。应用这一方法可以较深入地观察体液中酶的情况。同时也说明可以用凝胶电泳来指示生物制剂制备过程中纯化的情况。

四、结 论

本文介绍了聚丙烯酰胺凝胶电泳的一些初步实验条件和实验结果,并与纸电泳、自由电泳等进行了对比。从结果中可以看到聚丙烯酰胺凝胶电泳的分辨力较强,重演性良好。它在临床生化分析及生物活性物质的分离、制备中和纯度鉴定中具有较广泛应用的可能性。

附 录

凝胶电泳中几种原料的纯化和制备

1. 丙烯酰胺的重结晶

市售的丙烯酰胺放置时间过长可自行发生聚合或分解。必须进行重结晶。每100克丙烯酰胺可用350—400毫升氯仿进行重结晶。氯仿有阻聚作用可以防止结晶对加热过程中发生聚合。但结晶滤出后必须使氯仿完全挥发除去方可使用。结晶宜保存于深色瓶中。

2. 亚甲基双丙烯酰胺的制备

在500毫升圆底烧瓶中置丙烯酰胺50克,多聚甲醛10.5克,二氯乙烷210毫升。加浓硫酸30滴。回流30分钟。溶液先澄清后析出结晶。放冷过夜。次日滤出结晶。在氯化钙干燥器中干燥。

将粗制品溶在200毫升甲醇中,趁热过滤,冰箱过夜。滤出。少量冷甲醇洗一次。干燥。

3. 四甲基乙二胺(TEMED)的合成

将60克70%乙二胺置600毫升烧杯中,加无水乙醇300毫升,逐滴加入80克浓硫酸,调至 $\text{pH} \pm 3$ 。反应放热,需在冰浴中冷却,并不停搅拌以避免酸液被沉淀所包裹。加毕过滤。沉淀用乙醇洗一次。抽干。100℃烘干,得硫酸乙二胺粉末110克。

称出研细的硫酸乙二胺55克,加入多聚甲醛67.5克。充分研匀。共置500毫升三口瓶中,装回流冷凝器,置油浴中加热。待瓶内温度升至90℃即有大量 CO_2 产生。控制浸入油浴的深度使反应不致过于剧烈。泡沫可用少量辛醇破坏之。回流4小时,加入75毫升80% KOH(含60克KOH),充分混匀。蒸馏之。收集沸点90℃部分。待温度上升至100℃即停止收集。

馏出物为含水四甲基乙二胺。加入KOH小粒,放置过夜。溶液分层。分出上层液重新分馏。集取沸点121—124℃部分。封装在安瓶中(最好充氮)。(下接55页)

地下部分比地上部分反应明显。

油菜移栽时,沾根处理,活棵返青快,抗寒防冻能力增强,根系发育好,促进了冬壮春发,有效分枝增加。如现龙大队周介生产队,1.25亩“军农”油菜用40ppm“702”沾根处理,大分枝增加21%,增产12.07%。

“世界上的事情是复杂的,是由各方面的因素决定的。”使用“702”处理作物的增产效果,与使用浓度、时间、方法和作物品种、水肥管理、自然条件等因素有关。要**“对于具体情况作具体的分析”**,要因时因地制宜。我们既要有为革命种田而敢想敢干的革命精神,又要有实事求是的严格的科学态度。

我们公社广大群众通过试用“702”的实践,

“702”简介

在无产阶级文化大革命的推动下,全国广大地区的贫下中农和科技人员,开展了“702”在农业上应用的群众性科学实验活动,取得了可喜的成果。

“702”是核酸的降解产物。

目前,在农村广泛使用的“702”,有的是利用工业废水培养白地霉,有的是利用啤酒酵母,直接通过碱解(或者酸解)而得到的产品。因此,不同来源以及不同降解方法的“702”产品的成分都有差别。经研究,其中对农作物起主要作用的是核苷酸类化合物。

通过几年的实验表明,在上海、江浙一带,水稻苗期使用“702”有早发增蘖增穗增产的效果,增产幅度5—10%,个别田块还要高一些。“702”用于油菜沾根及抽苔期喷施,可增加分枝和结荚数,能增产10%左右。“702”如使用适当,对于小麦、棉花等其它作物也有不同程度的增产效果。

经初步研究,水稻苗期喷施“702”可以促进根系发育,加速对营养物质(磷肥、钾肥)的吸收,并且促进光合作用,从而为水稻增产提供了有利的条件。

几年来的实际应用证明,“702”具有成本低廉、效果较稳定、无不良副作用、无环境污染问题等优点,便于广大农村使用。

(中国科学院上海生化所核酸应用组)
(浙江农科院作物育种栽培所激素组)

(上接59页)

