

参 考 文 献

- 1 Cohen S N, Chang A C, Hsu L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1972, **69** (8): 2110~2114
- 2 Cohen S N, Chang A C, Boyer H W, *et al.* Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1973, **70** (11): 3240~ 3244
- 3 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 金冬雁, 黎孟枫译. 分子克隆实验指南. 北京: 科学出版社 (Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd. Beijing: Science Press), 1992. 49~ 56
- 4 齐义鹏. 基因及其操作原理. 武汉: 武汉大学出版社 (Qi Y P. *Genes and Principle of Gene Manipulation*. Wuhan: Wuhan University Press), 1998. 300~ 308
- 5 Dagert M, Enrich S D. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene*, 1979, **6** (1): 23~ 28

A Rapid and Simple Protocol for the Transformation of Plasmid DNA Using CaCl_2 . XIAO Geng-Fu, QI Yi-Peng, LI Li, YI Wei (*Department of Virology and Molecular Biology, Wuhan University, Wuhan 430072, China*).

Abstract A rapid and simple protocol for the transformation of plasmid DNA using CaCl_2 is reported. 3 ~ 10 min incubation of cells with DNA on ice and spreading onto agar plates pre-warmed to 37 °C, resulting in more than 10^5 colonies/ μg plasmid DNA. The effect of Ca^{2+} concentration and store time at 4 °C on transformation efficiency is also discussed.

Key words plasmid, transformation, competent cells

一种改进的蛋白质超薄凝胶电泳方法*

郭泽坤 张 涌

(西北农业大学发育生物学实验室, 陕西杨凌 712100)

摘要 介绍了一种将聚丙烯酰胺凝胶固定在电泳夹板上的蛋白质电泳方法. 通过此方法蛋白质电泳可以在 0.4 mm 厚的聚丙烯酰胺凝胶上进行. 实验证明, 经此方法处理的玻板结合凝胶非常牢固, 在电泳后的所有处理步骤中都不会发生凝胶脱落现象.

关键词 电泳, 聚丙烯酰胺, 蛋白质, 超薄凝胶电泳

学科分类号 Q78

电泳技术是利用带电粒子在电场作用下以不同的速度向电荷相反方向运移的现象来对某些化学或生物化学组分进行分离分析的. 它已经成为生物化学和分子生物学实验中对蛋白质和核酸分子进行检测的最常规工具. 目前蛋白质电泳通常采用垂直平板, 分离介质为聚丙烯酰胺凝胶, 凝胶厚度一般在 0.75~ 1.5 mm. 但由于电泳过程中产生的焦耳热, 将在凝胶中央产生一个径向的温度梯度, 从而导致带电粒子产生径向的运移速度梯度, 结果使区带展宽, 降低分辨率^[1]. 凝胶越厚, 径向温度梯度越大, 电泳条带越宽, 所以凝胶厚度是影响电泳分辨率的一个主要原因. 降低凝胶厚度到 0.5 mm 以下, 不但在染色和成像过程中极易破碎, 而且还容易发生粘板. 虽然对玻板进行硅烷化处理可解决这个问题, 但又会因电泳过程中产生的电渗现象, 使凝胶从负极流出. 目前人们将薄胶结合在一个固相载

体上来解决上述所有问题, 一般都采用 FMC 公司 (Rockland, ME 04841, USA) 的 GelBond 膜, 但此膜的价格极其昂贵, 并且很难买到与国内普遍使用的 20 cm × 20 cm 玻板相配套的产品. 本文在这里介绍一种简便的方法, 直接对电泳方板表面进行化学处理, 为其涂渍一层亲水性的薄膜, 在凝胶聚合过程中, 该膜上所带双键也参加聚合, 因此能够牢固地结合聚丙烯酰胺凝胶.

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

本实验使用的电泳槽为 DYY-III21 型多用途电泳槽 (北京六一仪器厂). 凝胶成像采用 GDS-8000

* 国家自然科学基金资助项目 (39570526).

