

微量聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳

陆 荣 华 陈 瑞 铭

(上海实验生物研究所)

聚丙烯酰胺凝胶作为电泳分离的支持物于1959年首次得到应用,而聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳则是于1964年发展起来的。同年在分离脑蛋白时,首先应用了微量聚丙烯酰胺凝胶电泳。1965年有人将毛细管用于微量盘状电泳技术并报道了毫微克(ng)蛋白的分离及定量。1966年对此技术进一步加以改进,应用2微升毛细管分离脑蛋白。1967年先后报道了用微量盘状电泳技术分析血清蛋白的工作,以及用直径1.1到1.2毫米、长30毫米的微量聚丙烯酰胺凝胶对小鼠卵的乳酸脱氢酶(LDH)同功酶进行了电泳分析的结果。1968年,介绍了一种凝胶混合物及其在分离微量水溶脑蛋白中的应用。此种凝胶广泛地适用于许多不同的分离对象,促进了这项技术的广泛开展。1970年有人将这种技术应用于分析脊椎动物(蛙)单个红血球的血红蛋白(Hb)及乳酸脱氢酶(LDH)同功酶。国际上,这项技术发展较快,已广泛应用于生物学和医学研究的各个领域。最近几年,借助微量聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳结合免疫荧光方法、放射自显影术以及组织化学等方法开展了分子生物学、细胞生物化学等学科的微量及超微量分析研究。

无产阶级文化大革命以来,随着我国科学研究的发展,国内已广泛采用聚丙烯酰胺凝胶电泳开展分子生物学、细胞生物化学、生物化学以及免疫学等学科研究并用于临床诊断。有关聚丙烯酰胺凝胶电泳的原理、方法及经验介绍均有报道。这一技术日益引起人们的重视,有时成为研究工作中不可缺少的工具。至于微量聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳在国内尚付缺如。一年来,我们初步摸索了有关这方面的技术,现概略介绍于下。

设备与操作方法

一、毛细电泳管制备及处理

毛细电泳管的制备

聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳的电泳管一般用5—7毫米内径的玻璃管。微量盘状电泳的电泳管是采用玻璃毛细管。根据工作需要,取中性硬质玻璃管制备各种内径的毛细电泳管。通常制备内径0.45毫米、外径2毫米、长度45毫米的毛细管,这种规格毛细管充注5微升的凝胶高度达33毫米。严格选择一批经充注5微升水高度达 33 ± 1 毫米的毛细管作为5微升电泳管。

毛细电泳管的清洗

将30—50根毛细管用橡皮圈捆成一束,浸泡于硫酸重铬酸钾洗液中一天。然后,将毛细管束的一端浸于水内,另一端接上抽气水泵的抽吸橡皮管,使水充分流经毛细管管腔,进行彻底清洗。最后以蒸馏水清洗,温箱烘干备用。

毛细电泳管管内壁的处理

由于毛细管的管径十分细小,从中取出凝胶是较困难的。若以二氯二甲硅烷预先处理一下管的内壁,则以后把凝胶从管内通出就容易得多。处理过程如下:先将洗净的毛细管经 120°C 高温烘箱烤一小时,充分除水。以2%二氯二甲硅烷(dimethyldichlorosilane)的甲苯溶液浸泡20分钟。取出后,将毛细管一端置于干净滤纸上,吸去二氯二甲硅烷。然后以重蒸的甲苯洗涤一次,除去剩余的二氯二甲硅烷。再用重蒸的甲醇洗一次,终止反应。最后将毛细管以乙醇浸洗,使管壁呈中性,烘干待用。

二、凝胶的制备及加样

储存液及胶液的配制

聚丙烯酰胺凝胶由下列诸储存液配制而成:

储存液 A: 称取三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 860 毫克, 加入水 8 毫升和四甲基乙二胺 (TEMED) 0.063 毫升, 以 3.6N 硫酸调至 pH8.8 (大约加 0.45 毫升), 最后加水至 10 毫升。

