

技术与方法

凝胶电泳的凝胶浓度和交联度的正确选择

聂 崇 兴

(湖南医学院寄生虫学教研室, 长沙)

提 要

本文总结了前人对凝胶结构的分析后, 提出在 PAGE 中, 对未知样品电泳宜先在 $C\% = 4\%$, $T\% = 5-10.5\%$ 的系列浓度分离胶, $C\% = 20\%$, $T\% = 3.5\%$ 的浓缩胶中作 Disc-PAGE, 选择该样品的最适分离胶浓度。再按此分离胶浓度作 Vertical-PAGE, 并在加样品量时作样品量的梯度, 找出加样品的最适量。然后重复多次, 以达到样品在 PAGE 中的最佳分辨率。

自从 Davis^[1] 应用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术 (PAGE) 成功地分析了人血清 20 多年以来, 此技术已成为分析蛋白质、酶和核酸这类复杂的大分子化合物的一种极为有力的工具。

用 PAGE 分析某种蛋白质、酶或核酸的混合物时, 影响分辨率的因素有许多, 如凝胶的浓度 ($T\%$)、交联度 ($C\%$)、样品量、凝胶和缓冲液的 pH 值、离子强度、电位梯度和电泳时间等, 任何一个发生改变, 均有影响。但其中以前两者影响最大, 故最为重要。因此正确地选择适合的凝胶浓度与交联度是 PAGE 实验成败的关键。

有关聚丙烯酰胺凝胶的 $T\%$ 和 $C\%$ 选择的专著国内尚不多见。莽克强等^[2]所介绍的基本配方——高 pH 不连续系统的分离胶 $T\%$ 可按实验需要在 $2.5-20\%$ 内选择, $C\% = 2.6\%$; 浓缩胶 $T\% = 3.1\%$, $C\% = 2.6\%$ 。此配方主要根据文献 [1], 该文所介绍的基本配方中, 分离胶 $T\% = 7.2\%$, $C\% = 2.6\%$, 浓缩胶 $T\% = 3.1\%$, $C\% = 20\%$, 至今仍作为经典配方为许多学者采用。

一、凝胶结构对分辨率的影响

近年来, 随着 PAGE 技术的发展, 对凝胶的性质也作了许多深入的研究。尤其是通过对不同的 $C\%$ 和 $T\%$ 的凝胶的电镜观察, 对凝胶结构有了更深入的了解^[3,4]。图 1 中的交叉有力

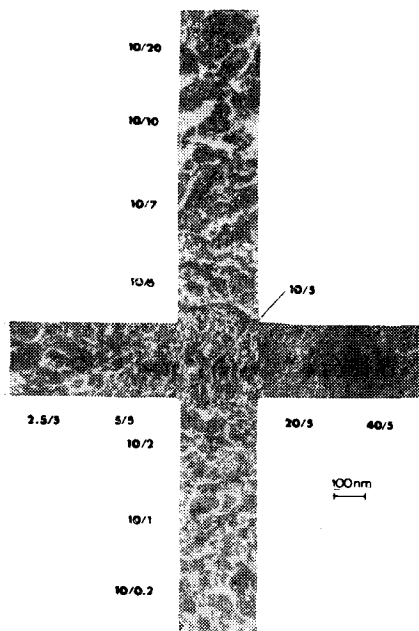


图 1 不同浓度 ($T\%$) 和不同交联度 ($C\%$) 的凝胶电镜照片

地阐明了凝胶结构的改变。横轴表示 C% 固定在 5% 时, T% 进行性增加引起凝胶结构的改变, 从稀的凝胶 (T% = 2.5%) 到高浓度的凝胶 (T% = 40%), 凝胶的分子筛孔径进行性的减小。纵轴显示的是当凝胶浓度固定在 T% = 10% 时, 改变不同的 C%, 凝胶结构的改变与横轴则完全不同, 在 C% 非常低 (0.2%) 和非常高 (20%) 时, 都可发现凝胶的大孔结构。这种分子筛孔径的改变接近于抛物线, 其孔径最致密处在 C% = 5% 左右。以前认为当 C% 固定在 5% 时, 分子筛的平均孔径达到最小值, 并以此作为控制孔径的一个依据, 用来提高凝胶的分辨率^[5,6]。实际上, 目前认为当凝胶的 C% = 5—7% 时, 凝胶对迁移率的大分子会产生极大的阻遏^[3,7-9]。作者也看到此现象当 C% = 5% 时, 电泳过程中电流在较短时间内减少到非常低的数值, 使电泳的时间显著延长, 表明这时样品中的大分子物质由于遇到了阻遏, 泳动得极其缓慢。

