

区带电泳技术(四)

兰州生物制品研究所生化组

四、聚丙烯酰胺凝胶盘电泳

1. 基本原理

聚丙烯酰胺凝胶是由丙烯酰胺 (Acrylamide 简写为 Acr) 和交联剂 N, N-亚甲基双丙烯酰胺 (N, N-methylene Bisacrylamide, 简写为 Bis) 经催化聚合而成的大分子物质。

聚合过程有二种:

一种是化学聚合。通常选用过硫酸铵-四甲基乙二胺 (Tetra methylethylenediamide, 简称 TEMED 或 TMED) 或过硫酸铵-二甲氨基丙腈 (3-Dimethyl amino propionitrile, 简称 DMPN) 或过硫酸铵-三乙醇胺 (Triethanolamine 简称 TEOA) 等催化系统, 制备电泳胶管中的分离胶层。系统中过硫酸铵是引发基团, 供给游离氧基; 而 TEMED、DMPN 或 TEOA 是催化加速剂。

一种是光照聚合。常选用核黄素——TEMED (或 DMPN, TEOA) 等催化系统。在荧光灯照射下, 核黄素经光分解, 再氧化, 产生自由基供聚合之用。此法比上法制得凝胶的胶孔大, 常用作电泳胶管中的隔离胶层。为简化操作手续, 亦可省去这一胶层。

聚丙烯酰胺凝胶具有网状立体结构, 很少带有离子的侧基, 惰性好, 是区带电泳的良好介质。在电泳过程中, 电渗作用很小, 几乎无吸附作用, 对热稳定, 在一定浓度内, 凝胶呈无色透明状, 机械强度大, 富有弹性, 易于观察结果。

聚丙烯酰胺凝胶电泳用于离析高分子物质时, 它兼有电泳和分子筛层析的双重作用, 加之电泳系统的不连续性, 其分辨力和敏感性显著提高。所谓分子筛层析, 是指凝胶中的每个颗粒的微细结构好象一个筛子, 离子或小分子物质能够进入颗粒内部暂停, 而大分子物质却被排阻在外, 在电场作用下, 样品中的各种物质通过凝胶介质而分离, 实际上也是层析过程, 所以这

种分离作用不仅决定于样品各组份所带电荷多少, 而且也与各组份分子量大小有一定关系。图7为聚丙烯酰胺电泳原理的示意图, 电极槽与凝胶中缓冲液的成份、pH 值和离子强度均不相同, 构成电泳系统的不连续性。电泳时, 系统中各离子按特定的次序分布, 先导离子在前, 尾随离子在后, 样品中各组份夹在中间, 形成较狭窄的运动前沿, 向前移动。

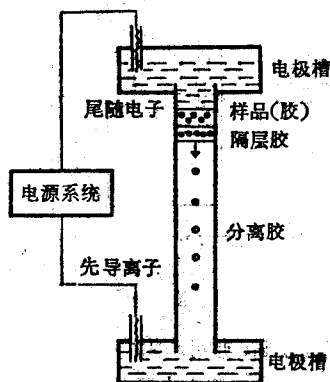


图7 聚丙烯酰胺电泳原理示意图

凝胶配制浓度可根据样品物质的分子大小进行选择。如分子量范围为 10^4 — 10^6 的蛋白, 常用含丙烯酰胺 7.0—7.5% 的凝胶; 分子量小于 10^4 者常用 15—30% 浓度的凝胶; 分子量特大者则选用 4% 或更低浓度的凝胶。可参见表 2。

表2 凝胶浓度选用参考表

蛋白质的分子量	分离胶中丙烯酰胺浓度%
1×10^4 — 4×10^4	15×25
4×10^4 — 10×10^4	10×15
10×10^4 — 30×10^4	5×10
30×10^4 — 50×10^4	5
50×10^4 以上	2×5