储存液 B: 称取三羟甲基氨基甲烷 2.85 克, 加入水 25 毫升, 以 8.7M 磷酸调至 pH7, 再以 1M 磷酸调至 pH6.7, 最后加水至 50 毫升。

储存液 C: 称取丙烯酰胺 (Acrylamide) 20 克、甲叉双丙烯酰胺 (Bis) 200 毫克和铁氰化钾 $[K_3Fe(CN)_6]$ 3.75 毫克溶于水中, 使最后体积为 37.5 毫升。

储存液 D: 称取过硫酸铵 70 毫克, 加入 4% TritonX-100 水溶液 25 毫升, 最后加水 25 毫升。

储存液 E: 称取三羟甲基氨基甲烷 5.98 克, 加入水 50 毫升和四甲基乙二胺 0.46 毫升, 以 8.7M 磷酸调至 pH7, 再以 1M 磷酸调至 pH 6.7, 最后加水至 100 毫升。

储存液 F: 称取过硫酸铵 200 毫克, 加入 4% TritonX-100 水溶液 5 毫升, 最后加水 5 毫升。

配制储存液 A 及 E 须先加入 TEMED 后再调整 pH, 因 TEMED 是碱性试剂。上述诸储存液除储存液 D 外, 其余储存液可保藏于 4℃ 冰箱达二、三月之久。TritonX-100 是一种非离子型去污剂, 它有助于凝胶从毛细管内通出, 但并不影响凝胶的分离性质。若凝胶内含有 TritonX-100, 则毛细电泳管可不必经二氯二甲硅烷预处理, 取胶时也同样是容易的。但 TritonX-100 对十二烷基硫酸钠 (SDS) 有较大影响, 因此含 TritonX-100 的凝胶不适于 SDS 电泳。

不同浓度凝胶的配制。配制 20% 凝胶时, 取 0.25 毫升储存液 A 与 0.75 毫升储存液 C 混合, 再加入 1 毫升储存液 D。溶液混合过程应小心操作, 避免气泡进入液体。25% 凝胶的制备即加 100 毫克丙烯酰胺于 2 毫升 20% 凝胶混合液中。制备低于 20% 凝胶即以水调整储存液 C 中相应比例。分离胶的浓度选择则视被分离物的情况而定。

铺胶及加样

毛细电泳管内铺胶是赖于毛细管本身的毛细引力进行。将毛细管一端插入盛有凝胶混合液的烧杯中, 借毛细引力将胶液充入管内, 待胶液抵达预定的高度时即将毛细管移离胶液。若充胶超过预定的高度可用滤纸小心吸去。微量凝胶是按其量而定为 1-微升凝胶、2-微升凝胶、5-微升凝胶以及 10-微升凝胶等等。一般 5-微升凝胶用途最广(封二图 I)。我们制备 5-微升凝胶(分离胶)时, 取 0.45 毫米内径毛细电泳管以玻璃特用彩色笔于 33 毫米处划上一记号, 然后借毛细作用将胶充至刻度处即成 5-微升凝胶。