纯四甲基乙二胺的沸点为121—122.5℃。

分析:精密称取样品0.5克左右,置锥形瓶中,加水20毫升,用甲基橙为指示剂,以1.000N HCl滴定。

$$\frac{N \times \text{毫升} \times 0.058}{\text{样品重量}} = \% \text{纯度}$$

4. 二甲氨基丙腈(DMAPN)的合成

在250毫升分馏瓶中置41克盐酸二甲胺。由分液漏斗滴加56% NaOH。分馏瓶加热至80℃,即有二甲胺气体放出。通过一盛有NaOH小粒的管干燥。最后通入在冰盐合剂中冷却的另一分馏瓶内使二甲胺冷凝。二甲胺的沸点为8—9℃。收集至不再有二甲胺生成为止。

掌握了施用规律,加深了对“702”的认识,增强了实行科学种田的信心。我们这些科学种田的知识和才能不是天上掉下来的,也不是头脑里固有的,而是在生产斗争中学来的。实践出真知。孔老二胡说“生而知之”,林彪鼓吹“天才论”,全是骗人的鬼话。为了彻底肃清这些胡言乱语的流毒和影响,我们广大贫下中农决心在口诛笔伐,普及、深入、持久地开展批林批孔斗争的同时,积极掌握科学知识,为革命进一步搞好科学种田,以实际行动把林彪所鼓吹的孔孟之道批倒批臭。**“卑贱者最聪明!高贵者最愚蠢”**。工农群众是科学实验的主人。科学知识我们完全能够掌握,科学种田我们一定能够做到。

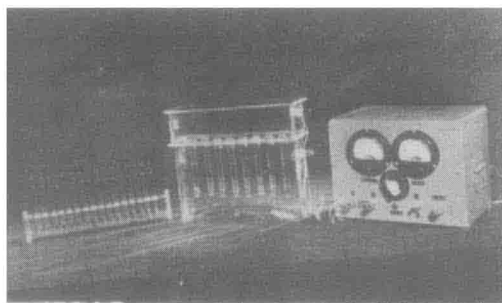
止。

称出二甲胺重量,按重量90%计算理论需要的丙烯腈量(每克二甲胺约用1克重量丙烯腈)。缓缓将丙烯腈(宜重蒸因含阻聚剂)滴加至冰盐浴中冷却的二甲胺中,使反应温度控制在5℃以下。加毕在室温放置20小时,不时振摇。用水泵减压重蒸。集取沸点恒定部分。在30毫米压力时沸点约为82℃。充氮封安瓿。

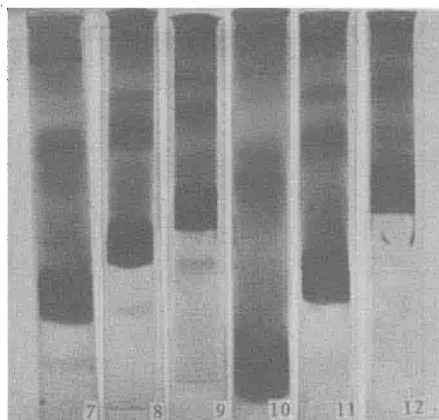
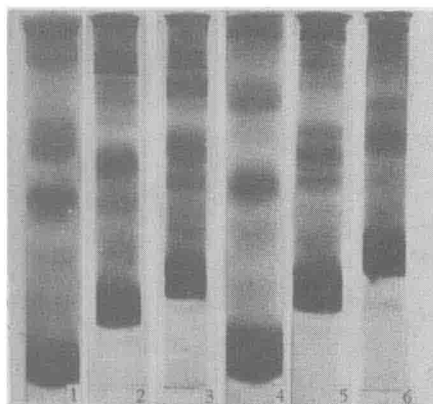
分析:精密称取二甲氨基丙腈0.4克左右,置锥形瓶中,用N HCl滴定至甲基橙呈中性。