目前不仅发展和改进了盘电泳法, 而且也发展了以聚丙烯酰胺为介质的平板电泳法用于微量分析和制

备纯品。本文仅就我们参考有关资料进行试用的简易盘电泳法作一介绍。

2. 设备和材料

电泳仪 国产不同型号均可通用。我们现用 DY-9 型中压电泳仪,输出电压 0—600 伏,电流 0—100 毫安。电泳室系利用有机玻璃自制,由上下两个可以分开的圆筒形电极槽组成,上槽高 10 厘米,直径 10 厘米,底部周围打有圆孔 8—10 个,孔径 12 毫米,用以固定玻璃凝胶管,底边直径较下槽口径略大或略小,使相套迭。下槽亦为高 10 厘米,直径 10 厘米。上槽盖及下槽底部中心各打一圆孔,用以固定铂金丝电极,电泳时,如用碱性缓冲系统,则上槽接负极,下槽接正极。玻璃凝胶管内径 5—6 毫米,外径 8 毫米,长 85—95 毫米,所用各管规格要一致,用大小适宜的橡皮塞紧密固定于上槽各个圆孔,不得漏水。电泳装置见图 8。

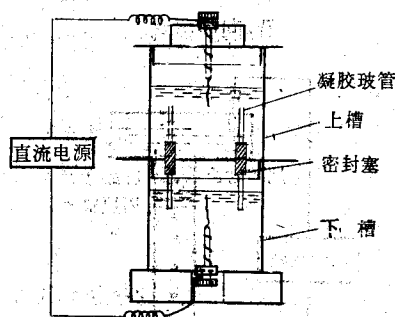


图 8 聚丙烯酰胺盘电泳装置示意图

如无有机玻璃,亦可利用广口瓶装制电泳室。将 500—1000 毫升广口瓶由中腰截断,上半截瓶口塞一大橡皮塞,塞上打四个圆孔,用以装置玻璃凝胶管,倒置作为上电极槽,瓶的下半截作为下电极槽。这种装置简便易行。

试剂

1. 19.6% 丙烯酰胺-0.4% 亚甲基双丙烯酰胺贮备液 称取丙烯酰胺(暂用英国 BDH 实验试剂,含量不低于 98.5%)19.6 克,亚甲基双丙烯酰胺(暂用比利时 rcb 纯品,含量 98%)0.4 克,以无离子水溶解,稀释至 100 毫升,置冰箱贮存备用。如无纯品,可用粗制品纯化,方法如下:

丙烯酰胺纯化:取 70 克丙烯酰胺,溶于 1 升氯仿中,50℃ 加热,过滤,滤液凉后置-20℃ 冰箱,析出结晶后过滤,以氯仿冲洗,结晶置于真空干燥器中减压干燥,放棕色瓶中避光保存备用。

双丙烯酰胺纯化:取 10—12 克双丙烯酰胺,溶于 1 升丙酮中,在通风橱内加热 40—50℃ 半小时,过滤,

滤液凉后置-20℃ 冰箱,析出结晶后过滤,以冷丙酮冲洗,结晶置于真空干燥器中减压干燥,放棕色瓶中避光保存备用。

注意:丙烯酰胺和双丙烯酰胺是神经性毒剂,操作时应避免与皮肤接触。

2. 0.5M 三羟甲基胺基甲烷(Tris)-0.04M 乙二胺四乙酸(EDTA)缓冲液 称取 Tris 6.057 克,EDTA 1.17 克,以无离子水溶解,稀释至 100 毫升,应为 pH8.8。

3. β -二氨基基丙腈或三乙醇胺或四甲基乙烯二胺 原液用前稀释至 50% 浓度(四甲基乙烯二胺用前稀释至 25% 浓度)。

4. 10% 过硫酸铵溶液 称取过硫酸铵 0.5 克,溶于 5 毫升无离子水,冰箱保存,需每周新配。

5. 25% 蔗糖溶液 新鲜配制,保存冰箱不宜过久。

6. 0.004% 溴酚蓝溶液

7. 0.4M 硼酸缓冲液(贮备液) 称取硼砂 30.512 克,硼酸 4.948 克,以无离子水溶解至 1000 毫升。用前取 90 毫升,稀释至 1440 毫升,即为 0.025M, pH9.0 (电极槽用)。此液可代替甘氨酸-Tris 缓冲液。

8. 甘氨酸-Tris 缓冲液(贮备液) 称取甘氨酸 28.8 克,Tris 6.0 克,以无离子水溶解至 1,000 毫升, pH8.3, 用前稀释 10 倍。

