一种简易的梯度凝胶电泳装置

王锦兰　胡纫秋
（中国科学院生物物理研究所，北京）

用梯度凝胶电泳分离生物高分子(蛋白质、酶、核酸)，并测定其分子量，是最近几年发展起来的一种电泳技术。本文介绍自制的一套垂直平板电泳装置和直线梯度混合器制备梯度平板凝胶的方法。从测定的结果看，这种装置具有样品用量少（微克），精确度高，简便易行的优点。

一、垂直平板电泳装置

用 0.5cm 厚的有机玻璃制成一个简易的垂直平板电泳仪（图 1），分上下二层槽，上槽为 20.6 × 6.2 × 4.6cm，槽内安装一根直径为 0.3 cm 的铂丝，底部有一二个插凝胶玻璃板的孔（8.2 × 0.55cm）。孔四周粘贴有橡皮板，用它填充凝胶玻璃板插入后留下的空隙，以防止电泳时缓冲液从上槽漏至下槽。下槽为 20.9 × 4.0 × 12.5cm，也安一根铂丝，并装有弯曲的玻璃冷凝管，防止缓冲液的温度升高。电泳电源为直流电源，0—300 毫安。可调电压为 0—500 伏。可按电泳的要求选用恒功率，恒流和恒压的电源。

二、直线梯度混合器制备梯度平板凝胶

直线梯度混合器由 A 和 B 二个平底玻璃试管（1.5 × 9.6cm）组成（见图 2 右）。A 管底部两侧各开一个对称的小孔，并由此各接上一个小管。B 管底部的左侧也开一孔由此也延伸出一个玻璃小管，并用塑料管连于 A 管的右侧玻璃接口小管上。A 管的左侧小孔与微量蠕动泵相连，后者用一塑料管通入要灌凝胶的玻璃板处。要灌凝胶的玻璃板面面相对，其边缘之间放置二根 2.5 × 4mm 的玻棒或塑料棒，玻棒与玻璃板接触处用胶纸密封形成一个扁的长方形空框。将空框的一端放入含有 3% 琼脂的蒸发皿中，以免灌时发生凝胶渗漏现象。接着将已配好的 30% 和 4% 的聚丙烯酰胺凝胶分别倒入 A 和 B 管，将它们放在磁搅拌器上搅拌，边搅拌边通过微量蠕动泵将胶灌至玻璃板。约 15 分钟即可灌完。

灌制梯度平板凝胶时，A 管如盛放较浓的凝胶（30%），则 B 管就放较稀的凝胶（4%），也可以相反，即 A 管为 4% B 管为 30%。前一种情况，需边灌边将插入玻璃板中的塑料管慢慢提出，后一种情况，插入的塑料管必须等胶灌完

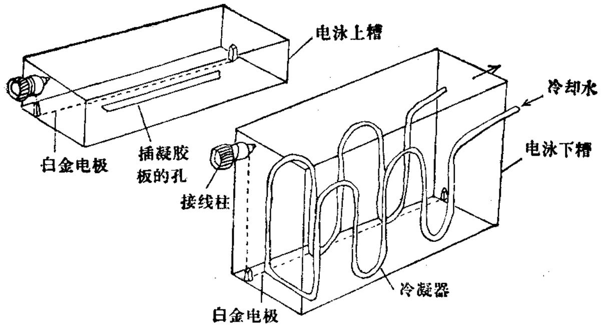

图 1　电泳槽

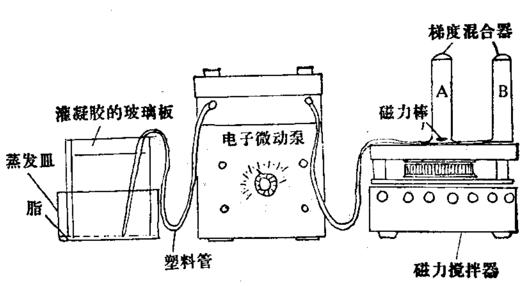

图 2　灌制凝胶板装置

后才能轻轻地提出，因为后灌的浓胶渐渐向上推顶先灌的稀胶，所以须待凝胶梯度形成后再将塑料管慢慢拉出。梯度凝胶形成后，用肉眼监测最稀的上层胶呈乳白色，中层是透明的，底部浓度最大，具有较大的硬性。用二种方法灌好的凝胶未凝固时都需在上面加一层水，以便使胶面平整。