胶铺成后, 将毛细电泳管插入预先打有小孔(孔径略小于毛细管外径、深度 2—3 毫米)的软橡皮板上, 用显微操纵器于凝胶表面铺上 5 毫米的水层。铺置水层是项较细致的工作, 必须谨慎操作, 因为凝胶表面的性质将决定其后的分离效果。我们采用了童第周(1963)所设计的用于细胞核移植的显微操纵器, 但略加改进, 于显微操纵台的水平方向移动轴上加接了一个万向装置, 使操作更为便利。玻璃微小针头应尽可能拉制得细而长, 针头外径必须大大地小于毛细电泳管内径, 这样在铺置水层时利于管内空气排出, 不至于形成气栓。针头长度以插入毛细电泳管后能抵达凝胶表面即可。铺水层的操作步骤如下: 先于微小针头内吸入蒸馏水, 借显微操纵器将针头沿毛细管壁插入管内, 待针头抵达凝胶表面时, 操纵显微注射器将水注出铺于凝胶表面, 然后小心退出针头(封二图 II)。显微操作时, 可前置一个放大镜, 后衬深色背景以利提高效率。凝胶表面铺上水层后, 起初能看到明显的界限, 然后界限消失, 待再显现明确界面时表明凝胶业已聚合, 此过程需时约 45 分钟。刚聚合的凝胶不能立即使用, 因分离效果较差, 应将其置于室温 10 小时以上方可应用。可将毛细电泳管连同橡皮板一起置于培养皿内, 培养皿中充满水, 上面再罩以大烧杯, 造成人工温室(封二图 III), 放置过夜。这样制备的分离凝胶在聚合后两天内应用, 不失其效能。一般情况下, 在电泳前二小时于分离胶上再铺上 5 毫米厚的

迅速凝聚的5%凝胶(浓缩胶),有利于样品浓缩和预分离,同时也可填封在某种情况下于分离胶顶面和玻璃管壁间可能产生的隙缝。5%凝胶制备是取0.25毫升储存液E加0.75毫升储存液C及1毫升水组成甲液。取1毫升甲液加1毫升储存液E组成乙液,再取乙液1毫升以0.8毫升水和0.2毫升储存液F稀释成5%胶液。使用显微操纵器将置于分离胶上的水层全部移出后再铺上5%凝胶,然后在5%胶面上覆以储存液B和蒸馏水(1:3)的稀释液。操作时切忌损坏分离胶胶面,在分离与浓缩胶液之间不应存有气泡。按上述方法配制的5%凝胶于10分钟内即能聚合。可以通过减少储存液F的用量或将凝胶液置于冰浴内来延迟聚合时间,便利初次使用显微操纵器的工作同志。减少的储存液F的用量应以水来补足。以储存液B和蒸馏水(1:3)的稀释液所配制的25%蔗糖缓冲液代替5%凝胶也能收到满意的效果。

微量聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳对于分离蛋白溶液样品的最适浓度为1—3毫克/毫升,浓度高的蛋白溶液电泳前必须稀释。一般情况下,取0.1—1微升的蛋白样品用于电泳。内径0.45毫米的毛细电泳管内,1毫米高度相当于0.156微升,是按计算圆柱体体积的公式来换算加入样品的总量。电泳样品的加入过程及要求与铺置5%凝胶相同。样品加入后,毛细电泳管内余下的空间全部充以1:3稀释的储存液B。

三、浓度梯度凝胶

凝胶浓度梯度法能进一步提高聚丙烯酰胺凝胶电泳的分辨率,能在同一凝胶柱中同时分离分析大小相差很大的样品分子。作微量聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳时,可应用阶梯式的不连续浓度梯度凝胶及直线性连续浓度梯度凝胶。

阶梯式的不连续浓度梯度凝胶的制备可按上述方法配制各种浓度凝胶液逐一铺入毛细电泳管内。当然,应在下层凝胶聚合后再铺入上层凝胶。

直线性的连续浓度梯度凝胶的制备应先配制下列储存液:

储存液A₁: 同上储存液A。

储存液C₁: 同上储存液C,但甲叉双丙烯酰胺浓度增加1倍。

储存液D₁: 同上储存液D,但过硫酸铵浓度降低1倍。

制备5微升直线性的连续浓度梯度凝胶可如下进行:取内径0.45毫米、长度40毫米的毛细管,先于毛细管33毫米及16.5毫米处用彩色铅笔作上记号,然后将毛细管插入储存液D₁中,借毛细引力将D₁液充至16.5毫米记号处,随即将毛细管插入储存液A₁和C₁(1:3)的混合液中,使液充至33毫米处。胶液充毕后,立刻将毛细管垂直置于软橡皮板上,静待聚合。一般于45分钟内聚合。毛细管必须垂直放置,靠溶液的扩散形成直线性连续浓度梯度。若在储存液A₁、C₁混合液中投入一小颗溴酚蓝结晶粉末,使溶液呈蓝色,即可直接观察溶液的扩散及梯度的形成。按这方法制备的梯度凝胶长度约为15毫米。凝胶聚合后,胶面上存有10—12毫米的水层,因此不必于胶面上另铺水层。这类梯度凝胶胶面不必再铺置5%浓缩胶,可于胶面水层吸去后,铺入4毫米以储存液B所配制的20%蔗糖缓冲液,再加入样品,覆以电极缓冲液后即可电泳。

四、电泳槽与电泳

电泳槽的设备,我们利用本所工厂自制的用作常规盘状电泳的装置进行改装。于电泳槽的上槽底部插置电泳管处插上一个锥形玻璃接管,锥口处套上一段5毫米长的8号医用导尿管,导尿管的另一端接上毛细电泳管(封二图IV)。装置毛细电泳管前,于锥形玻璃管内先加入电极缓冲液,然后插上毛细电泳管,这样可避免毛细管顶端与电极缓冲液之间出现气泡。电极缓冲液可按工作需要而适当选择,我们一般应用三羟甲基氨基甲烷-甘氨酸缓冲液,pH8.4。

电泳时的电压可根据凝胶浓度及分离物的类型而定。用高浓度凝胶分离样品时,需较高电压,通常20%的凝胶需60—80伏。电泳时视工作需要可单管或4—6管同时进行。同常规盘状电泳一样,可于毛细电泳管内或样品液中加入指示染料溴酚蓝作为电泳迁移的可见标

志。电泳的时程取决于被分离蛋白的种类,一般为20—60分钟。

五、蛋白区带的染色及记录

取出微量凝胶及染色

电泳毕,将电泳毛细管迅速从电泳槽上取下,立即取出凝胶。取凝胶的方法,我们采用了5-毫升金属兽用注射器,在注射器上接上一只采血针头(针头尖端截去),于针头上套上一段3厘米长的中央钻有小孔的耐压橡皮管,针头插入橡皮管内约占全长的2/3左右(封三图V)。注射器预先吸入水,再将电泳毛细管插入橡皮管的末端,然后注水,借助水压把凝胶挤去。

凝胶取出后即投入1%氨基黑乙酸液(1克氨基黑溶于100毫升7.5%乙酸)固定并染色,染色时间5分钟。经染色的凝胶可放入7.5%乙酸内进行分色,一般于30分钟分色即能完成,蛋白区带的染色十分清晰,无须进行电泳分色。

若做某些同功酶研究,可将凝胶投入酶反应溶液中进行温育并显色。

凝胶的照相及扫描

染色后的凝胶可装入细玻璃管内,管中充注7%乙酸,光源从下向上照相。凝胶染色后显示的区带,可用光密度计扫描记录,从扫描图的峰面积可作相对量比较。

染色后的凝胶若要保存,应存于充有7.5%

乙酸细玻璃管内,并在管内滴入几滴1%氨基黑乙酸溶液,使溶液略带颜色,置于冰箱保存。

结 语

我们按上述方法对人血清白蛋白、马铁蛋白、人血清蛋白以及人体肝癌组织的乳酸脱氢酶同功酶进行了电泳分析,效果较好。以氨基黑染色,能检测20毫微克(ng)量的白蛋白及铁蛋白。0.0125微升人血清电泳后,经氨基黑染色,清晰可辨15条蛋白染色区带。按Dietz(1967)显示乳酸脱氢酶同功酶的方法,进行了微量乳酸脱氢酶同功酶分析(封三图VI, VII)。