Tel: (029) 7092176; E-mail: Zhangyl@public.xa.sn.cn

收稿日期: 1998-11-13, 修回日期: 1999-03-29

凝胶成像分析系统 (UVP 公司). 电泳玻板均为普通玻璃制成. 丙烯酰胺和甲叉丙烯酰胺购自上海生物工程公司, Tris、甘氨酸、SDS 和甲基丙烯基氧丙基三甲氧基硅烷 (3-methacryloxypropyltrimethoxysilane, MAPS) 购自 Sigma 公司, 其他试剂均为国产分析纯. 标准蛋白质购自 Sigma 公司和上海丽珠东风生物技术有限公司. 上海东风低分子质量标准蛋白质: 兔磷酸化酶 B (97.4 ku), 牛血清白蛋白 (66.2 ku), 兔肌动蛋白 (43.0 ku), 牛碳酸酐酶 (31.0 ku), 胰蛋白酶抑制剂 (20.1 ku), 鸡蛋清溶菌酶 (14.4 ku); Sigma 宽范围分子质量标准蛋白质: 兔肌球蛋白 (205.0 ku), 大肠杆菌半乳糖苷酶 (116.0 ku), 兔磷酸化酶 B (97.0 ku), 兔 6-磷酸果糖激酶 (84.0 ku), 牛血清白蛋白 (66.0 ku), 牛谷氨酸脱氢酶 (55.0 ku), 鸡卵清蛋白 (45.0 ku), 兔甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (36.0 ku), 牛碳酸酐酶 (29.0 ku), 牛胰蛋白酶原 (24.0 ku), 大豆胰蛋白酶抑制剂 (20.0 ku), 牛乳清蛋白 (14.4 ku), 牛抑酶肽 (6.5 ku).

1.2 方板的亲水性处理

将方板在 10% 的 NaOH 中浸泡 1 h, 洗洁精彻底清洗, 流水冲净, 去离子水中洗 3 次, 凉干; 乙醇擦拭, 凉干; 用擦镜纸沾取改性液 (1 ml 95% 乙醇加入 10 μ l MAPS 和 10 μ l 冰醋酸), 均匀涂布玻板表面, 静置 10 min, 再用擦镜纸沾取 95% 乙醇单向擦拭玻板, 然后再沿垂直方向擦拭, 重复 3 次此擦拭过程, 凉干.

1.3 凹板的硅烷化处理

将凹板用清水、洗洁精和去离子水彻底清洗, 烘干; 乙醇擦拭, 凉干; 以滤纸沾取硅烷化溶液 (7% 二氯二甲基硅烷的氯仿溶液) 均匀涂布玻板表面, 烘干, 水清洗, 烘干; 乙醇擦拭, 凉干.

1.4 制胶和电泳

将处理好的玻板夹上 0.4 mm 厚的夹条, 装在制胶架上, 以 4% 的聚丙烯酰胺封底, 分别灌入 12% 的分离胶和 4% 的浓缩胶.

梯度凝胶的配制: 轻胶溶液为 8% 的丙烯酰胺溶液, 重胶溶液为含 15% 蔗糖的 16% 的丙烯酰胺溶液. 本实验所采用的缓冲系统完全参照 Laemmli^[2] 的方法.

1.5 染色

采用银染方法^[3].

2 结 果

2.1 超薄凝胶电泳图谱

见图 1 和图 2.

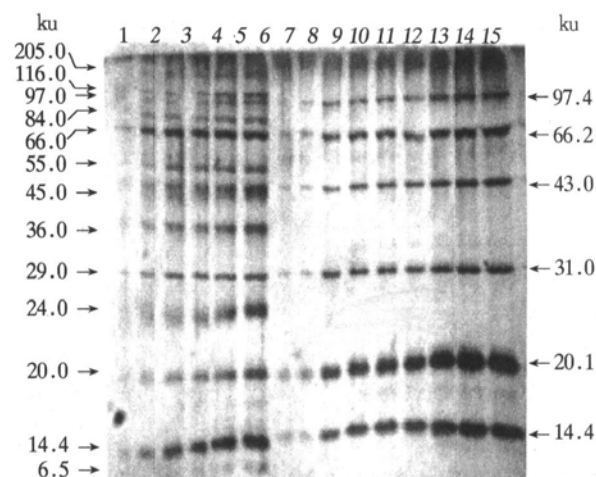


图 1 标准蛋白质在 12% 聚丙烯酰胺凝胶中的电泳结果
1~6: 为 Sigma 公司标准蛋白质, 点样量分别为 0.5、1、2、3、4、5 μ l; 7~15: 为上海东风标准蛋白质, 点样量分别为 0.5、1、2、3、4、5、6、7、8 μ l.

