

超过 50%，这对于下一步层析分析是足够了。但是，不仅在转移而且在酶解时均需防止薄层过早干燥，否则会影响效果，所以这两步最好用塑料薄膜将薄层包好，压紧。

0.55 M(NH₄)₂SO₄ 的层析系统，对于分离四种主要的 pNp 是比较好的（见图 4），但是 pAp 和 pCp 之间的距离还不够大，不过还可以清楚的区分（图 2）。

用 X 光片基代替玻璃板所铺的纤维素薄层，无论其强度还是其均匀程度和分离效果，都优于用玻璃板。

参 考 文 献

[1] John Stanley 和 Stanislav Vassilenko: *Nature* 274, 87, 1978.
[2] Ramesh, C. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 6(11), 3443, 1979.
[3] Tanaka, Y. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 8(6), 1259, 1980.
[4] Payne, P. I.: *Eur. J. Biochem.*, 71, 33, 1976.
[5] 赵昂等:《植物学报》, 24(1), 54, 1982.

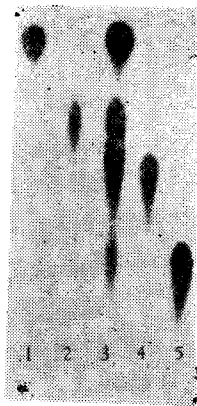


图 4 5'-³²P 标记的四种普通的 pNp 在 PEI-纤维素薄层上的层析图谱

在 0.55M(NH₄)₂SO₄ 溶剂中上行层析 4—6 小时，放射自显影 1 天，
1. 为 *pUp 2. *pCp 3. 四种 *pNp 的混合样品，4 *pAp 5. *pGp

[6] Randerath, E. et al.: *J. Chromatog.*, 31, 485, 1967.

【本文于1982年8月24日收到】

薄层（0.5 毫米）聚丙烯酰胺和琼脂糖等电聚焦技术

郭 尧 君

（中国科学院生物物理研究所六室，北京）

分析等电聚焦是蛋白质分析中高分辨的技术之一。它是利用蛋白质的等电点的不同，在一个稳定的、连续的，线性的 pH 梯度中进行蛋白质分离分析的一种新技术。近年来发展的平板等电聚焦，具有操作简便，可在相同条件下同时比较样品，分辨率高等优点，深受分析工作者欢迎。胶层的厚度直接影响到电泳的时间、分辨率、胶的保存等问题，所以目前的趋势是向着薄层和超薄层的发展方向。这里介绍薄层聚丙烯酰胺和琼脂糖凝胶的毛细管灌制、电泳、固定、染色、脱色、保存等一整套方法。其优点是：

- 1. 节省试剂 分析一个样品只需十到数十微升两性载体电解质。
- 2. 胶板大 可在一块板上同时分析几十个

- 样品，便于在相同条件下比较。
- 3. 样品用量少 少至 1—2 微升的样品即可进行分析。
- 4. 电泳时间短 1—2 小时。
- 5. 分辨率高 一般可分辨 0.01pH。在 α₁-抗胰蛋白酶的研究中，分辨率高达 0.0025pH^[1]，是迄今为止报道的最高分辨率。
- 6. 可用表面电极直接在胶板上测定 pH，快而精确地测定蛋白质的等电点。
- 7. 很容易制成永久保存的胶板。

一、薄层聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦方法^[2]

利用 LKB 公司多用电泳仪（或其它可作等

电聚焦用的电泳仪)及毛细管凝胶灌胶模具即可进行此实验。

1. 贮液的配制

(1) 29.1% (W/V) 丙烯酰胺和 0.9% (W/V) N, N'-甲叉双丙烯酰胺贮液 配制后, 溶液需过滤。置于棕色瓶中在冰箱中保存, 大约可以使用一个月。

