

# 核糖核酸的聚丙烯酰胺凝胶电泳

中国医学科学院分院三室核酸白血病组

自从1959年报道了聚丙烯酰胺凝胶电泳以来,这种电泳方法已有了迅速的发展和广泛的应用。它与纸电泳、琼脂电泳、淀粉胶电泳等相比,具有更多的优点。例如:机械强度高、无色透明、纯度高;在很多种溶剂中不溶解、不带电荷,故没有造成污染的问题,也没有吸附作用和电渗作用;改变凝胶浓度和交联度,可以控制凝胶孔径的大小,从而制备出对不同样品达到最佳分离效果的凝胶。聚丙烯酰胺凝胶电泳所需的设备简单、样品使用量少、电泳时间短、操作方便;尤其是分离效果好、分辨能力高;加之又有所谓浓度梯度<sup>[1]</sup>和pH梯度即等电点聚焦方法<sup>[2]</sup>的改进,使其分辨率有了更进一步地提高,因此它在研究工作和临床检验中有很多用途。

应用聚丙烯酰胺电泳检定分离和制备各种核糖核酸已有不少值得参考的报道和综述<sup>[3,4,5]</sup>。本文仅就我们在核糖核酸凝胶电泳工作中的一些体会作一简介。

聚丙烯酰胺凝胶,是由丙烯酰胺和甲撑双丙烯酰胺在催化剂(包括加速剂 $\beta$ -二甲基胺基丙脒或N,N,N',N'-四甲基乙烯基二胺及引发剂过硫酸铵)作用下聚合而成的高聚化合物。其结构式可用图1表示。

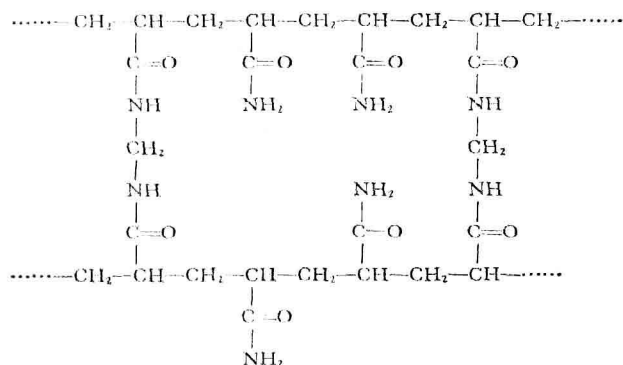


图1 聚丙烯酰胺凝胶结构示意图

显然,这种凝胶分子具有分子筛作用。当核糖核酸(以下简称RNA)分子或蛋白质分子在电场作用下通过凝胶时,由于不同种类的分子的净电荷数不同,尤其是由于不同种类的分子的大小和形状不同,因此泳动速度不同,从而达到分级分离的效果。

## 一、仪器

凝胶柱电泳仪包括:阴极缓冲液槽(其底部有五

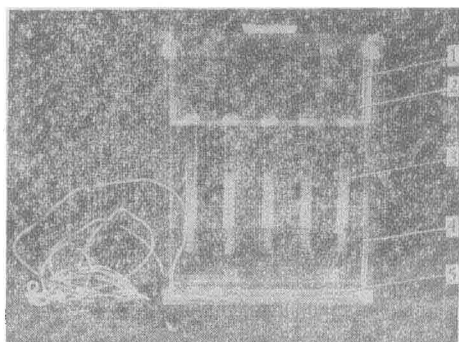


图2 聚丙烯酰胺电泳装置图

- 1——铂金丝电极(阴极); 2——阴极缓冲液槽;  
3——装胶柱的玻璃管; 4——阳极缓冲液槽;  
5——铂金丝电极(阳极)

个扣着橡皮环的圆孔);阳极缓冲液槽;铂金丝一对;五支长8—10厘米,内径0.5—0.8厘米的等长等内径的上下均匀的硬质玻璃管;电源用直流稳压装置。

其他设备还有分光光度计及一自制附件(图4),求积仪,微量注射器或微量吸管等。

## 二、试剂

- (1) 20%的单体母液(交联度5%)

称取重结晶的丙烯酰胺19.0克及甲撑双丙烯酰胺1.0克,蒸馏水溶解,稀释至100毫升。

- (2) 0.89M三羟甲基氨基甲烷(Tris)-0.89M硼酸-0.025MNa<sub>2</sub>-EDTA(乙二胺四乙酸二钠盐)缓冲液

称Tris 108.0克,硼酸55.0克,Na<sub>2</sub>-EDTA 9.3克,蒸馏水溶解,稀释至1000毫升,测其pH应为8.3。当用做电极槽内的缓冲液时,需再稀释10倍。

- (3)  $\beta$ -DMAPN(二甲基胺基丙脒)