三、用聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳测定蛋白质及其亚基的分子量

下面例举用聚丙烯酰胺凝胶电泳测定眼镜王蛇 L-氨基酸氧化酶及其亚基的分子量。

1. 测定眼镜王蛇 L- 氨基酸氧化酶的分子量[1]。

先将配制好的缓冲液（0.09*M* Tris，0.08*M* 硼酸，0.025*M*Na_2EDTA，pH8.2），放于垂直平板电泳仪的上，下二层的槽内。将梯度平板凝胶放入电泳仪中，进行预电泳 70 伏 20 分钟，然后加样，将测试样品和标准样品（Pharmacia 出品的高分子量标准蛋白质）分别通过置于梯度平板凝胶上的加样器的小孔内（见图 3），样品溶液内含：50% 蔗糖 1 微升，0.05% 溴酚蓝 1 微升，眼镜王蛇 L-氨基酸氧化酶 4 微升（相当于 20 微克蛋白质）。点样量 5 微升，待溴酚蓝进胶后，将电压升至 150 伏，电泳 16 小时，最终电压 150 伏，电流 13mA。然后将凝胶板放在 10% 磺酸水杨酸和 5% 三氯醋酸中固定 30 分钟，0.1% 考马斯亮蓝 R_{250} 溶于脱色液中，于 60% 染色 4—5 小时，再在 37℃ 脱色过液。（脱色液由 25% 无水乙醇，8% 冰醋酸组成）。需换脱色液几次。电泳结果见图 4。图 4 左为 4—30% 梯度凝胶电泳结果，右侧为分子量对数对 R_f 作图。从图中可见眼镜王蛇 L- 氨基酸氧化酶的分子量为 150,000。

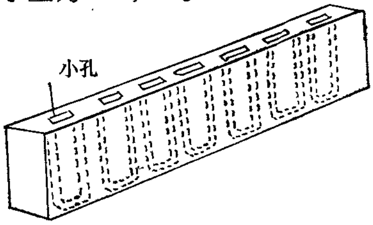

图 3 加样器

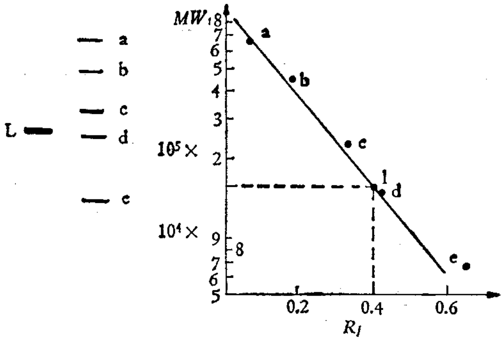

图 4 L-氨基酸氧化酶 4—30% 梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳及全酶分子量的测定

a. 甲状腺球蛋白(669,000)　b. 马脾铁蛋白(440,000)
c. 过氧化氢酶(232,000)　d. 乳酸脱氢酶(140,000)
e. 牛血清蛋白(69,000)　f. L- 氨基酸氧化酶

2. 测定眼镜王蛇 L- 氨基酸氧化酶的亚基分子量

电极缓冲液组分是 0.04*M*Tris，0.02*M* 醋酸钠，0.002*M*Na_2EDTA，0.2%SDS（纯化），pH 7.4。预处理眼镜王蛇 L-氨基酸氧化酶和标准蛋白质样品（Pharmacia 公司低分子量标准蛋白质）使其充分变性并分解成单一的亚基，将样品放在缓冲液中（1% SDS，5% 巯基乙醇，0.01*M* Tris-HCl，0.001*M*Na_2EDTA）在 100℃ 水浴加热 5 分钟（加热时样品管须封闭以免蒸发），样品冷却后加 50% 蔗糖 2 微升，0.05% 溴酚蓝 1 微升，35 微克眼镜王蛇 L-氨基酸氧化酶分解的亚基。预电泳 70 伏 1 小时，加样后电压升至 300 伏，待样品进胶后（约 10 分钟），将电压调至 150 伏，当溴酚蓝电泳到胶板底部 $\left(约 2\frac{1}{2} 小时\right)$，

