

一个简易的垂直平板凝胶电泳装置

中国科学院上海生物化学研究所代谢调节控制组

聚丙烯酰胺凝胶电泳已经广泛地应用于分离复杂的蛋白质或核酸混合物^[1-4]。但柱型圆盘凝胶电泳技术,对一系列不同样品的比较仍存在问题。垂直的平板凝胶电泳装置^[5,6],具有下列优点:1. 平板表面大,有利于凝胶的冷却;2. 一系列样品能在相同的制板、电泳、显色条件下进行比较;3. 易于进行光密度扫描测定;4. 可应用于双向电泳。此外平板凝胶电泳后凝胶的取出、显色、保存、摄影以及放射性自显影技术都比柱型电泳操作方便,能获得满意结果。关于平板凝胶电泳的装置及电泳技术已有很多报道^[7-11],其设备简繁不一。我们在现有的实验室设备条件下,设计了一套非常简易的垂直平板凝胶电泳装置,用以分离蛋白质、核酸等。由于简单易行,一般实验室和实验人员都能自行装备,故介绍如下,作为当前对凝胶电泳分离分析技术的参考。

凝胶板框的制备

用普通平整的窗玻璃作为制备板框的材料,大小可随实验的需要决定。一般血清分离可用 $150 \times 80 \times 3$ 毫米的板(a)一块,将两根 $140 \times 10 \times 2$ 毫米的玻璃条(b),用市售的101

熊猫牌树脂胶(上海胶粘剂厂生产)粘于板的两侧,使一头与板顶端平齐,在其上放置一块 $130 \times 80 \times 3$ 毫米玻璃板(c),使(c)板的下端与玻璃条(b)的下端平齐,用胶将两板粘住,然后用二根宽约5毫米直径为4厘米的橡皮筋将板横向扣紧,最后将一块 $12 \times 80 \times 3$ 毫米玻璃条(d)放在(a)板上置于(c)板的下端,恰好比(a)板长出约2毫米,用胶将四周粘住,并用两根宽5毫米直径为5厘米的橡皮筋将板竖向扣住,这样就完成了电泳凝胶板框的制备(图1)。

制备好的凝胶板框能否应用,关键在于不漏,应在粘合后待胶干透后,注入蒸馏水,进行检验。肯定不漏才能使用。有时因侧面有极小漏点而使电泳走侧路,得不到满意的电泳图谱。一般是(d)板粘着的地方容易漏,避免的方法是(d)的上端和(b)与(c)的下端要磨平,使能紧密的接合,这样,胶只需均匀的封在上面,并注意不要有气泡就可以防止漏的现象。

仪器装置

根据 150×80 毫米的板,除了电源以外,就只需要一个高约19厘米内径为9.5厘米的圆玻璃缸,缸上架放一小的槽作为一电极槽,就可

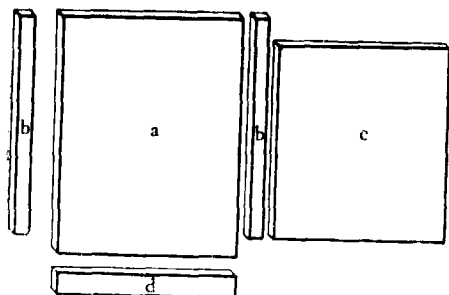


图1 电泳凝胶板框

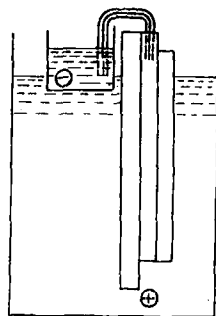


图2

以在槽的两侧同时进行二块板的电泳(图2)。

这种装置完全可以随工作和条件的不同,任意选用。圆缸可以改用烧杯或方缸,小槽可以用内径约4厘米的玻璃管制成,长8.5厘米、开口3厘米(最好为方形),或用有机玻璃、赛璐璐等材料胶制一方形槽,更方便的方法可以选用合适的方形瓶切去一半即成。