二、分离胶 C% 的选择

当选择合适的分离胶 C% 时, 即甲叉双丙烯酸胺 (Bis) 的量与丙烯酰胺 (Acr) 和 Bis 总量的比值 $\left(C\% = \frac{\text{Bis}}{\text{Acr} + \text{Bis}} \right)$ 适当时, 凝胶基质的经纬由 Acr 联结形成, 纬经由 Bis 联结形成, 平均链体密度在三维空间的任何方向都是一致的。凝胶选择在 C% = 2—4% 时, 即可达到这一目的。当选择的 C% 不合适时, 凝胶分子筛的聚丙烯酰胺链体变得粗、短, 链体编织的孔状可以呈环形, 甚或成球形, 孔径不一致, 形成所谓有缺陷的分子筛^[3]。样品在其中泳动时, 分辨率自然会降低, 并可能出现拖尾现象。

三、浓缩胶 C% 的选择

对浓缩胶而言, 最早由 Davis 推荐使用 C% = 20% 的凝胶^[1], 这种乳白色的凝胶具有较大的孔径, 使样品中的大分子物质很容易进入, 从而对样品起浓缩效应。据作者实验观察, 其浓缩效应比莽克强等所介绍的 C% = 2.6% 的浓缩胶为好。

四、分离胶 T% 的选择

样品在 C% 相同而 T% 不同时, 分离胶的分辨率也是不同的。对此, A. T. Andrews. 的结果在图 2^[10] 中能很好地给以阐明。有四种蛋白, 其中 A 和 B 为一组, B 比 A 的分子量大, 净电荷也较多, 在低浓度的分离胶 (T% = 5%) 中, 由于电荷效应明显, B 泳动较快, 位置在 A 之前。当凝胶浓度增加后, 分子筛效应增加, B 泳动逐渐变得迟缓。当凝胶浓度达到 9% 时, A 和 B 的相对迁移率一致, 二者就不能被分开。如继续增加凝胶浓度, A 和 B 又再度分离, 但是这时 A 的迁移率相对较大, 于是 A 反而泳动在 B 之前。在 C 和 D 这一组中, C 的分子量较 D 小, 又有较多的净电荷, 在低浓度分离胶中它们就能分开。随着浓度的增加, D 的相对迁移率进一步减小, 导致这两种蛋白的更大分离。图 2 表明, 分离任何一种混合蛋白, 仅用一种凝胶浓度都不能确定是否获得了最好的分离效果, 而只有将具有不同分子筛效应的一系列浓度的凝胶加以比较, 才能从中选择出最适的凝胶浓度。

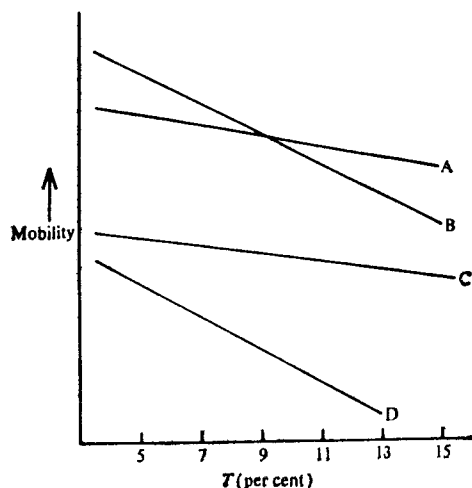


图 2 不同蛋白质在不同浓度凝胶中的相对迁移率

五、一种新配方的设计

根据以上规律, 我们摸索出一种新的配方, 即分离胶的 C% = 4% 的系列浓度, 浓缩胶的 T% = 3.5%, C% = 20%。经过反复实验, 效果满意。用该配方分离人血清, 和分离胶的 C% = 2.5% 的系列浓度比较, 在同一浓度