本文介绍了在现有的聚丙烯酰胺盘状电泳的设备基础上略加改进、应用玻璃毛细管建立微量聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳技术,并初步应用于微量蛋白的分析研究。微量聚丙烯酰胺盘状电泳具有设备简单,耗材(包括测试样品及凝胶原料等)少,电泳时程短,染色快,分色简便等优点。唯一困难之处是要进行显微操作,但经过多次实践,就能应用自如。

应用梯度凝胶或于凝胶表面铺上Sephadex G-100或G-200就能解决一些特殊的微量分离问题。微量聚丙烯酰胺盘状电泳与荧光免疫技术、组化方法以及放射自显影术结合使用,将使我们的研究工作推进到新的水平。

[本文于1976年4月17日收到]

胞二磷胆碱发酵条件的初步摸索

中国科学院生物物理研究所二室二组

前 言

胞二磷胆碱(简称CDP-C)是生物体磷脂代谢的重要前体。它作为治疗脑损伤引起的意识障碍的生化药物,国外六十年代初期开始用于临床。国内近年来也开始应用。临床实践证明,它对头部外伤、脑手术引起的意识紊乱,有

较好的疗效。

胞二磷胆碱的制备方法,大体上有两种:一种是有有机合成的方法;一种是生物合成(或有有机合成和生物合成相结合)的方法。本文采用后一种方法:用有机合成的方法,以氯化胆碱为原料,合成磷酰胆碱;再以磷酰胆碱和胞一磷为原料,利用啤酒酵母发酵制备胞二磷胆碱。