9. 0.5% 氨基黑染色液 取氨基黑 10B0.5 克,冰醋酸 7 毫升,以无离子水溶解至 100 毫升。

10. 5% 冰醋酸洗脱液 量取冰醋酸 50 毫升,以无离子水稀释至 1,000 毫升。

3. 实验方法

凝胶管制备 取出上述试剂 1、2、3、4、5,平衡至室温,在一三角瓶中分别加入 1 液 8.4 毫升、2 液 15.1 毫升、3 液 0.2 毫升,混合均匀。再取 4 液 0.3 毫升,与上混合液分别置真空干燥器中抽气除氧约 5 分钟后,将二液混合,轻轻摇匀,立即用毛细管(或刻度吸管)分装于玻璃凝胶管中,管底事先以橡皮塞套塞,并能竖立,每管等装至 70 或 80 毫米高度(约 2.1 毫升),随即在液面小心覆盖 5 毫米厚的水层。注意加入 4 液后的全部操作,应在 5 分钟内完成,然后静置 30 分钟以上,当胶液与水层分界面消失后再现时,表明凝胶聚合反应已告完成。如此制得的凝胶柱,直径 5—6 毫米,长 70—80 毫米,凝胶浓度 7%,交联度 2%,含有 0.32M Tris-0.025M EDTA 缓冲液, pH8.8。

加样 可将样品加于含 2.5% 丙烯酰胺的大孔胶内,现常用蔗糖溶液或 10% 甘油代替。取血清样品 0.2 毫升(预先稀释至 5% 蛋白浓度),25% 蔗糖 0.2

毫升, 0.004% 溴酚蓝溶液 0.1 毫升, 混匀备用。如采用酸性缓冲系统, 则示踪染料可改用亚甲基绿。将凝胶管上部水层倾出, 用刻度毛细管 (可用微量吸管烧制) 或 0.25 毫升注射器吸取配制好的样品溶液 10—25 微升 (0.025 毫升) 加入胶面, 再以少量电极缓冲液小心覆盖。一般控制纯样品加 10—20 微克, 粗样品约需 200 微克。

电泳 将已加样的各凝胶管, 紧密插入上槽底部的各个圆孔内, 上下槽分别加入硼酸 (或甘氨酸) 缓冲液 400 毫升, 连接电源, 上槽接负极, 下槽接正极, 如采用酸性缓冲液, 则将电极反接。通电时, 总电压 200—250 伏, 每管凝胶通过电流 3 毫安 (2—4 毫安) 观察 1—3 小时, 当指示剂接近管底时, 停止电泳, 取出凝胶管。

显色 先按下法自玻璃管内取胶条。用 5—10 毫升注射器, 装上 7 号细针头, 吸满水, 将针尖小心插入凝胶和管壁隙缝, 缓缓推入无离子水, 同时慢慢旋动玻管, 使针头沿着管壁逐渐深入, 胶条即可从管壁剥离滑出。凝胶浓度高于 15% 者, 可用甘油代替纯水, 效果更好。将胶条放入 0.5% 氨基黑染液中, 染色 1 小时以上, 然后移入 5% 醋酸中漂洗, 多次更换洗液, 直至无蛋白区带的底色脱净为止, 放置 5—7% 醋酸中保存, 以备鉴定或照相。

结果鉴定 以人血清蛋白为例, 经聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 在胶条上可出现 20 多个区带, 其中包括前白蛋白、白蛋白、 α_1 、 α_2 、 β_1 、 β_2 及 γ 等蛋白成份。各区带的分布顺序及命名, 据 Felgenhauer 报告列于表 3。

4. 应用实验示例

正常人血浆、正常人血清、肝癌病人血清、肝硬化病人血清、红斑狼疮病人血清以及提纯的人血清白蛋白、丙种球蛋白的聚丙烯酰胺电泳, 结果见图 9。

5. 讨论

1. 聚丙烯酰胺凝胶电泳已广泛用于分离血清、痰液、细菌提取液、病毒、酶蛋白。示例实验结果 (图 9) 表明, 聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱清晰, 环带分明, 无拖尾现象。正常人血清及人血浆可分出环带 20 个左右, 比上述醋酸纤维膜电泳及淀粉胶电泳有更高的分辨能力。病人血清各组分在图谱上的分布呈现异常现象。白蛋白纯品在图谱上出现多个环带, 可能代表分子大小不同的单体和聚合体或其他杂质, 丙种球蛋白中的几个环带, 可能代表 IgG, IgA, IgM 等不同的免疫球蛋白或其他残存的蛋白成份。