白金电极与板平行。

具 体 操 作

证明制备的板框确实不漏以后,用滤纸片将板擦干,注入凝胶达所需高度,再加少量蒸馏水,待凝,使凝胶界面整齐和水平,这一步和柱型凝胶操作相同,不同的是在向板框内加入成层胶后,要立即将一个带有所需要的孔数的橡皮制“梳子”插入板框的成层胶内,深度由所需要的成层胶的厚度和“梳子”的梳齿长度来决定。加成层胶时注意不应加满,须留至少0.5厘米高度的空隙,以便电泳时加搭滤纸桥用(图3)。

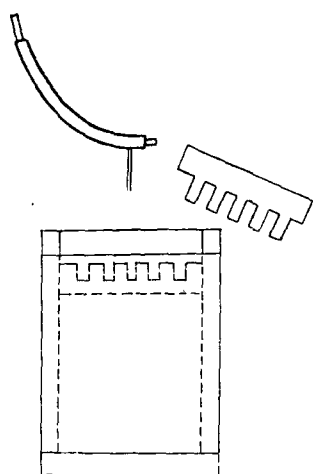


图 3

由于有几个样品在同一块凝胶板上进行电泳,因此必须严格地防止样品相互污染。要做到这点:(1)在拔出橡皮“梳子”时要特别当心,不要碰破成层胶,或将成层胶从玻璃板上剥离下来,致使加入孔内的样品互相沟通,而使实验失败。(2)加样品时使用外径小于2毫米的毛细管,插到孔的底部以后,再放出样品,绝对不能将

样品加到孔的外面,可用橡皮头控制或用如图(3)的方法加样,即用一长约30厘米的橡皮管,一端用玻璃棒塞住后,附近切一小口,将加样的毛细管插入,于橡皮管的另一端加一短的玻璃管,用嘴控制加样。(3)样品必须制备在一定浓度的甘油或蔗糖内,避免以后为电泳液所稀释。(4)根据加样的量选择适当深度的孔,但一般不要小于1.5厘米的深度。我们选用的“梳孔”深1.7厘米,宽0.5厘米。

样品制备在样品缓冲液中(最后浓度为三羟甲基氨基甲烷0.0625M,甘油10%,溴酚蓝0.001%,pH6.8)。样品加好后,去掉底部的横向玻璃条(d),放入装有电泳液的缸内,使底部浸入电泳液中,板框内凝胶上面的空隙内充满电泳液,用滤纸作桥,连通胶板和缸上的电泳液。注意滤纸和成层胶之间不能有气泡。电泳时滤纸较易发热,蒸发纸上的溶液,可多加几层滤纸(我们使用3层),并可在电泳槽的一侧,贴放几层滤纸,帮助溶液上升。在室温过高的情况下,可将电泳液进行冷却,并把板框尽量的浸入电泳液中。

放滤纸桥时应使槽内和板框上部的电泳液面水平相等,否则将引起虹吸现象,使电泳液流动。

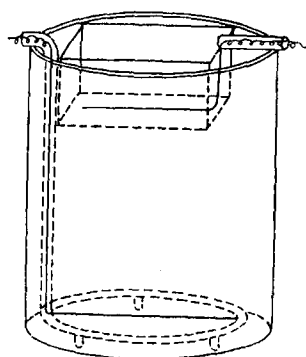


图 4

电泳时间和电流强度,随实验需要和板的大小而不同,一般分离血清蛋白的胶板成层胶高约1.2—1.5厘米,电泳胶高10.5厘米,胶宽6厘米,厚2毫米。电流调节为20毫安/板,时间需2—2.5小时。电泳结束后,用小刀撬开玻璃板,即可取出凝胶。

凝胶板的固定、染色和脱色也基本上与柱型圆盘凝胶电泳相同。

除以上这些步骤以外,我们为了保存凝胶图谱,使用了一个干燥凝胶的简便方法,即将脱色好的凝胶板,用两张稍大的透明玻璃纸复盖起来,放在玻璃板上,玻璃纸的边缘用胶纸或一般医用胶布封住固定在玻璃板上,然后从下面加热玻璃板,使凝胶中水份由下向上蒸发。我们用的热源是一个内装 100 瓦电灯泡的小木箱,将玻璃板直接放在木箱上加热。温度由调压器调变