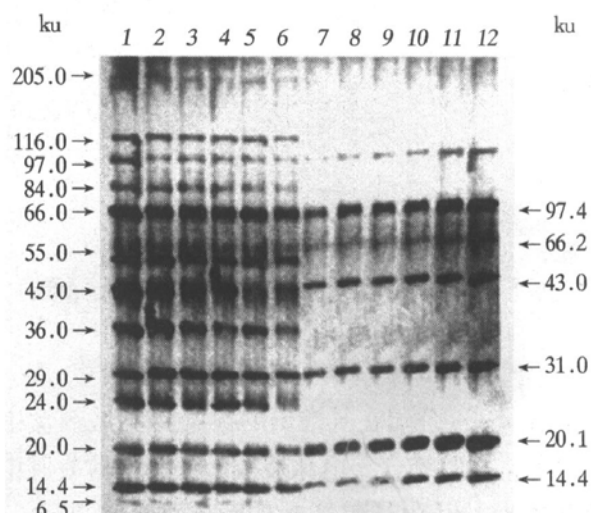


图 2 标准蛋白质在 8%~16% 的梯度凝胶中的电泳结果
1~6: 为 Sigma 公司标准蛋白质, 点样量分别为 5、4、3、2、1、0.5 μ l; 7~12: 为上海东风标准蛋白质, 点样量分别为 0.5、1、2、3、4、5 μ l.

2.2 凝胶结合强度试验

为试验凝胶结合的强度, 实验共制成 7 块胶板. 所有胶板都进行了电泳、染色和成像全过程, 以观察薄胶是否会在这些过程中脱落. 结果见表 1.

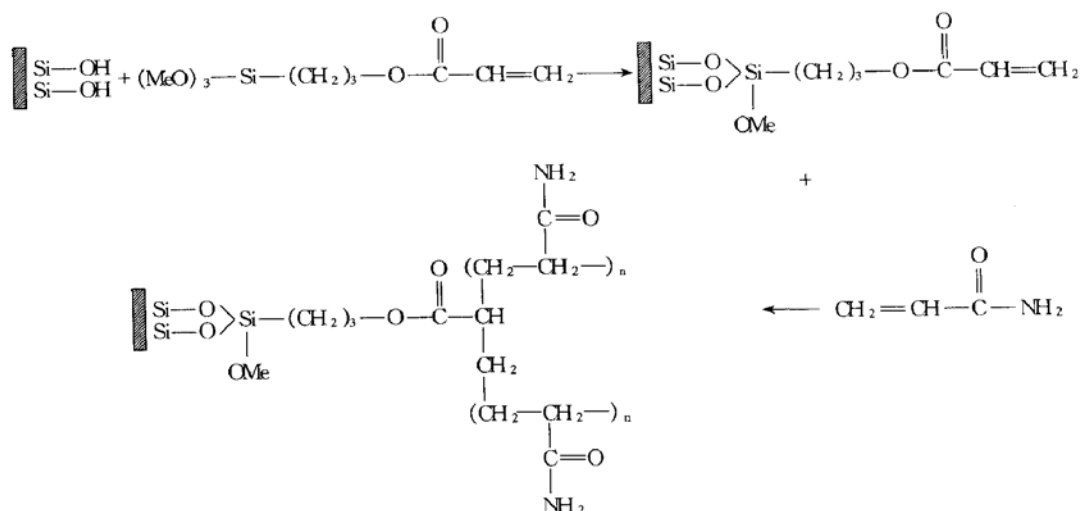
表1 凝胶结合强度的检验结果

实验	染色结果	结合程度	原因分析
1	失败	粘到凹板上	第一次灌胶漏液，倒掉之后重灌，MAPS 在第一次灌胶时污染了凹板
2	成功	牢固	
3	成功	凝胶脱落一小块	方板上有一小块污染，或未洗净
4	成功	牢固	
5	成功	牢固	
6	成功	牢固	
7	成功	牢固	

3 讨 论

玻璃与石英的主要成分一样都是 SiO_2 ，Tsuji^[4] 和任吉存等^[5] 在毛细管凝胶电泳实验中，对石英毛细管的内壁首先涂上一层 MAPS，然后再向毛细管内灌入丙烯酰胺溶液，聚合后制成聚丙烯

