

一种丙烯酰胺凝胶的新型光聚合法

周军贤 周筠梅¹⁾

(中国科学院生物物理研究所, 生物大分子国家重点实验室, 北京 100101)

摘要 以亚甲基蓝为引发剂, 甲苯亚磺酸钠为还原剂, 二苯氯化碘为氧化剂的丙烯酰胺凝胶光聚合方法, 具有试剂配制简单, 适用范围广, 方法稳定性和重现性好, 且聚合速度快, 操作易于控制等特点, 是一种不同于最为广泛使用的过硫酸铵/四甲基乙二胺和核黄素/四甲基乙二胺法的新型光聚合方法. 用这一方法做了 SDS 和在酸性缓冲体系中的尿素变性梯度胶电泳, 初步试用表明这一新型光聚合方法具有很好的聚合效果.

关键词 亚甲基蓝, 光聚合, 聚丙烯酰胺凝胶电泳

学科分类号 Q503

聚丙烯酰胺凝胶电泳作为比较成熟的方法已广泛应用于对生物大分子的检测、研究和制备. 实验时, 最常用的凝胶聚合方法是由过硫酸铵 (AP) / 四甲基乙二胺 (TEMED) 混合使用的化学聚合法 (AP 法) 和由核黄素 (Rf) / 四甲基乙二胺 (TEMED) 混合使用的光聚合法 (Rf 法)^[1], 这两种广泛使用的聚合方法已有几十年的应用历史, 但由于 AP 本身是一种强氧化剂, 且 AP/TEMED 催化的聚合反应转化率不高, 有时残留的 AP、丙烯酰胺单体等能与样品中的蛋白质发生作用而导致假象条带的形成^[2~4]. 另外, 由 AP 催化凝胶聚合的最适 pH 范围较窄 (pH 7~10), 在酸性条件下 pH 值越低凝胶聚合速度越慢, 直至在 pH 4 的体系中完全不能聚合. 此聚合反应受温度、试剂纯度、试剂的新鲜程度影响也较大, 微量的有机溶剂的存在也可能引起聚合受阻导致前期操作的失败. Rf 法适用的 pH 范围更窄, pH 高于 8 或低于 4 不仅凝胶聚合困难还出现胶孔不均、胶体发粘、实验结果重复性差等现象^[5,6].

在做脲素梯度变性胶电泳 (uDGGE) 和酸性缓冲液系统电泳时深感上述两种聚合方法存在不足. 而由 Lyubimova 等^[7]介绍的新型光

聚合法 (MB 法) 以亚甲基蓝为光引发剂, 以温和氧化剂二苯氯化碘作氧供体, 以甲苯亚磺酸钠为还原剂, 使用时保持还原剂的浓度为氧化剂的 20 倍, 以保证凝胶中不会有残留的氧化剂. 我们以 MB 聚合和 AP 聚合分别做了 SDS 和在酸性缓冲液中的 uDGGE 阴极电泳. 实验证明这一新型光聚合法具有一定的优点, 现介绍如下.

1 材料与方法

1.1 材料

光聚合所用的 3 种试剂: 甲苯亚磺酸钠 (sodium toluenesulfonate, STS 纯度 98%)、二苯氯化碘 (diphenyliodonium chloride, DPIC 纯度 98%)、亚甲基蓝 (methylene Blue, MB), 均为 Fluka 产品; 丙烯酰胺、NN' 甲叉双丙烯酰胺、过硫酸铵、TEMED、Tris-glycine、SDS、巯基乙醇和电泳样品核糖核酸酶 A、蛋白质分子质量标准购自 Sigma 和 Pharmacia 公司; 其余试剂如磷酸盐、醋酸、乙醇、冰醋酸、考马斯亮蓝为国产试剂; 肌酸激酶和腺苷酸激酶是本实验室按文献[8,9]方法提纯的.

¹⁾通讯联系人.

收稿日期: 1996-12-28, 修回日期: 1997-04-28

1.2 仪器

电泳在 Bio-Rad Protein II 和 Mini Protein II 垂直电泳仪上进行. SDS 电泳采用 Tris-glycine pH 8.3 的缓冲体系^[10]. 阴极电泳缓冲体系基本按照文献 [11] 的方法制备. 脲梯度电泳按照文献 [12] 的方法制备和操作.