$$\text{纯度}\% = \frac{N \times \text{毫升} \times 0.098}{\text{重量(克)}}$$

二甲胺也可以将30%二甲胺水溶液滴加至粒状氢氧化钠上来制取。

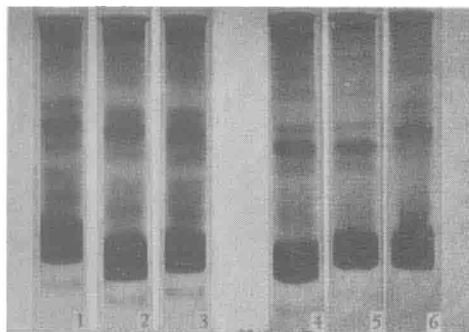


图版 4 聚丙烯酰胺凝胶电泳所需的设备
左: 凝胶管和管架; 中: 电泳脱色装置; 右: 电源

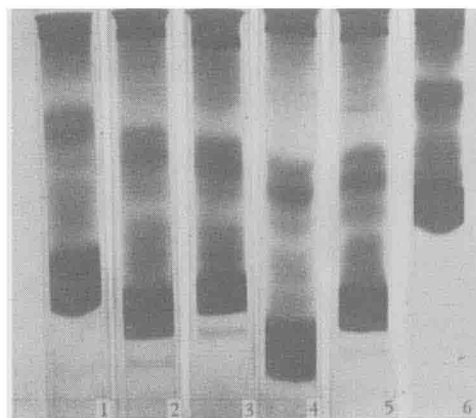


图版 5,6 不同凝胶浓度对电泳谱的影响

管 号	丙烯酰胺浓度%	双体浓度%	管 号	丙烯酰胺浓度%	双体浓度%
1	5	0.5	7	7.5	0.5
2	5	0.25	8	7.5	0.25
3	5	0.1	9	7.5	0.1
4	6.25	0.5	10	10	0.5
5	6.25	0.25	11	10	0.25
6	6.25	0.1	12	10	0.1



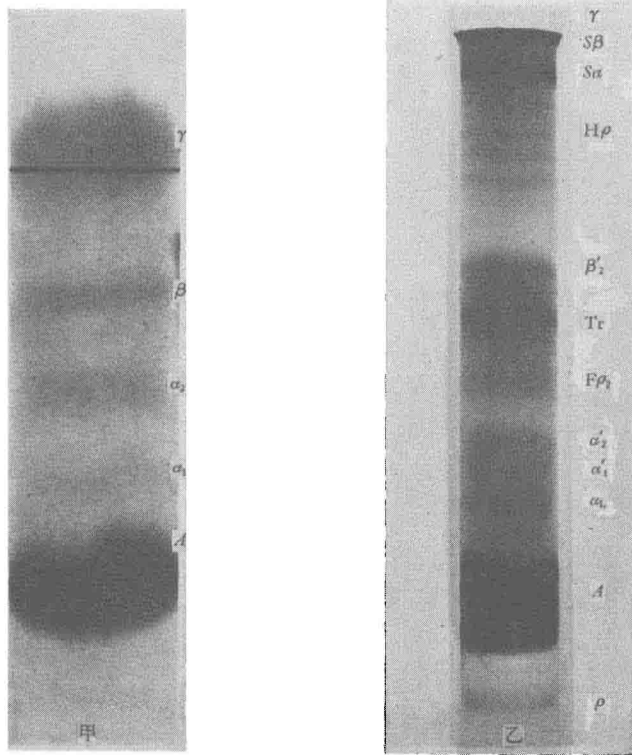
图版 7 不同正离子(管1—3)和不同电压(管4—6)
对电泳图谱的影响



图版 8 不同浓度催化剂对电泳图谱影响

管 号	二甲氨基内腈浓度%	过硫酸铵浓度%
1	0.025	0.7
2	0.25	0.7
3	1.0	0.7
4	0.25	0.25
5	0.25	0.7
6	0.25	2.5

管 号	条 件
1	氨 乙 醇
2	氨 三 乙 醇
3	三羟甲基氨基甲烷 (Tr 处多一条)
4	电泳时电场强度 $7 \sim 8\text{v/cm}$
5	电泳时电场强度 $10 \sim 15\text{v/cm}$ 白蛋白区带开始拖尾
6	电泳时电场强度 $>15\text{v/cm}$ 各区带严重拖尾

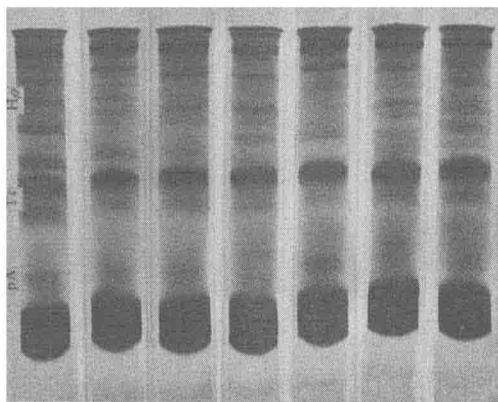


图版 9 正常人血清的纸电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳谱

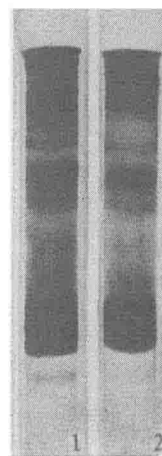
甲、纸电泳谱

乙、聚丙烯酰胺凝胶电泳谱

符号说明: A = 白蛋白, α_1 、 α_2 、 β 、 γ 表示 $\alpha_1\alpha_2\beta\gamma$ 球蛋白。 ρ = 前白蛋白, α_L = α -脂蛋白, α'_1 = α_1 球蛋白之一部, α'_2 = α_2 球蛋白之一部, $F\alpha_2$ = 快速 α_2 球蛋白, Tr = 转铁蛋白, β'_2 = β_1 球蛋白之一部, HP = 触珠蛋白 $S\alpha$ = 慢 α 巨球蛋白, $S\beta$ = β 脂蛋白