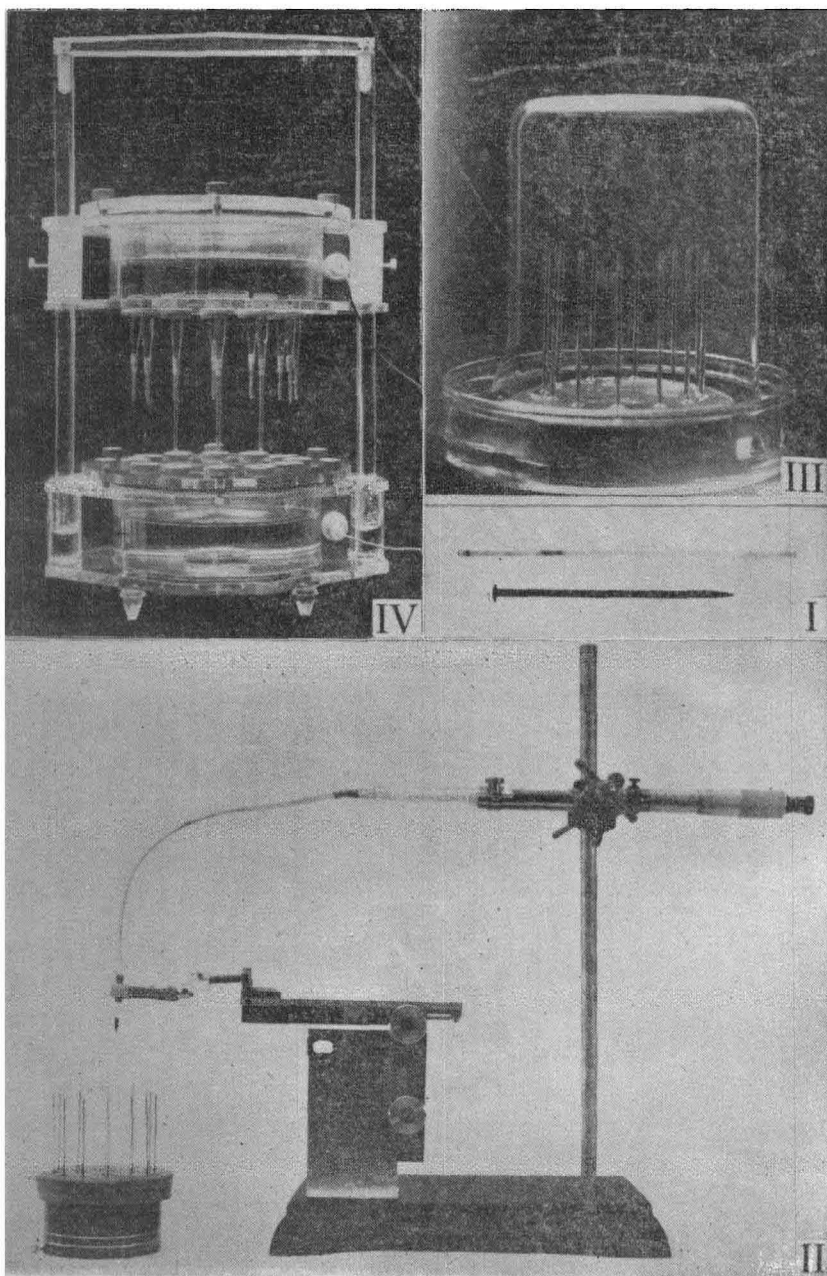
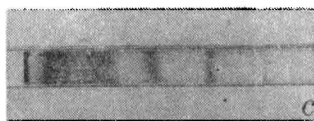
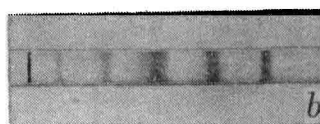
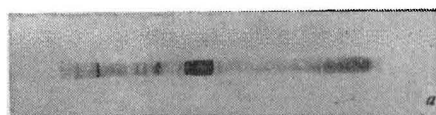
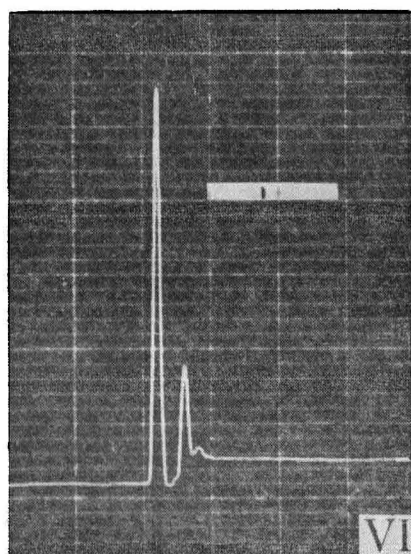
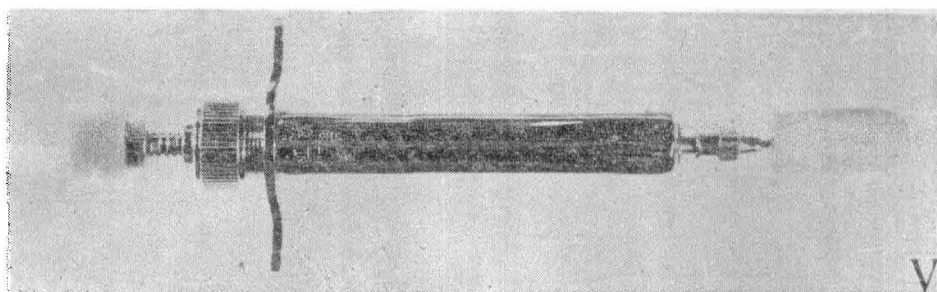


图 I 5-微升凝胶,对比参照物为大头针
 图 II 显微操纵台
 图 III 人工温室
 图 IV 电泳槽



VII

图 V 取微量凝胶的金属注射器

图 VI 75 毫微克的人血清白蛋白的电泳及扫描图 5-微升梯度凝胶,电泳时间 40 分钟,电压 70 伏。

图 VIIa 0.0125 微升人血清的电泳图 5-微升梯度凝胶,电泳时间 60 分钟,电压 70 伏。

图 VIIb 一例人体肝癌的 LDH 同工酶电泳 5% 20-微升凝胶,电泳时间 60 分钟,电压 70 伏。

图 VIIc 同例人体肝癌附近的宿主肝的 LDH 同工酶电泳 条件同上。