1.3 方法

光聚合的操作参照 Rabilloud 的方法进行^[13]: 首先, 用双蒸馏水分别配制浓度较高的 STS (0.1 mol/L)、DPIC (5 mmol/L) 和 MB (0.01 mol/L) 储液. STS 和 DPIC 储液需严格密封并避光保存于 4℃, 一次配制的储液可连续使用数月. MB 储液在室温保存可使用半年.

常规方法配制的胶溶液加入光聚合试剂 STS、DPIC 后进行脱气处理, 然后加入 MB 混合均匀, 并使 STS、DPIC 和 MB 的终浓度分别为 0.5 mmol/L、0.02 mmol/L 和 0.03 mmol/L. 需要注意的是, MB 一旦加入到胶溶液中, 则在其进入模具前需严格避光. 在垂直电泳仪中胶液灌入模具后, 可将异丙醇或双蒸水加在胶面上以隔绝空气并获得平整的胶面. 然后置于距离 40 W 钨灯 10 cm 处光照, 一般数十分钟后凝胶便初步聚合, 为保证凝胶的充分聚合和单体的完全转化光照至少需要 1 h 以上, 要使灌入模具的胶能直接被光照射, 如果胶面积过大可以考虑加大光源强度, 加长照射距离. 也可以在室温条件下光照过夜 (日光强弱变化太大不利于控制聚合速度不推荐使用). AP 聚合的对照实验中每毫升胶液加入 10% AP 5 μ l 和 0.5 μ l TEMED.

2 结果与讨论

2.1 实验结果

图 1 是使用 AP 和 MB 聚合凝胶的 SDS 电泳的结果比较. 电泳使用 Bio-Rad Mini Protein II 垂直电泳仪, 在相同条件下用相同的样品进行, 电泳图谱中 AP 与 MB 聚合结果相同, 显示 MB 聚合也完全适于碱性介质中的凝胶电泳.

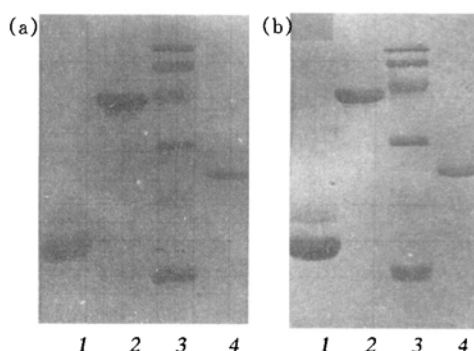


图 1 AP 与 MB 聚合的 SDS 电泳结果比较

(a) AP 聚合, (b) MB 聚合. 1: 核糖核酸酶 A; 2: 肌酸激酶; 3: 分子质量标准; 4: 腺苷酸激酶. AP 聚合胶在室温下过夜, MB 胶在室温下光照过夜, 胶浓度 $T = 20\%$, $C = 2.6\%$. 考马斯亮蓝 R-250 染色.

图 2 显示的是兔肌腺苷酸激酶在脲素梯度胶上的电泳情况. 电泳使用 Bio-Rad Protein II

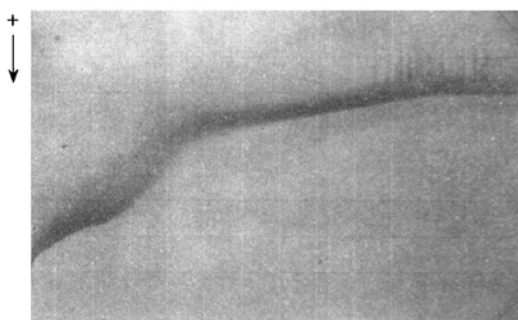


图 2 MB 聚合脲梯度电泳的结果

样品为天然态兔肌腺苷酸激酶, 胶浓度 $T = 15\%$, $C = 2.6\%$. 胶中从左到右含 0~8 mol/L 脲素和 15%~0% 的甘油梯度, 电泳由正极向负极.

垂直电泳仪, 电源用 Bio-Rad Modl 3000XI 型, 配用 Pharmacia Multi Temp II 型恒温水循环, 在 4℃ 进行电泳. 在依照文献 [12] 灌制梯度胶时, 为了保证胶中溶液混合均匀, 灌制速度要相对慢, 而胶液一旦进入模具, 则希望能及时聚合, 聚合过慢则增加漏液和梯度不准的危险. 用 AP 聚合时, 由于影响聚合速度的因素多, 不易控制, 常发生聚合过快 (堵塞管道) 和过慢 (漏液) 的现象. 相比之下, MB 聚合

则易于控制, 尤其是做阴极电泳时, pH 低于 5 的酸性介质体系以 AP 聚合制备梯度胶很困难, 而采用 MB 聚合只要注意胶液在灌入模具前避光即可, 制胶的结果较为理想. 从图 2 中可以清楚地看到随脲浓度的增加腺苷酸激酶从天然态到去折叠态过程. 显示了 MB 聚合在阴极电泳中的优越性.