注意: 上述两种试剂均是中枢神经系统毒物。避免吸入粉尘和接触皮肤。

(2) 1% (W/V) 过硫酸铵 新鲜配制。

(3) 0.6% (W/V) 硝酸银 在 pH2.5—4.5 范围使用。

(4) 固定液 将 34.5 克三氯醋酸和 10.4 克磺基水杨酸溶解在蒸馏水中。溶解后再加蒸馏水到 300 毫升。

(5) 脱色液 混合 500 毫升乙醇和 160 毫升冰醋酸, 加蒸馏水到 2 升。用过的脱色液可通过一个活性炭柱除去染料, 重新使用。

(6) 染色液 把 0.35 克考马斯亮蓝 R 250 加入 300 毫升脱色液中, 边搅拌边加热至 60—70℃, 配制后立即使用。

(7) 保存液 取 30 毫升甘油用脱色液稀释到 300 毫升, 搅匀。

注: 以上固定、脱色、染色、保存液是作常规考马斯亮蓝 R₂₅₀ 染色法用的。如采取其它染色方法, 则配制方法也要改变

2. 制胶和电泳

(1) 模具的准备 有两种方法^[3]。一是毛细管法, 二是盖片法。这里介绍毛细管法。

毛细管灌胶模具是由两块玻璃板 (其中一块两侧带有 0.5 毫米厚的边) 以及两个夹子组成的。玻璃板的大小可根据电泳装置而定。

在玻璃板上放少许水。用滚筒将一块塑料支持薄膜 (一种粘着很好, 在整个过程中, 使胶不会脱落的膜例如 LKB 公司的商品, —PAG moulding sheet, 即铺聚丙烯酰胺凝胶用的薄膜), 或一张玻璃纸 (预先在蒸馏水中浸泡) 压在玻璃板上。排除气泡, 使膜紧贴玻璃 (图 1)。盖上带有 0.5 毫米边的玻璃板, 两端各留有约 1 厘米空隙。在玻璃板的长侧分别用夹子夹紧。(图 2)。把组装好的模具水平地放在一个空盘子上。

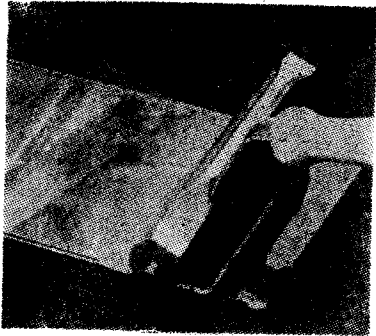


图 1

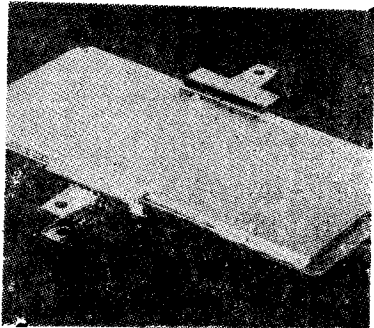


图 2

(2) 溶液的准备 按表 1 混合丙烯酰胺, N, N'-甲叉双丙烯酰胺, 两性载体电解质和蒸馏水。置于抽滤瓶中抽气 5 到 10 分钟。加过硫酸铵贮液 (如果是 pH 2.5—4.5 范围, 同时加硝酸银) 到溶液中, 慢慢混匀, 以免空气重新进入溶液。

表 1 凝胶溶液的配制 (胶浓度 5%, 交联度 3%)

pH 范围	3.5—9.5	2.5—4.5	4.0—6.5	5.0—8.0
29.1% 丙烯酰胺	3.5 毫升	3.5 毫升	3.5 毫升	3.5 毫升
0.9% N, N'-甲叉双丙烯酰胺	3.5	3.5	3.5	3.5
40% 两性载体电解质	1.5	1.5	1.5	1.5
蒸馏水	12.0	11.9	12.0	12.0

在抽滤瓶中抽气 5—10 分钟

1% 过硫酸铵	0.5	0.5	0.5	0.5
0.6% 硝酸银	—	0.1	—	—

注: (1) 此表为 LKB 2117 多用电泳仪的毛细管模具的用量, 但根据玻璃板的大小, 溶液量可按比例放大或缩小。(2) 如采用上海生化所的 20% 两性载体电解质, 则加 2 毫升左右, 水量相应减少。