- (4) 1.6%过硫酸铵溶液

称过硫酸铵0.16克,溶解于10毫升蒸馏水中。每周新鲜配制。

- (5) 含8%蔗糖及0.2%溴酚蓝的水溶液

称蔗糖8克,溴酚蓝0.2克,溶解于100毫升蒸馏水中。

- (6) 0.2%甲烯蓝染液

称取 0.2 克甲烯蓝, 溶解于 100 毫升 pH 4.7 的 0.4M 醋酸-醋酸钠缓冲液中。过滤后使用。

#### (7) 1M 醋酸溶液

量取 58.08 毫升 98% 的醋酸, 加蒸馏水至 1000 毫升。

以上试剂皆为“分析纯”。配制后的溶液均置冰箱中备用。

## 三、实验操作

### 1. 凝胶柱的制备

将洗净烤干的玻管垂直插入阴极缓冲液槽底部的橡皮环中, 用乳胶膜和乳胶圈严密封闭玻管下口。

从冰箱中取出溶液 (1)、(2)、(3) 及 (4), 把温度平衡至室温。在一小三角瓶中依次加入液 (1) 2.25 毫升, 液 (2) 1.5 毫升, 液 (3) 0.06 毫升, 蒸馏水 10.25 毫升, 混匀, 加入液 (4) 0.94 毫升, 迅速混匀, 用吸管分装于五支玻管的同一高度处; 然后用一支尖端很细的吸管吸取蒸馏水, 沿玻管内壁轻轻将水挤出, 使水缓缓流下覆盖于凝胶溶液的液面上, 此时, 切勿搅动凝胶溶液。覆盖此水层的目的有二, 一是使凝胶溶液与空气隔绝, 排除空气中的氧气对凝聚作用的抑制作用; 二是消除凝胶溶液顶部的弯月面, 使形成的凝胶柱具有平坦的表面。在 20℃—30℃ 下静置半小时, 聚合作用完全后, 取下乳胶膜。这样制成的凝胶, 浓度 3%, 交联度 5%, pH 8.3。

对于分离分析分子量高的 RNA, 例如细胞核 RNA 的某些高分子组份 (以下简称 nRNA), 必须采用孔径更大, 即浓度更稀的聚丙烯酰胺凝胶。但这种低浓度的凝胶非常柔软, 甚至根本不能凝聚成形, 因此给操作带来很大困难。Peacock 氏等 (1968)<sup>[4]</sup> 加入适量琼脂糖于此种很稀的凝胶溶液中, 大大增强了凝胶的机械强度, 便于操作, 并且仍能起到分子筛的作用, 取得了满意结果。我们制备 0.3% 琼脂糖-2.0% 聚丙烯酰胺凝胶的方法是: 将玻管下端用乳胶膜封严后, 注入 40% 的蔗糖溶液至同一高度。称取琼脂糖 33 毫克, 加于 8.06 毫升蒸馏水中, 100℃ 回流半小时, 用 35℃ 温水使降温至 35—40℃; 将 2% 的单体母液即液 (1) 1.1 毫升, 缓冲液即液 (2) 1.1 毫升及液 (3) 0.05 毫升混匀, 水浴中加温至 35℃ 后, 与上述琼脂糖液混合, 再加入液 (4) 0.69 毫升, 迅速混匀, 分装于五支玻管的浓蔗糖液之上 (勿搅动), 至液面凸出玻管上口为止。20—30℃ 下静置 1 小时, 使凝聚作用完全。预电泳前, 将玻管倒置, 取下乳胶膜, 倾出蔗糖液, 用少许缓冲液 [即将液 (2) 稀释十倍] 冲洗两次, 则在原蔗糖液与凝胶交界处出现平整的凝胶平面, 供铺样之用。玻管下端包上一小片玻璃纸, 以防此种凝胶柱滑出管外。放好玻管, 便可进行预电泳了。

### 2. 预电泳

将液 (2) 稀释十倍, 在两个电极槽中各加入 250 毫升。排除凝胶柱上端和下端滞留的气泡, 接通电源, 使每只凝胶柱通过的电流为 3 毫安。预电泳在冷室中进行一小时左右。

### 3. 铺样

RNA 样品溶液的配制, 要考虑到以下几个方面: 为使之具有便于观察到的颜色及足够的密度, 要加入适当体积的溴酚蓝-蔗糖溶液; 样品总体积不宜过大; RNA 浓度不要太稀, 使每只凝胶柱铺样 5—10 微升, 含 RNA 10—60 微克。加样用微量吸管或微量注射器, 吸取适当体积的样品, 穿过阴极槽中的缓冲液, 使其尖端迅速而准确地到达玻管中凝胶平面上方约 2—3 毫米处, 将样品溶液小心缓慢地吹出, 则被加密了的样品便沉降在凝胶柱表面上, 形成一层。勿将气泡吹出, 以防搅动。轻轻取出微量吸管, 放置好负电极, 便可进行电泳了。

### 4. 电泳

接通电源, 电泳在与预电泳相同的条件下进行约一小时, 当蓝色的溴酚蓝区带泳动到距离玻管下端还有约 3 厘米时, 电泳停止。在浓度小于 3% 的聚丙烯酰胺凝胶中, 4S RNA 较溴酚蓝泳动得快。