2. 关于实验条件方面

表 3 某些人血清蛋白的盘电泳分布
(凝胶 6%, 经特异染色、酶学及免疫学技术鉴定)

正极	前白蛋白
	酸性 α_1 糖蛋白
	白蛋白、 α_1 -抗胰蛋白酶
	GC-球蛋白、 α_1 X-糖蛋白、甲状腺激素球蛋白、缺血氨基酸 α_1 糖蛋白、 $Zn\alpha_2$ -糖蛋白、易沉淀 α_1 糖蛋白
	α_2 HS-糖蛋白、4.6S 后白蛋白、
α_1 脂蛋白	触珠蛋白 1-1、血凝酵素、铜蓝蛋白 (Ceruloplasmin)、 α -胰蛋白酶抑制剂
	运铁蛋白 (transferrin)
	未知区带
	单体触珠蛋白 2-1、溶纤维蛋白酶原 α_2 -神经氨基糖蛋白
	β_1 -A/C-球蛋白
	触珠蛋白
	触珠蛋白
免疫球蛋白 A	触珠蛋白、 β_2 糖蛋白
免疫球蛋白 G	触珠蛋白
	未知区带
	α_2 巨球蛋白
	触珠蛋白 S
负极	β -脂蛋白

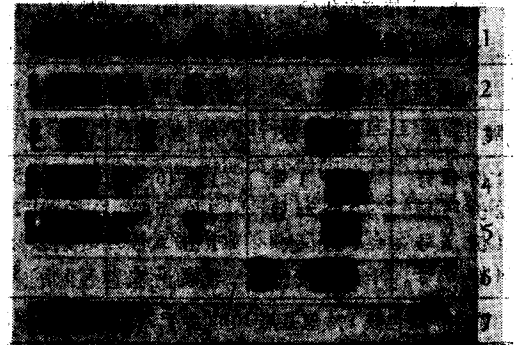


图 9 几种血清蛋白的聚丙烯酰胺电泳

1. 正常人血浆 2. 正常人血清 3. 肝癌血清 (γ 球蛋白降低, 在白蛋白与前白之间出现新成分) 4. 肝硬化血清 (γ 球蛋白升高) 5. 红斑狼疮血清 (γ 球蛋白升高) 6. 人血清白蛋白 7. 人血清丙种球蛋白