(3) 灌胶 用带有橡皮管的注射器吸取抽

滤瓶中的溶液，缓慢地注入模具的玻璃板之间(图3)。

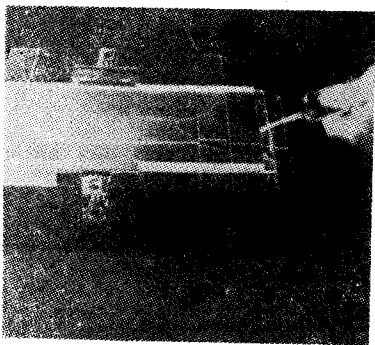


图 3

(4) 温度控制 在等电聚焦时，由于电场的高压会产生大量的热而烧坏胶板，所以等电聚焦通常在 4—10℃ 进行。在电泳前一小时左右，将电泳仪上的冷却装置与恒温水浴连接。温度视需要而定。水流量 6—10 升/分。

(5) 取胶、在室温时，灌胶后大约一小时，聚合完成，即可打开使用。将一薄刀插入模具的底层玻璃板和塑料支持薄膜之间，轻轻地撬一下，底层玻璃板和塑料支持薄膜随即分开。小心地将带着胶的上层玻璃板放在桌子上。玻璃板朝上，薄膜朝下。玻璃板伸出实验桌边约三分之一，一手拿着塑料薄膜，另一手用薄刀沿玻璃板的边缘从玻璃板上将凝胶剥离(图4)。轻轻地翻转玻璃板，小心地从玻璃板上剥离带有塑料支持膜(或玻璃纸)的整张胶板。

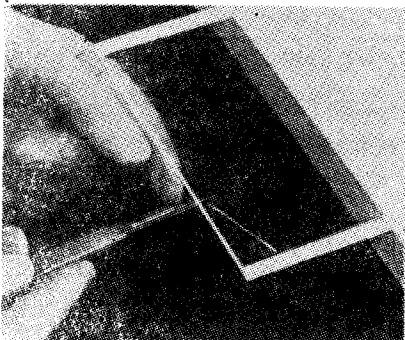


图 4

聚合后的胶板可立即使用，也可以保存在 4℃ 冰箱中备用。为了防止胶板收缩，把胶板放在具有一定湿度的盒子中。

(6) 电泳准备 在冷却板上放一张印有刻度的塑料模板。以便其后将电极条和加样滤纸放在合适的位置。在冷却板和塑料模板之间涂以液体石蜡或煤油避免气泡陷入。

将制好的聚丙烯酰胺凝胶胶板放在铺有塑料模板的冷却板上。其间涂以液体石蜡或煤油并避免气泡陷入，以保证胶板和冷却板之间的良好接触。

用合适的电极溶液润湿电极条。不同 pH 范围的阳、阴极电极溶液可按表 2 选用。

表 2 电极溶液

pH 范围	3.5—9.5	2.5—4.5	4.0—6.5	5.0—8.0
阳极	1M 磷酸	1M 磷酸	0.5M 醋酸	0.5M 醋酸
阴极	1M 氢氧化钠	0.4M HEPES	0.5M 氢氧化钠	0.5M 氢氧化钠

根据模板上标记的位置分别放置阳、阴极电极条(图5)。按模板上的格子 and 预先设计的实验计划将加样滤纸放在凝胶上。根据样品性质的不同，样品可加在靠近阳极、阴极或中间的

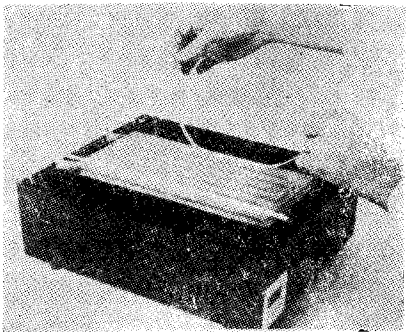


图 5

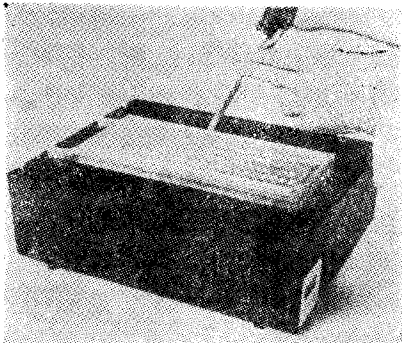


图 6

任何位置。合适的样品浓度为 0.5—3 毫克/毫升。加样量可为几微升到 100 微升左右,但以 5—30 微升为宜。微量样品可直接加在凝胶上(图 6)。

(7) 等电聚焦 将阳极和阴极分别连接于电源的正、负极上。如使用恒功率电源,等电聚焦电泳时的电参数按表 3。注意确保电极和电极条很好的接触。电泳半小时后,去掉加样滤纸。如是容易变性或失活的样品,先进行 15—30 分钟的预电泳,再加样。