下,前者的分辨率高于后者。在 $C\% = 4\%$ 的系列浓度中, $T\% = 7\%$ 的区带最多,分辨率最高。(图 3-9 均见封三)因此,分离人血清以 $T\% = 7\%$, $C\% = 4\%$ 的效果最好。和浓缩胶 $T\% = 3.0\%$ 的比较,在 Disc-PAGE 中,无显著区别。但在作 Vertical-PAGE 时,抽梳板时, $T\% = 3.0\%$ 的浓缩胶太软,浓缩胶的梳齿容易塌陷;如改用 $T\% = 4.0\%$ 时,浓缩胶又太硬,抽梳板时,浓缩胶的梳齿又容易断裂;用 $T\% = 3.5\%$ 的浓缩胶,则以上两种缺陷均可避免。

六、操作程序

为此,我们设计出一个用 PAGE 测定未知样品的操作程序:

- 1. 先设定分离胶的 $C\% = 4\%$, 浓缩胶的 $T\% = 3.5\%$, $C\% = 20\%$;
- 2. 配制从 5.0~10.5% 的不同浓度 $C\% = 4\%$ 的分离胶作 Disc-PAGE, 浓度的递增率为 0.5%, 共 12 管。每管加相同量的待测样品, 电泳后, 根据染色的结果, 选出区带最多, 分得最开的一管, 以此管所用的凝胶浓度为最适凝胶浓度。
- 3. 以上述最适浓度作 Vertical-PAGE, 在

加样品量时作样品量的梯度。这种梯度的摸索, 可以由大到小重复多次, 找出各样品槽加样品的最适量。

4. 按第三步的结果, 再作正式试验。按实验设计与要求, 重复多次, 以达到自己实验的目的。

凝胶的配制:

A 液: 1NHCl 48ml, 加 Tris36.3g, 加蒸馏水至 100ml, pH8.9。

B 液: Acr28.8g, 加 Bis1.2g, 加蒸馏水至 100ml, 过滤后使用。

C 液: TEMED 0.2ml, 加蒸馏水至 20ml。

D 液: 1NHCl 48ml, 加 Tris6g, 加 TEMED 0.48ml, 加蒸馏水至 100ml, pH6.7。

E 液: Acr 11.2g, 加 Bis 2.8g, 加蒸馏水至 100ml, 过滤后使用。

F 液: 蔗糖 40g, 加蒸馏水至 100ml。

G 液: 过硫酸铵 70mg, 加蒸馏水至 5ml, 临用前配制。

H 液: 核黄素 1mg, 加蒸馏水至 25ml。

Disc-PAGE 凝胶配制:

1. 分离胶的配制(见表 1)

表 1 不同浓度分离胶中各试剂用量

试剂量 ml \ 浓度%	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	9.5	10.0	10.5
A 液	0.375	0.375	0.375	0.375	0.375	0.375	0.375	0.375	0.375	0.375	0.375	0.375
B 液	0.50	0.55	0.60	0.65	0.70	0.75	0.80	0.85	0.90	0.95	1.00	1.05
C 液	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
蒸馏水	1.825	1.775	1.725	1.675	1.625	1.575	1.525	1.475	1.425	1.375	1.325	1.275
G 液	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15

注: 体积为每管 3ml。

2. 浓缩胶的配制:

见 Vertical-PAGE 的浓缩胶的配制, 浓缩胶在管内高度为 1cm。

Vertical-PAGE 凝胶配制:

设凝胶板大小为 $140 \times 108 \times 1\text{mm}$ 。

1. 分离胶的配制:

体积为 12ml, $T\% = 7\%$, $C\% = 4\%$ 。

A 液 1.5ml, 加 B 液 2.8ml, 加 C 液 0.6ml, 加蒸馏水 6.5ml, 混匀后抽气 3 分钟, 加 G 液

0.6ml。

2. 浓缩胶的配制:

体积为 3ml, $T\% = 3.5\%$, $C\% = 20\%$ 。

D 液 0.375ml, 加 E 液 0.75ml, 加 F 液 1.5ml, 加 H 液 0.375ml。置日光灯管下, 光聚合半小时左右。

小 结

综上所述, 由于 PAGE 具有浓缩效应、电

场效应和分子筛效应,一般说来各种蛋白质、酶、核酸在电场中可以按其分子量的大小和净电荷的多少而被分离开来。但由于同一种生物的不同蛋白质,和不同种生物的相同蛋白质,它们的分子量不同和净电荷不尽相同。因此,用之于甲样品成功的经验照搬到用于分析乙样品不一定能获得同样的好效果。而应该按照上述的操作程序的四个步骤,正确地选择适合于自己实验的凝胶浓度和交联度,最大限度地提高样品在凝胶中的分辨率,从而使实验得到满意的结果。

参 考 文 献

- [1] Davis B. J.: *Annals N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404—427, 1964.
[2] 莽克强等:《聚丙烯酰胺凝胶电泳》, p. 31—40, 科学出版社, 1975。

- [3] Righetti, P. G.: *Isoelectric Focusing: Theory, Methodology and Applications*, P. 160—165 Elsevier Bio-medical Press. Amsterdam. New York. Oxford, 1983.
[4] Ruchel, R. et al. *Chromatogr.*, **166**, 573—575, 1978.
[5] 库珀, T. G. 著(徐晓利主译):《生物化学工具》, p. 184—220, 人民卫生出版社, 1980。
[6] Gordon, A. H.: *Electrophoresis of Proteins in Polyacrylamide and Starch Gels, in Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, (T. S. Work and E. Work, Eds) Vol. 1, Part North Holland, Amsterdam. 1971.
[7] Fawcett, J. S. and Morris, C. J.: *Separ. Sci.*, **1**, 9—20, 1966.
[8] Hjerten, S. Jersted, S. and Tiselius, A.: *Anal. Biochem.*, **27**, 108—115, 1969.
[9] Margolis, J. and Wrigley, C. W.: *J. Chromatogr.*, **106**, 204—210, 1975.
[10] Andrews, A. T.: *Electrophoresis: Theory, Techniques and Biochemical and Clinical Applications*, p. 7—10, Clarendon Press, Oxford, 1981.

[本文于 1986 年 3 月 12 日收到]



学术动态

中国科学院生物物理研究所举办 1986 年度学术年会

1986 年 12 月 23 日至 25 日,中国科学院生物物理研究所举办了该所 1986 年度学术年会,经各研究室推荐,共接纳研究、技术和开发工作的学术论文 31 篇。会上宣读了 4 篇综述报告和 19 篇学术论文,并组织了 3 个专题讨论会。

4 篇综述报告:

- 1.——生物大分子结构与功能研究的一些新进展——(邹承鲁)
- 2.——脑科学的新进展及发展趋势——(郭爱克)
- 3.——蛋白质工程研究概况——(雷克健)
- 4.——二维核磁技术与蛋白质三维结构——(华庆新)

宣读的 19 篇论文:

- 1*.——1,2 埃分辨率高精度胰岛素晶体结构研究
2. P. versicolor D-甘油醛-3-磷酸脱氢酶低分辨率 X 射线结构分析
3. 胰岛素 A、B 链在溶液中的相互作用
- 4**. 蝎毒神经毒素的一级结构研究
- 5*. 酶活性不可逆改变动力学
6. 核糖体小分子 RNA 的序列分析及相似性的比较
7. 酵母基因工程的研究
- 8*. 生物膜-硒·克山病-生物膜

- 9*. 莱氏衣原体膜脂及膜上 ATP 酶的分子性质
 10. 细胞重建的研究
 11. 蝨斯听觉信息加工的单细胞研究
 - 12*. 竹红菌甲素的光敏作用
 13. 苹果的辐射效应和辐射保藏研究
 14. 能学习与记忆的复合 Glia-Neuron 网络自动机——Spin glass 理论
 - 15*. 生物组织连续切片的计算机三维重建系统
 - 16*. CARY 219 紫外可见分光光度计酶动力学研究微机分析系统和微机化多功能伪随机点立体图对发生器
 17. 毫微秒荧光时间谱仪
 - 18*. 医用自动化分析仪临床诊断试剂盒的研制与生产
 19. 多维蛋白汽水的研制
- 3 个讨论会的专题是:

1. 生物工程(基因工程与蛋白质工程); 2. 人工智能; 3. 实验技术。

本次学术年会评出“优秀研究、技术、开发工作论文”8 篇(宣读论文目录中打*者)和青年进步奖论文 1 篇(打**者)。

(下转第 78 页)

《凝胶电泳的凝胶浓度和交联度的正确选择》 一文的附图

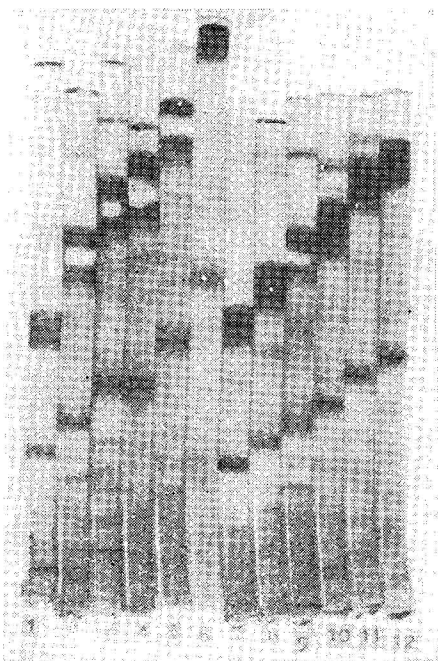


图3 人血清在不同 T% 和不同 C% 凝胶中的 Disc-PAGE (每管加入正常血清 5 μ l)

T%=7.5%	1	2	3	4	5	6
C%=2.5%						
C%=4%	7	8	9	10	11	12

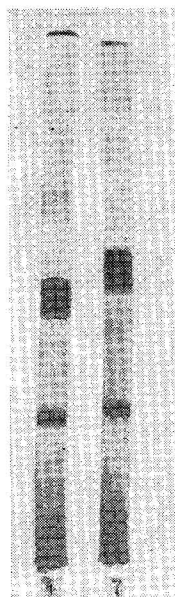


图4

1 T%=7.5% C%=2.5%
7 T%=7.5% C%=4%



图5

2 T%=7.0% C%=2.5%
8 T%=7.0% C%=4%

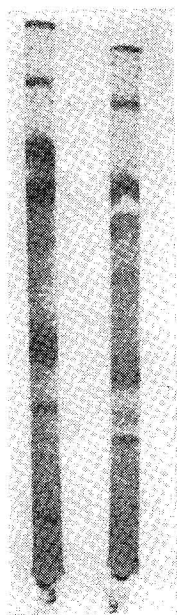


图6

3 T%=6.5%
C%=2.5%
9 T%=6.5%
C%=4%

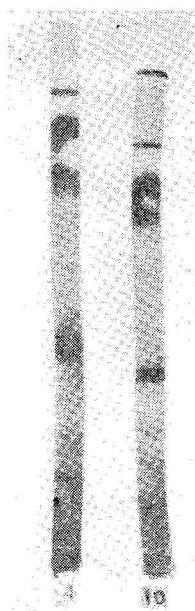


图7

4 T%=6.0%
C%=2.5%
7 T%=6.0%
C%=4%

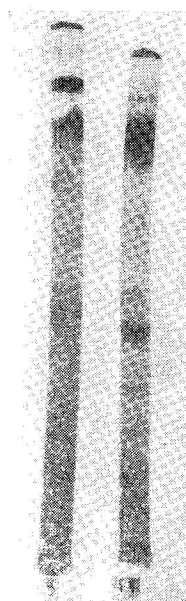


图8

5 T%=5.5%
C%=2.5%
11 T%=5.5%
C%=4%

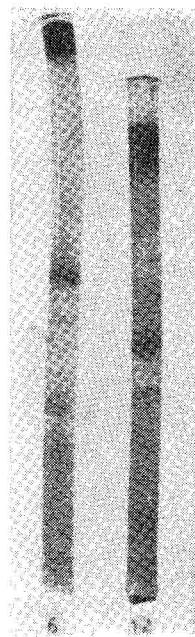


图9

6 T%=5.0%
C%=2.5%
12 T%=5.0%
C%=4%