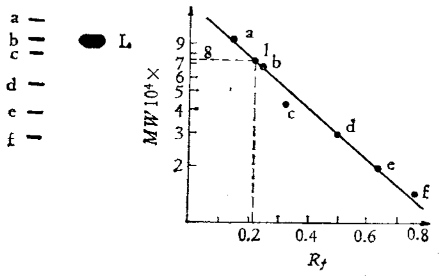

图 5 L-氨基酸氧化酶 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳及亚基分子量测定

a. 磷酸化酶 b(94,000)　b. 牛血清蛋白(69,000)
c. 鸡卵清蛋白(43,000)　d. 碳酸酐酶(30,000)
e. 蛋白酶抑制剂(大豆，20,000)　f. α-乳清蛋白(14,000)，
L：L-氨基酸氧化酶

继续电泳45分钟，之后用50%三氯醋酸固定，换几次固定液洗净SDS。染色和脱色步骤同上。结果见图5，左图为SDS凝胶电泳，右图为亚基分子量对数对 R_f 作图，从图中可见眼镜王蛇L-氨基酸氧化酶的亚基分子量为73,000。

本工作承雷克健同志指导，谨表谢意。

参　考　文　献

[1] 雷克健，胡纫秋，王锦兰：«动物学研究»，1981年，2卷，第4期(增刊) 43。

[本文于1982年10月8日收到]

铬银染色法在ng量蛋白PAGE检测中的应用

张　向　明

(卫生部药品生物制品检定所，北京)

聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)是分析蛋白样品的有力工具。但目前所用的蛋白染料不能显示ng量的蛋白电泳区带。1979年以来，Switzer[1]及其他作者[2-6]陆续发表了PAGE中蛋白区带铵银染色方法，其灵敏度可与同位素放射自显影相媲美，能检测到ng水平。1981年Merril等又报道了更灵敏的铬银染色法，只需配几个普通溶液，操作步骤也大为简化。该法较同位素法简便、快速，又不需特殊的试剂和设备。因此，可用它研究病毒的结构，分析核蛋白、组织液等的蛋白组成，尤其适合分析蛋白含量少的样品。

本文报道我们对Merril方法所做的某些改进，摸索出复染退色胶及干燥保存电泳凝胶的方法，并用此法做麻疹病毒蛋白的分析，以及流脑A群多糖菌苗制品中的微量杂质蛋白的分析。

材　料　和　方　法

一、材料

1. 麻疹病毒　麻疹病毒 L_4 株培养于MERN细胞上。按Stallcup[8]的方法培养和纯化病毒。病毒在FL细胞上的滴度为 $6TCD_{50}$/ml。纯化麻疹病毒的蛋白含量约0.5mg/ml。

2. 流脑A群多糖菌苗　本所菌种室提供。

3. 电泳槽　中国科学院动物研究所产品。

二、方法

1. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳用Laemmli 1970年[9]的缓冲系统。分离胶浓度为13%，浓缩胶浓度为4.5%。

2. 铬银染色方法

(1) 电泳毕，将平板凝胶放在50%甲醇-12%醋酸液中固定20分钟以上。

(2) 用10%乙醇-5%醋酸液洗三次，每次用200ml洗10分钟以上，去除SDS。

(3) 在200ml 0.0034*M*重铬酸钾-0.0032*N*硝酸液中浸泡7分钟，不时振动。

(4) 用无离子水(电阻 > 500,000Ω)洗二次，每次用200ml洗2分钟。

(5) 将胶板浸在200ml 0.012*M*硝酸银溶液中，在日光或灯光下(并排2根20W日光灯)曝光10分钟，再放置20分钟，中间振动若干次。

(6) 用无离子水洗二次，每次用200ml洗1分钟。

(7) 边振动胶板，边倒入0.28*M*碳酸钠-甲醛液，共三次，每次300ml。三次甲醛的浓度分别为0.01%，0.03%，0.05%。第一、二次各作用2分钟左右，第三次作用时间依蛋白区带显色至所需深度而定。

(8) 立刻用1%醋酸定影10分钟，再保存于蒸馏水中。