表 3 电泳条件

放冷却温度 +10℃ 或视室温情况而定

pH 范围	3.5—9.5	2.5—4.5	4.0—6.5	5.0—8.0
上限电压 (V)	2000	1500	2000	2000
上限电流 (mA)	50	25	25	50
功率(W)	25	15	25	25
时间(分)	60	120	120	120

注: 此表为使用 LKB 恒功率电源时所用的参数,且适用于 126 × 250mm 胶板。如果胶板短,电参数应作相应的减小。

(8) 测 pH、固定、染色、脱色、保存 聚焦后,用表面电极测 pH,可按照印有刻度的塑料模板上的格子,从阴极到阳极每隔一厘米测一值,(图 7)画成 pH 梯度。测 pH 后,为了防止带的扩散,再重新聚焦 5—10 分钟。

电泳结束后,取出电极条,立即将凝胶放入固定液中固定 30 分钟。弃去固定液,用脱色液洗凝胶 5 分钟,弃去脱色液,将凝胶放入 60℃ 的染色液中 10 分钟;弃去染色液,用脱色液洗胶,用棉花轻轻地擦凝胶的表面。多次更换脱色液,直到胶的背景完全脱去蓝色为止(根据样

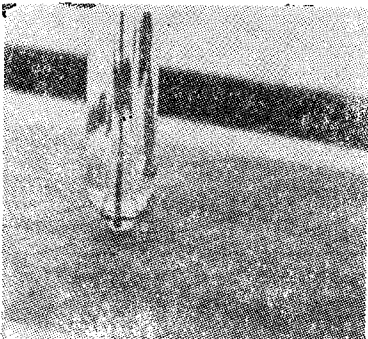


图 7

品性质,有时需要采取不同的固定,染色和脱色方法)。

脱色后的凝胶放在保存溶液中半小时,然后取出凉于玻璃板上。通常放过夜后用一块硬的塑料透明膜作保护膜,边覆盖边用滚筒压紧。这样一块透明的带染色蛋白带的薄层凝胶板就可以永久保存了(图 8)。

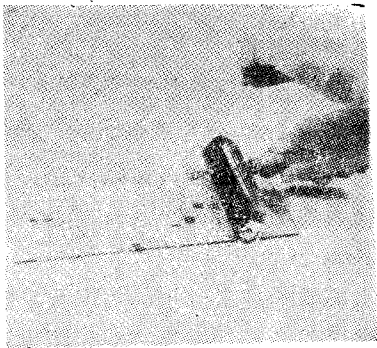


图 8

(9) 光密度扫描 要对聚焦好的带进行定量比较,可用光密度计扫描。但要对不同胶板进行比较。其加样量、电泳条件,固定,染色和脱色程序均需相同。

考虑到等电聚焦的谱带胶板的特点(聚焦带细,如果样品成份复杂,带可能靠得很紧等。)最好采用激光光源的光密度计扫描。最为合适的是分辨率很高的 LKB 公司 2202 型激光光密度计。

二、薄层琼脂糖等电聚焦方法^[4]:

琼脂糖等电聚焦具有无毒性,电泳时间短、聚合、染色、脱色、保存容易的优点。可以分离分析分子量达百万的化合物,(丙烯酰胺只能分离分析分子量小于 20—30 万的化合物)在大分子量分子的分离分析中具有独特的地位:

1. 固定、染色、脱色液的配制

(1) 固定液 把 100 克三氯醋酸和 10 克磺基水杨酸溶在 500 毫升蒸馏水中,然后加蒸馏水到 1000 毫升。

(2) 染色液 称 1.5 克考玛斯亮蓝 R₂₅₀ 于 300 毫升脱色液中。在室温下搅拌一小时,过滤,溶液可使用多次,如有颗粒出现,重新过滤

后可再使用。

(3) 脱色液 350 毫升 95% 乙醇, 100 毫升冰醋酸, 加蒸馏水到 1000 毫升。使用后的脱色液通过一个活性炭柱除去染料后, 还可使用。

以上固定、脱色、染色液是作常规考马斯亮蓝 R₂₅₀ 染色法用。如用别的染色方法, 则按别的方法配制。

2. 制胶和电泳

(1) 琼脂糖胶溶液的准备 将 0.18 克琼脂糖加在盛有 16.6 毫升蒸馏水的三角烧瓶中。将三角烧瓶放在水浴中, 边搅拌边加热煮沸。当琼脂糖溶解后大约 10 分钟, 停止加热, 将水浴温度降到 75℃。

(2) 模具的准备 用与丙烯酰胺凝胶板相同的方法准备模具, 但需使用与琼脂糖粘着好的亲水的薄膜 (LKB 公司的商品名为 GelBond 即与琼脂糖凝胶粘合很好的塑料膜)。组装好的模具在 70℃ 烘箱中保温 15 分钟。

加 1.4 毫升所要的 pH 范围的 40% 两性载体电解质到 75℃ 的琼脂糖溶液中, 混匀。(如用上海生化所产的 20% 两性载体电解质, 则加 2.8 毫升, 水减为 15.2 毫升)。从烘箱中取出模具。用一个带橡皮管的注射器吸取溶液并灌注到两块玻璃板之间。灌注时, 将模具的一端抬高成 30° 角, 以便溶液流入(图 9)。灌注后立即将模具放在水平位置。

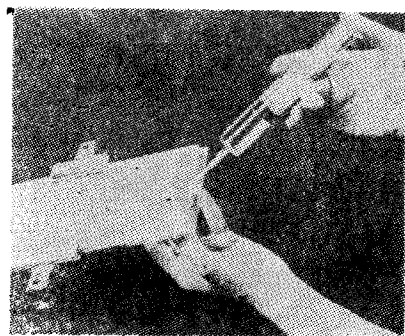


图 9

(3) 打开模具 灌胶后, 在室温放置 15 分钟。用解剖刀切去两头多余的琼脂糖胶, 然后一手紧紧抓住上面的玻璃板和薄膜, 另一手拿

住底层的玻璃板, 分开 (图 10)。

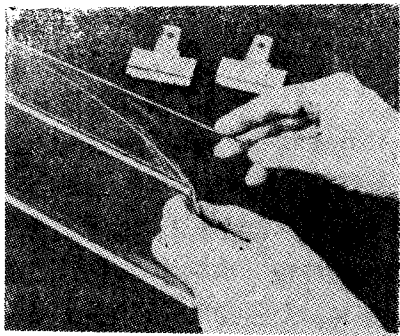


图 10

琼脂糖胶板在冰箱中至少放 1 小时, 使其充分凝固。使用前用滤纸轻轻地吸去胶表面的水。

(4) 等电聚焦 用与丙烯酰胺同样的方法控制电泳温度和作等电聚焦的准备。电极液和电参数参照表 4 和表 5。

表 4 电极溶液

pH 范围	3.5—9.5	2.5—4.5	4.0—6.5	5.0—8.0
阳极	0.5M 醋酸	0.5M 醋酸	0.5M 醋酸	0.04M L-谷氨酸
阴极	0.5M 氢氧化钠	0.4M HEPPES	0.5M 氢氧化钠	0.5M 氢氧化钠

(5) 测 pH、固定、染色、脱色、保存 聚焦后, 同前述测 pH。电泳结束后, 弃去电极条, 立即将胶放入固定液中, 固定 10 分钟。弃去固定液, 用 95% 乙醇洗 10 分钟。用热吹风将胶吹干。

表 5 电泳条件

放冷却温度 +10℃ 或视情况而定

pH 范围	电 压 E (V) 放置到	电 流 I (mA) 放置到	功 率 P (W) 放置到	用增加使 E (V) 到下值 以下	时间
3.5—9.5	最大	最大	0	500	30
2.5—4.5	最大	最大	0	250	60
4.0—6.5	最大	最大	0	500	60
5.0—8.0	最大	最大	0	500	60