2.2 MB 光聚合的特点

根据 Righetti 等从 1993 年起对这一新型光聚合法系统研究的结果, MB 光聚合特点包括: 该反应系统能保证胶内是非氧化环境, 可避免对样品的氧化损伤; 变性剂、有机溶剂等添加剂的存在对凝胶聚合的干扰较小, 适合于在多种复杂系统中应用; 聚合反应适宜的 pH 范围宽, 在 pH 3~ 10 体系中均有很好的聚合效果; 聚合受温度变化影响小; 反应转化率高, 聚合反应效果可靠, 稳定; 生成的胶弹性好等^[7, 14~ 16]. 并且, 此法所用试剂配制简单, 用量小, 有较长的储存期, 免除了用 AP 法时

每次需新鲜配制过硫酸铵的烦恼. 而且, 此聚合只对光照敏感, 故聚合易于控制.

另外, 文献中提到 STS、DPIC 要每周新鲜配制, 对此我们作了一组对照实验, 用完全相同条件检查新鲜配制和配制后存放 4 个月的 STS、DPIC 对 pH 在 2.2~ 10 范围的胶溶液的聚合效果, 结果其聚合时间完全相同, 需要说明的是我们存放 4 个月的 STS、DPIC 是在密封、避光、4℃条件下存放的. 作为化学反应, MB 法光聚合与 pH、温度、光引发剂用量密切相关. 文献中给出的聚合标准操作条件包括: 胶溶液中含 0.1 mmol/L MB 和 1 h 光照^[7], 而我们在作聚合与 pH 的相关性实验时观察到虽然用 0.03 mmol/L 的 MB 和 1 h 的光照^[13]能使我们在 pH 2.2~ 10 之间的 8 个试验胶全部聚合, 但其聚合时间很不相同, 在完全相同的条件下 pH 2.2 的胶 5 min 内聚合, 而 pH 10 的胶 50 min 聚合. 表 1 所给出的是三种聚合法聚合效果的实验结果.

表 1 三种聚合法的聚合效果与 pH 的关系

pH		2.2	3	4	5	6	7	8	9	10
MB 法	转化率/% ¹⁾	—	—	96	96	96	96	96	88	80
	聚合时间/min	5	5	11	—	13	—	30	50	56
AP 法	转化率/% ¹⁾	—	—	5	65	84	94	96	96	96
	聚合时间/h	不聚合	不聚合	不聚合	—	4	—	2	2	2
Rf 法 ²⁾	转化率/% ¹⁾	—	—	82	88	94	88	66	38	5
	聚合时间/h	不聚合	不聚合	4	—	0.5	—	0.7	1	1

¹⁾ 丙烯酰胺单体聚合转化率数据引自文献 [15]; ²⁾ 核黄素浓度 6 μmol/L, 每毫升胶加入 TEMED 0.5 μl; —: 未测定.

Creighton 等^[17]在脲梯度电泳中应用了 MB 光聚合法并充分肯定了它的优点. 最近, Rabilloud 等^[18]报道了 MB 光聚合凝胶在分析碱性蛋白 (如组蛋白类) 和在酸性条件下电泳时显示的优势, 并对 MB 光聚合法的优缺点作了客观的评述^[19]. 而 Rabilloud 等^[13]在将 MB 光聚合方法应用于 SDS 和双向微量制备电泳时, 发现引起分辨率一定程度下降的现象, 并将此法中的亚甲基蓝以核黄素代替之后得到高分辨率的满意结果. Chiari 等^[5]认为, 在 MB 光聚合凝胶中可能存在染料与某些蛋白质间的

疏水相互作用. 看来, 尽管 MB 聚合法具有许多优点, 但它也不是完美无缺的, 至少目前 MB 光聚合的应用实例还不是很多. 但我们初步体会到了此法的一些优点.