(1) 凝胶及缓冲液配制系统, 资料很多, 可以根据需要另行查选。本文仅列举表 4 供参考。

(2) 上述电泳室装置仅适于微量分析, 如欲制备纯品作进一步研究, 可以参照上述规格, 放大一定比例, 减少管数, 另作制备电泳装置, 并宜附加冷却系统。

(3) 有的作者采用利马素 (Remasol) 染料将样品

表4 凝胶电泳的几种通用凝胶系统

系统 I (pH 8.9—7%)			系统 II (pH 7.5—7.5)			系统 III (pH 4.3—15%)			系统 IV (pH 2.9—7.5)		
溶液号	组份/100 毫升	pH	溶液号	组份/100 毫升	pH	溶液号	组份/100 毫升	pH	溶液号	组份/100 毫升	pH
1	1N HCl 48.0 毫升 Tris 36.3 克 TEMED 0.23 毫升	8.9	15	1N HCl 48.0 毫升 Tris 6.85 克 TEMED 0.46 毫升	7.5	17	1N KOH 48.0 毫升 醋酸 17.2 毫升 TEMED 4.0 毫升	4.3	20	1N KOH 12.0 毫升 醋酸 53.25 毫升 TEMED 1.15 毫升	2.9
2a	丙烯酰胺 28.0 克 双丙烯酰胺 0.735 克		2	丙烯酰胺 30.0 克 双丙烯酰胺 0.8 克		8	丙烯酰胺 60.0 克 双丙烯酰胺 0.4 克		21	过硫酸铵 2.8 克	
3	过硫酸铵 0.14 克		16	1M H ₃ PO ₄ 39.0 毫升 Tris 4.95 克 TEMED 0.46 毫升	5.5	18	过硫酸铵 0.28 克		22	1N KOH 48.0 毫升 醋酸 2.95 毫升	5.9
4a	1N HCl ~48 毫升 Tris 5.98 克 TEMED 0.46 毫升	6.7				19	1N KOH 48.0 毫升 醋酸 2.87 毫升 TEMED 0.46 毫升	6.7			
5	丙烯酰胺 10.0 克 双丙烯酰胺 2.5 克	6.7									
6	核黄素 4.0 毫克										
7	蔗糖 40.0 克										
电极缓冲液: Tris 6.0 克 甘氨酸 28.8 克 加水至 1 升 使用: 10% 稀释液		8.3	电极缓冲液: 二乙基巴比妥 5.52 克 Tris 1.0 克 加水至 1 升		7.0	电极缓冲液: β -丙氨酸 31.2 克 醋酸 8.0 毫升 加水至 1 升 使用 10% 稀释液		4.5	电极缓冲液: 甘氨酸 28.1 克 醋酸 3.06 毫升 加水至 1 升 使用 10% 稀释液		4.0
电极: 上槽接负极⊖ 下槽接正极⊕			电极: 上槽接负极⊖ 下槽接正极⊕			电极: 上槽接正极⊕ 下槽接负极⊖			电极: 上槽接正极⊕ 下槽接负极⊖		
各溶液混合比			各溶液混合比			各溶液混合比			各溶液混合比		
隔层胶	分离胶		隔层胶	分离胶		隔层胶	分离胶		隔层胶	分离胶	
1 份 4a 号	1 份 1 号		1 份 16 号	1 份 15 号		1 份 19 号	1 份 17 号		1 份 22 号	4 份 20 号	
2 份 5 号	2 份 2a 号		2 份 5 号	2 份 2 号		2 份 5 号	2 份 8 号		2 份 5 号	2 份 2 号	
1 份 6 号	1 份 水		1 份 6 号	1 份 水		1 份 6 号	1 份 水		1 份 6 号	2 份 21 号	
4 份 7 号	4 份 3 号		4 份 7 号	4 份 3 号		4 份 7 号	4 份 18 号		4 份 7 号		

附注: 染色液 1% 氨基黑 10B (溶于 7% 醋酸); 洗脱液 7% 醋酸; 标准玻管: 长 65 毫米, 直径 5 毫米

预先染色, 这样可以立即观察凝胶电泳中各种蛋白质的区带分布。亦有将电泳后的胶板或胶条以考马斯蓝 (Coomassie blue) 或萘酚蓝黑 (naphthol blue black) 显色, 再用特制的光密度计进行测量, 可以定量分析各蛋白质组份的相对含量。

3. 近年来, 不少报道在聚丙烯酰胺凝胶电泳系统加入适量 (例如 0.1%) 十二烷基硫酸钠 (Sodium dodecyl sulfate, 简称 SDS) 为助溶剂 (或称解离剂) 可以测定生物高分子的分子量和研究复合蛋白质的单体 (Subunit) 性质, 并可获得环带明晰优美的电泳图谱,

据介绍方法简便, 效果满意。这是由于 SDS 这种阴离子去污剂具有解离复合组份系统 (聚集体) 和溶解生物材料的良好能力。不过在应用中要注意厂牌不同的 SDS 及 TEMED 催化剂量对结果的影响。

4. 聚丙烯酰胺凝胶电泳亦可用于免疫电泳分析。将样品先进行电泳后, 取出胶条, 横置玻璃板上, 按常规方法铺制免疫扩散琼脂板, 在胶条附近平行挖一扩散槽, 加入相应的抗体 (或相应抗原), 进行双扩散, 俟沉淀线出现完全后, 进行漂洗、干燥和染色, 即呈聚丙烯酰胺凝胶免疫电泳图谱。也有在制备凝胶管时, 在

管的中心固定一根细玻璃棒,按常规进行电泳后,小心取出玻璃棒,再向胶条空心管内注入含有相应抗体(或相应抗原)的琼脂,使在芯部进行免疫扩散。这种方法称为聚丙烯酰胺凝胶免疫芯电泳。