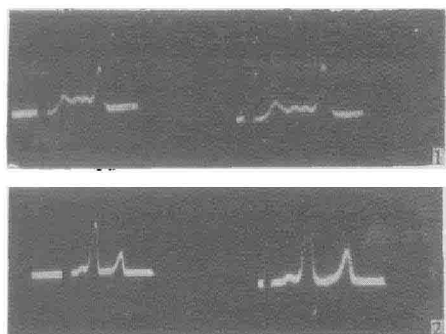


图版10 正常人血清的聚丙烯酰胺电泳谱。显示不同类型的 HP(触珠蛋白) Tr(转铁蛋白)和 PA 后白蛋白。



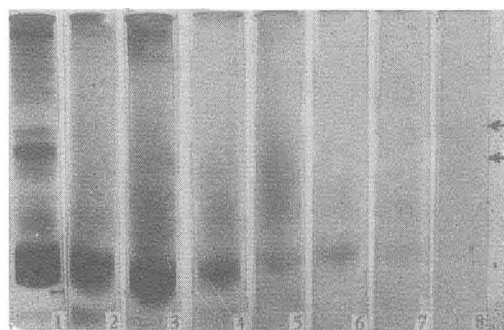
图版 11 正常人血清及多发性骨髓病病人血清的聚丙烯酰胺凝胶电泳谱

1. 正常人血清: 2. 多发性骨髓病人血清



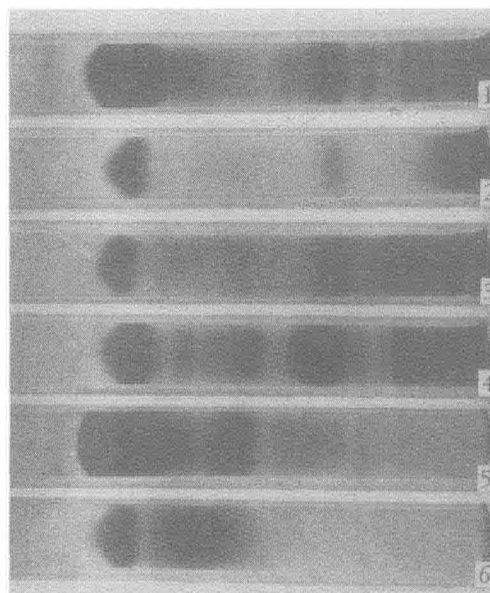
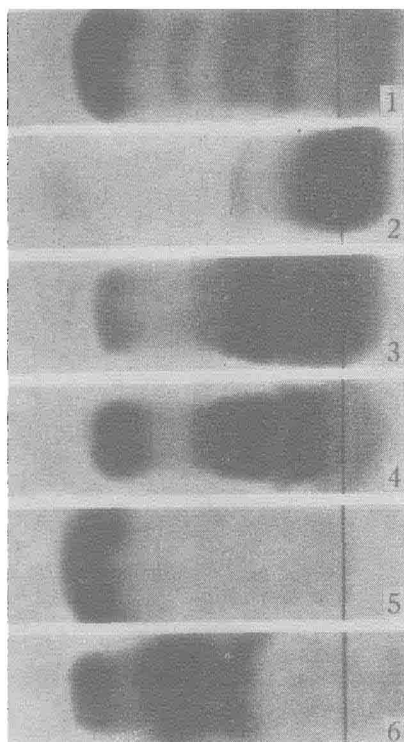
图版 12 正常人血清及多发性骨髓病人血清的自由电泳谱

1. 正常血清; 2. 多发性骨髓病人血清



图版 14 人尿 DNase 提纯过程中各部分的凝胶电泳谱
箭头表示酶活性位置

管 号		
1	正常人血清	
2	尿酸铵沉淀	
3	12~16 管(含蛋白)	第一次葡聚糖凝胶柱分离
4	17~24 管(酶)	
5	25~28 管(色素)	
6	12~16 管	第二次葡聚糖凝胶柱分离
7	17~24 管	
8	25~28 管	



图版 13 用酒精沉淀法分离人血清所得各部分二种电泳图谱的比较

甲、纸电泳谱

乙、聚丙烯酰胺凝胶电泳谱

1. 全血清 2. γ -球蛋白 3. 部分II + III 4. 部分IV 5. 白蛋白 6. 部分VI(上清液)

(样品由中国医学科学院输血及血液病研究所提供)