参 考 文 献

1 郭尧君. 薄层等电聚焦技术. 生物物理学报, 1988, 4 (4): 389~ 391

2 Chiari M, Chiesa C, Righetti P G. Kinetics of cysteine oxidation in immobilized pH gradient gels. J Chromatography, 1990, 499: 699~ 711

3 Chiari M, Manzocchi A, Righetti P G. Formation of acys-

- teine acrylamide adduct in isoelectricfocusing gels. J Chromatogr, 1990, **500**: 697~ 704
- 4 Cossu G, Pirastru M G, Satta M *et al.* Carrier ampholyte mediated oxidation of proteins in isoelectricfocusing. J Chromatogr, 1989, **475**: 283~ 292
- 5 Chiari M, Righetti P G. New types of separation matrices for electrophoresis. Electrophoresis, 1995, **16** (10): 1815~ 1829
- 6 Righetti P G, Gelfi C, Bosisio A B. Polymerization kinetics of polyacrylamide gels. III. effect of catalysts. Electrophoresis, 1981, **2** (6): 291~ 295
- 7 Lyubimova T, Caglio S, Gelfi C *et al.* Photopolymerization of polyacrylamide gels with methylene blue. Electrophoresis, 1993, **14** (1): 40~ 50
- 8 姚启智, 侯立向, 周海梦等. 肌酸激酶肌变性时的构象变化. Sci Sin, 1982, **B** (10): 892~ 897
- 9 Heil A, Muller G, Noda L *et al.* The amino-acid sequence of porcine adenylate kinase from skeletal muscle. Eur J Biochem, 1974, **43** (1): 131~ 144
- 10 Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 1970, **227** (5259): 680~ 685
- 11 Reisfeld R A, Lewis U J, Williams D E. Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamidegels. Nature, 1962, **195** (4838): 281~ 283
- 12 周启贤, 王希成, 张艳玲等. 脉梯度电泳方法的技术关键. 生物化学和生物物理进展, 1996, **23** (2): 172~ 175
- 13 Rabilloud T, Vincon M, Garin J. Micropreparative one- and two-dimensional electrophoresis: improvement with new photopolymerization systems. Electrophoresis, 1995, **16** (8): 1414~ 1422
- 14 Lyubimova T, Righetti P G. On the kinetics of photopolymerization: A Theoretical study. Electrophoresis, 1993, **14** (3): 191~ 201
- 15 Caglio S, Righetti P G. On the pH dependence of polymerization efficiency, as investigated by capillary zone electrophoresis. Electrophoresis, 1993, **14** (5): 554~ 558
- 16 Caglio S, Chiari M, Righetti P G. Gel polymerization in detergents: conversion efficiency of methylene blue vs. persulfatecatalysis, asinvestigated by capillary zone electrophore-

- sis. Electrophoresis, 1994, **15** (2): 209~ 214
- 17 Creighton T E, Shortle D. Electrophoretic characterization of the denatured states of Staphylococcal Nuclease. J Mol Biol, 1994, **242** (5): 670~ 682
- 18 Rabilloud T, Girardot V, Lawrence J J. One and two dimensional histone separations in acidic gels: usefulness of methylene blue-driven photopolymerization. Electrophoresis, 1996, **17** (1): 67~ 73
- 19 Rabilloud T. Solubilization of proteins for electrophoresis analyses. Electrophoresis, 1996, **17** (5): 813~ 829

A New Photopolymerization System for Polyacrylamide Gel. ZHOU Jun-xian, ZHOU Jun-mei (*National Laboratory of Biomacromolecules Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*).

Abstract A method for photopolymerization of polyacrylamide gel with methylene blue (initiator), sodium toluenesulfinate (reducer) and diphenyl-iodonium chloride (oxidizer) features simple operation, reliable gelation, good reproducibility and easy control of gelation, which is advocated as a valid alternative to the most popularly used AP/TEMED and Rf/TEMED ones. This method was tested for SDS and uDGGE with acidic buffer system, and satisfactory results were obtained. These preliminary experiments demonstrate that this novel method of photopolymerization gives reliable results and is another choice for gel polymerization.

Key words methylene blue, photopolymerization, polyacrylamide gel electrophoresis

人血清脂蛋白 (a) 中纤维蛋白溶酶原位点测定

汪俊军 庄一义

(南京军区南京总医院全军医学检验中心, 南京 210002)

摘要 用单克隆抗载脂蛋白(a)抗体为包被抗体,酶标抗纤维蛋白溶酶原(Pg)抗体为检测抗体建

收稿日期: 1997-05-28, 修回日期: 1997-07-21