五、关于其他新技术

以上概述了区带电泳技术的主要进展及其基本原理,并简要介绍了醋酸纤维素膜电泳、淀粉凝胶电泳和聚丙烯酰胺盘电泳等实验方法。从设备、操作繁简和使用效果与价值来看,这三种方法各有特色。醋酸纤维素膜电泳较为简便,可望取代目前普遍采用的滤纸电泳法;盘电泳具有分子筛与电泳的双重作用,分辨能力显著提高;淀粉胶电泳则较适于分析分子较小或被裂解的蛋白质类样品。对于这些方法,尚应根据各实验室的具体需要和可能条件,在实践中进一步探索和选用。

此外,近年来出现的葡聚糖凝胶柱电泳、葡聚糖凝胶-夹层盘电泳以及凝胶等电聚焦电泳等新的分离技术,也都具有各自的特点。葡聚糖凝胶电泳的主要特点是具有较高的分子筛效应,易于制备小量纯品;夹层盘电泳是结合了葡聚糖与聚丙烯酰胺两种凝胶特点,有利于分离带电的大分子物质。至于凝胶等电聚焦电泳,是一个比较新颖的实验技术。等电聚焦的基本原理是基于两性化合物的分子在一个具有缓冲能力的pH梯度中,由于电场的作用,各种不同的化合物(例如蛋白质或氨基酸)相互分离,分别停集在与各自等电点相同的pH区带(见图10)。制备pH梯度的载体是两性电解质,常用的进口商品名称“Ampholine”(系瑞典LKB公司出品,国内也已有出品),它是各种分子大小不同的脂肪族多氨基-多羧酸类异构体和同系物的混合物,分子量介于300—1,000之间,具有各不相同的但又相互接近的等电点(pH3—10)和很强的缓冲能力。这种载体适量加入聚丙烯酰胺凝胶中进行盘电泳,即可产生一个pH梯度,使样品中的各种物质依据等电点的差异得以分离,常用于纯化、鉴定蛋白质,并可简易地测定等电点。

六、在临床检验和免疫生化工作中的应用

关于区带电泳在临床生理(病理)和免疫生化领域中的应用,国内外资料很多。大体涉及两个方面,一是对于血浆或血清的分离和鉴定;一是对于体液和相关物质的分离和鉴定。在临床检验工作中,应用区带电泳分析正常体液(包括血浆)的组成和病理标本的异常改变,研究疾病发生、发展和愈后的规律性,从而提高诊断能力和防治效果,已是众所熟知一种手段。例如,原发性肝癌病人血清中出现异常的甲胎蛋白;肝炎、肾炎、白血病、黑热病等患者血清往往出现非特异性的白蛋白降低,丙种球蛋白增高;在免疫球蛋白缺损性疾病中,由于免疫系统失常,往往出现恶性单细胞系免疫球蛋白血症(如多发性骨髓瘤、原发性巨球蛋白血症、重链病等)和低丙种球蛋白血症,骨髓瘤患者的尿中还出现一种电泳迁移率介于 β 和 γ 区的Bence Jones蛋白成份。另外,也有不少作者应用电泳法研究慢性支气管炎患者血中及痰中IgA和IgG的变化。在免疫生化工作中,区带电泳技术常用于分析免疫制品如免疫血清(类)毒素、血液制剂等的抗原成份及蛋白质的组成和含量;分析动物免疫过程中,血清蛋白组成的变化及抗体分布,从而探索免疫机制和优选提纯方法,改善制品质量等。

总之,区带电泳实验技术在临床医学、免疫学和生物化学等方面的用途非常广泛。不过,在某些实际工作中,为了求得更为完善的科学依据,往往还需要和免疫电泳、凝胶过滤或超速离心等新的分析技术联合使用,可以更为满意地达到实验目的。在今后,随着社会主义建设和医疗卫生事业不断发展的需要,关于这一技术领域必将达到更加完善的先进水平。(完)

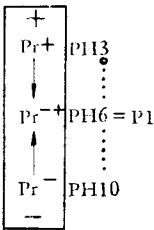


图10 等电聚焦示意图