灯泡电压来控制,温度适宜的话,一般仅需 2—3 小时即可干成一块完全透明的如同照像底片一样的凝胶片,而图谱不变。此步的关键是凝胶两面的玻璃纸要铺得均匀平整,凝胶边缘要整齐无缺损;加热时整个玻璃板受热要均匀,温度不能太高,如果太高凝胶中要产生大量气泡,干后影响底片质量,如果产生气泡,可以用玻璃棒轻轻地滚压除去。

干燥一步因凝胶的组成和浓度的不同,条件也应注意有所改变。一般聚丙烯酰胺浓度大或为琼脂糖时,干燥较易掌握,这时也可以用滤纸代替一面的玻璃纸进行干燥。干燥时还要注意不能有水滴到未干透的板上,特别象聚丙烯

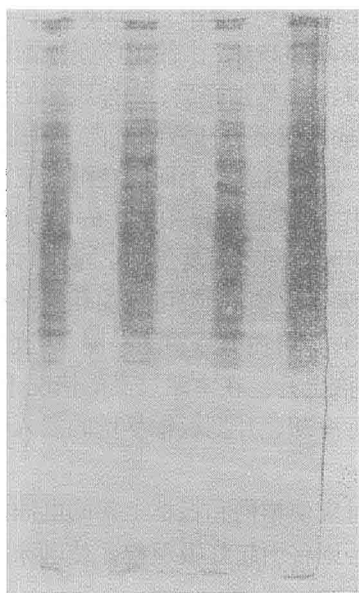


图 5 大肠杆菌 15T-溶菌物的电泳图谱

15T-菌在 M9 培养基中培养,用溶菌酶制成原生质球,多次盐冰浴冻化,离心取上清液(3000 转,30 分钟)。溶菌物和样品缓冲液(0.125M Tris-HCl, pH 6.8, 20% 甘油, 0.002% 溴酚蓝)等体积混合后加样。加样量为 150—300 γ 蛋白。

丙烯酸电泳胶浓度为 10%, 交联度 1, 制备在 0.37M Tris-HCl, pH 6.8 缓冲液中。成层胶浓度 3%, 交联度 20, 制备在 0.062M Tris-HCl, pH 6.8 缓冲液中。在 0.005M Tris-HCl, pH 8.3 缓冲液中电泳。溴酚蓝未离开成层胶前电流强度为 10 毫安/板, 溴酚蓝进入电泳胶后电流强度为 20 毫安/板。电泳时间 160 分钟。

凝胶板取出后,在 0.25% Coomassie blue R250 中染色 4 小时(500 毫升中含 Coomassie blue R250 1.25 克, 甲醇 227 毫升, 冰醋酸 48 毫升, 水 225 毫升), 7% 的醋酸水溶液中脱色。(干燥方法见正文)

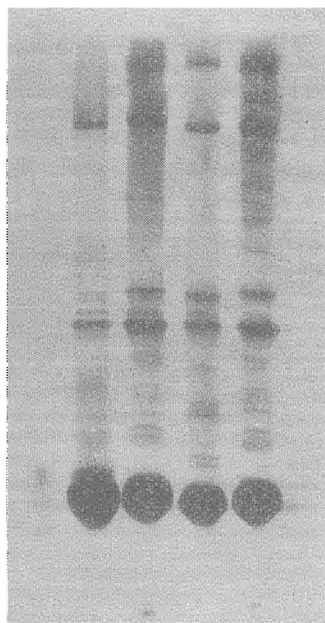


图 6 梯度凝胶电泳分离的血清图谱

凝胶浓度从下向上由 12% 到 5%, 交联度为 2.6。成层胶高 1.0 厘米, 电泳胶 10.4 厘米。

样品(从左到右)为: 纯甲胎蛋白(本所肿瘤研究组提供), 胎儿血清(上海市第六人民医院化验室提供), 肝癌病人血清, 肝癌病人混合血清(两者皆由上海市肿瘤研究所提供), 正常人血清。