注: 用这种方法在恒功率电源上设置电参数, 上表的值可适用于任何大小的胶板。

将胶放在染色液中染色 5 分钟。染色后的

胶用脱色液脱色。用棉花轻轻地擦凝胶的表面,并更换脱色液,直到胶的背景完全脱去蓝色为止。用热风吹干,就可永久保存。光密度扫描,同前述。

参 考 文 献

[1] Allen, R. C. et al.: *Am. J. Clin. Pathol.*, **62**, 732, 1974.

[2] *Instruction Sheet 1818-P for 0.5 mm Thin-Layer Polyacrylamide Gels for Electrofocusing*, LKB-Produkter, Bromma, 1981.

[3] Radola, R. J. *Electrophoresis*, Vol. 1, April 43—57, 1980.

[4] *Instruction Sheet 1818-A for 0.5 mm Thin-Layer Agarose Gels for Electrofocusing*, LKB-Produkter, Bromma, 1981.

[本文于1982年8月23日收到]

蔗糖密度梯度区带电泳技术在病毒分离中的应用与改进

龚祖坝 龚兴昌* 郑巧兮

(中国科学院上海生物化学研究所)

病毒质粒的外壳由蛋白质亚基组成,它和一般的蛋白质一样,在合适的 pH 条件下,能在电场中移动。但又有它的特殊性,所以 Tiselies 的自由电泳和淀粉胶电泳、琼脂糖电泳、聚丙烯酰胺凝胶电泳等技术对病毒的分离提纯均有一定的局限性。

从 50 年代中期开始,有的实验室开始设计利用蔗糖密度梯度作为介质进行电泳,分离和提纯病毒,但由于仪器设计不够完善或因操作繁琐,未能获得较为广泛的应用。至 60 年代中期,蔗糖密度梯度区带电泳仪才比较定型,并在分离提纯动物病毒、植物病毒等方面取得较大进展。近年来,蔗糖密度梯度电泳(简称蔗糖密度电泳)已扩大到应用于蛋白质、细胞器、细菌等的分离。而对于一些质粒不稳定病毒,如动物和植物的弹状病毒,带有脂膜的动物病毒,如用超离心、聚乙二醇沉淀、有机溶剂处理等方法分离提纯,极易使病毒质粒破碎、变形,而蔗糖密度电泳却能排除这些弊病,成为分离提纯此类病毒的非常有益的手段^[1,2]。

我们在植物病毒的分离和纯化的研究中,建立了蔗糖梯度电泳技术,并在应用过程中简化了仪器装置及操作过程,取得较好的结果。

一、蔗糖密度梯度电泳仪的装置及操作

1. 电泳仪装置 图 1 是一个玻璃装置的仪

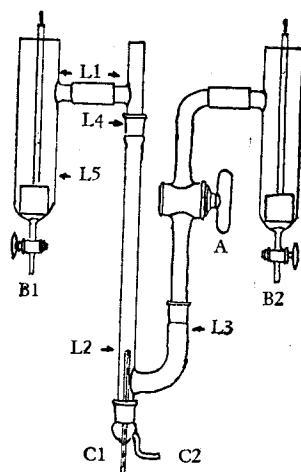


图 1 常规蔗糖密度梯度电泳仪示意图

器。中心部分是一个 U 形管,直径约 23 毫米,右臂在 2/3 高度的地方装置一个宽孔开关(A)。U 形管二端各连接一个直径为 50 毫米的电极槽。B₁, B₂ (二管粗细相等,位于同一水平), C₁, C₂ 分别为内径 1 及 2 毫米的毛细管。从 L₂ 至 L₄ 的高度约 32—35 厘米。

2. 电极 以白银电极最为理想,一般可用银丝编成大小为 20 毫米×5 的银网。我们则用大小相同的银片,每隔一定距离在银片上钻一小孔使电极液流通,也能获得较好的效果。使用时,首先需要在 1N 盐酸或用氯化钠饱和

* 中国医学科学院病毒研究所。北京。