酰胺凝胶毛细管。MAPS 是一个双功能团试剂，一个功能团与石英或玻璃表面的硅羟基反应，进行硅烷化处理，它的烯基端双键在胶形成期间与丙烯酰胺共聚合，使凝胶键接到玻璃和石英表面，增加了胶的稳定性。其反应式如下：



Promega 公司在其推出的银染测序试剂盒中也采用了将凝胶结合于电泳玻板上进行超薄凝胶电泳的方法^[6]，但在其对玻板的化学改性处理上，采用了一种叫粘合硅胶 (bind gel) 的物质，并没有指出其化学成分，这对其方法在实验室中的应用受到了限制。本实验对上述两种方法进行了有机结合，多次试验证明，经此方法处理的玻板能够牢固地结合聚丙烯酰胺凝胶，完全可以替代 GelBond 膜。而且这样处理的玻板还可以反复利用，方法是用塑料刮刀将凝胶刮掉，在 10% NaOH 中浸泡 1 h。本实验虽然以蛋白质电泳进行了试验，但该方法完全可以应用到其他需要进行超薄凝胶电泳的实验中，如 DNA 测序，mRNA 差异显示以及 DNA 和 RNA 的变性电泳等。

注意事项：

- 玻板的清洁程度至关重要，一定要彻底清洗，一种最容易的判断办法是，当用乙醇擦拭玻板时如果出现彩晕，则表明玻板已经洗净。
- 如果在灌胶时发生漏液，需要重新分别处理两玻板。这是因为 MAPS 能够通过水溶液污染凹板，在起胶时容易撕裂凝胶。
- 最好每次实验都用 NaOH 处理方板，因为玻璃表面硅羟基多以 $-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-$ 状态存在，对硅烷化呈惰性反应，NaOH 能够使表面硅羟基更多地以 $-\text{Si}-\text{OH}$ 形式存在。
- MAPS 也可以用 γ -氨基丙基三乙氧基硅烷 (KH-550 化学纯，辽宁盖县化工厂) 来替代^[7]。

参 考 文 献

- 1 林炳承. 毛细管电泳导论. 北京: 科学出版社 (Lin B C. Introduction of Capillary Electrophoresis. Beijing: Science Press), 1996. 1~ 20
- 2 Laemmli U K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1971, **227**: 680~ 685
- 3 李德葆, 徐 平. 重组 DNA 的原理和方法. 杭州: 浙江科学技术出版社 (Li D B, Xu P. The Principles and Methods of Recombinant DNA. Hangzhou: Zhejiang Science and Technology Press), 1994. 66~ 67
- 4 Tsuji K. High performance capillary electrophoresis of proteins: Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel-filled capillary column for the determination of recombinant biotechnology derived proteins. *J Chromatography*, 1991, **550**: 823~ 830
- 5 任吉存, 黎众魁, 夏林庆, 等. 毛细管凝胶电泳分离和检测低聚核酶和脱氧核糖核酸的合成产物. *分析化学* (Ren J C, Li Z K, Xia L Q, *et al.* *Chin J Anal Chem*), 1996, **24** (3): 330~ 332
- 6 李德葆, 周学平, 徐建平, 等. 基因工程操作技术. 上海: 上海科学技术出版社 (Li D B, Zhou X P, Xu J P, *et al.* *Operation Technique of Gene Engineering*. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press), 1996. 101~ 111
- 7 郭 栩, 褚新华, 戴忠鹏, 等. 毛细管无胶筛分电泳涂渍柱的制备和性能考察. *分析化学* (Guo X, Chu X H, Dai Z P, *et al.* *Chin J Anal Chem*, 1996, **24** (7): 853~ 857

An Improved Method for Ultrathin-Gel Electrophoresis of Protein. GUO Ze-Kun, ZHANG Yong (*Laboratory of Developmental Biology, Northwestern Agricultural University, Yangling, Shaanxi 712100, China*).

Abstract An improved method for ultrathin-gel electrophoresis of protein was developed, which bind polyacrylamide gel to glass. By this method electrophoresis of protein can be run on 0.4 mm thick gel. It was demonstrated that glass treated by this method could bind gel tightly throughout all the procedures after electrophoresis.

Key words electrophoresis, polyacrylamide, protein, ultrathin-gel electrophoresis