在 0.005 M Tris-HCl pH 8.3 缓冲液中电泳, 每块板电流 20 毫安。电泳时间: 220 分钟。

20% 磷基水杨酸中固定 18 小时。0.25% Coomassie blue R250 染色, 7% 醋酸脱色。

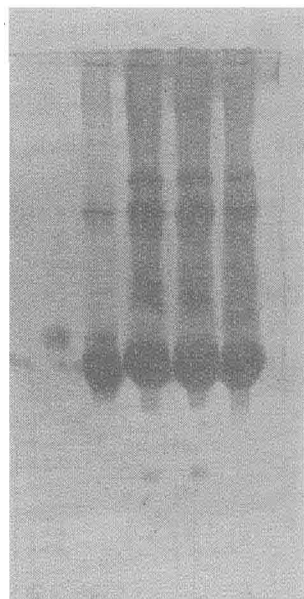


图 7 不同血清电泳图谱

样品(从左到右)为: 纯甲胎蛋白(本所肿瘤研究组提供), 胎儿血清(上海市第六人民医院化验室提供), 正常人血清, 肝癌病人血清(上海市肿瘤研究所提供), 肝癌病人血清(上海市第六人民医院化验室提供)。

电泳胶的丙烯酸浓度为 10%, 交联度 1, 电流强度为 20 毫安/板。

0.25% Coomassie blue R250 中染色。7% 醋酸中脱色。

酰胺板上,否则凝胶板将裂碎。

讨 论

垂直平板凝胶电泳,除作为分析之外,还可以作为分离用,并可结合梯度凝胶、等电电泳,分离效果更好。这里介绍的简易装置,大小可以任意装备,冷却容易,可以放在冷室进行。板很大时可以用玻璃管槽代替玻璃缸,花费极小。图 5—图 7 是我们应用这一装置分离细菌溶菌物及人血清的各种蛋白组分的电泳图谱。

这个装置的缺点是滤纸桥需要小心掌握,我们也曾经想用其它方法代替滤纸桥,但结果使装置复杂化,并需要特殊的材料,因而失去原来简易的特点。

为了保证装置不漏,我们采用了 101 熊猫牌胶粘剂粘合平板。该胶的特点是粘合干燥后对酸、碱稳定,并有绝缘与抗水性能。电泳完毕后,玻璃上的干胶很容易剥去,因而玻璃板很易清洁。剥下的干胶可再溶于甲苯内回收应用。但是象固体石蜡一类的物质,完全可以代用。

资料上常用有机玻璃制成的“梳子”,我们发现与凝胶不易分离,易于拉断胶面,而且制作麻烦,我们使用橡皮,与凝胶不亲和,效果很好,剪制也极为方便。

参 考 资 料

- [1] Davis, B. J.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404—427, 1964.
- [2] Orenstein, L.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 321—349, 1964.
- [3] 张树政: 北京微生物研究所资料。
- [4] 许根俊: 上海生化研究所资料。
- [5] Raymond, S.: *Clin. Chem.*, **8**, 455—470, 1962.
- [6] Raymond, S.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 350—365, 1964.
- [7] Ritchie, R. F., Harter, J. G. and Bayles, T. B.: *J. Lab. Clin. Med.*, **63**, 842—850, 1966.
- [8] Woodworth, R. C. and Clark, L. G.: *Anal. Biochem.*, **18**, 295—304, 1967.
- [9] Reid, M. S. and Bicleski, R. I.: *Anal. Biochem.*, **22**, 374—381, 1968.
- [10] Abadi, D. M.: *Clin. Chem.*, **15**, 35—41, 1969.
- [11] Roberts, R. M. and Jones, J. S.: *Anal. Biochem.*, **49**, 592—597, 1972.

简 讯

育种的新方法——线粒体互补法

线粒体是细胞中的呼吸器,它的效率反映细胞的代谢水平。不同品种作物的细胞,它们的代谢水平不同,这与它们各自线粒体的效率不同有关。线粒体互补这个育种的新方法,就是将两个亲本的线粒体分离出来,再混合在一起,移入一个细胞里。具有混合线粒体的细胞的代谢水平与亲本不同。如果测出混合线粒体的呼吸率比亲本的高出很多,就可预计后代可能是高产的,因为植物的呼吸作用控制着植物的长势。

采用这种方法,亲本线粒体的选择、杂交后代的选择和测定混合线粒体的呼吸率,都是在试管中进行的,这就大大缩短了培育新品种的时间。目前这一新方法在作物和动物都有成功的试验。