### 5. 呈色

倾出阴极槽中的缓冲液 (缓冲液可重复使用一至二次, 但两个槽内的缓冲液要分别保存使用, 不可混淆) 拔下玻管, 用装在注射器上的 24 号细长针头, 沿管内壁小心插入凝胶与管壁交界处, 边注入蒸馏水, 边转动玻管, 并使针头逐步深入, 直至凝胶柱滑出。2% 聚丙烯酰胺-0.3% 琼脂糖凝胶柱极易滑出。先将凝胶柱在 1M 醋酸中浸泡不少于 15 分钟, 然后在甲烯蓝染液中染色 1 小时或更长时间。多余染料用蒸馏水多次漂洗; 也有用通电的方法除去的, 即所谓“电脱色”, 后一方法的优点是脱色快, 但最大的缺点是较弱的带的颜色也被脱掉。用蒸馏水浸洗的方法, 虽时间较长 (20℃ 时需 12 小时左右), 但弱的区带的颜色也可保留。因此工作中具体采用哪种方法, 需视要求和条件而定。

### 6. 保存和记录

(1) 如果染液是新配的或仅用过少数几次的, 则呈色后的凝胶柱, 在有蒸馏水的带塞试管中, 较长的时间内仍保持清晰的图谱。

(2) 用普通照相机加一黄色滤光片, 可获得满意的摄影记录; 还可以不用照相机, 直接在晒图纸上印相<sup>[6]</sup>。

## 四、应用举例

### 1. RNA 制品的检定分析

图 3 是用浓度为 3%、交联度为 5% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳, 分离我们提取的大肠杆菌转移核糖核酸 (tRNA) 和酵母 tRNA 的照片。在大肠杆菌 tRNA 提

RNA。

### 3. 测定未知 RNA 组份的分子量 (或 S 值)

在琼脂糖-聚丙烯酰胺凝胶中与在单纯的聚丙烯酰胺凝胶中一样,不同分子量的 RNA 泳动度(单位时间内,在单位电势梯度下所泳动的距离)与各该组份 RNA 分子量 (或 S 值)成直线关系<sup>[4,9]</sup>。根据这一关系我们测定了几种 RNA 样品中未知组份的分子量。

图 6 表明,大鼠肝胞浆 RNA 的三个主要组份的 S 值的对数,与其泳动速度成一直线关系。

我们用稍加改变的双去污剂法<sup>[10]</sup>从 L-2 腹水型网织瘤细胞中提取胞浆 RNA (cRNA) 和细胞核 RNA (nRNA) 样品,与做为标准的大肠杆菌 tRNA 样品 (已知后者的三个组份为 23S, 16S 和 4S RNA), 在完全相同的条件下,用 0.3% 琼脂糖-2% 聚丙烯酰胺凝胶,

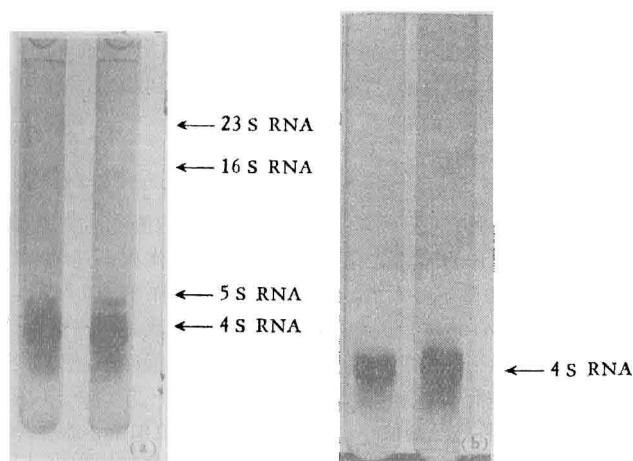


图 3 大肠杆菌 tRNA (a) 和酵母 tRNA (b) 的聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

电泳条件: 电压 100 伏; 电流 15 毫安; 4°C 进行 (a) 80 分钟, (b) 90 分钟; 凝胶浓度 3%; 交联度 5%; 点样量 (a) 34 微克/支, (b) 46 微克/支

取中<sup>[7]</sup>, 酚抽提液未经 1M NaCl 沉淀, 就直接用 DEAE 柱分离制得, 而在提取酵母 tRNA 时, 酚抽提液先经 1M NaCl 沉淀, 再用 DEAE 柱分离。从照片可见, 在大肠杆菌 tRNA 电泳图谱中, 除主要的 4S RNA 区带外, 还有少量的 5S RNA, 及隐约可见的痕量的 23S 和 16S RNA; 而在酵母 tRNA 的电泳图谱中, 就只见到 4S RNA 区带。说明后者纯度较高。这显然与抽提方法不同有关。所以, 凝胶电泳可用来检定核酸制品的纯度。

### 2. 核糖核酸样品组成成分的分析

我们用酚法提取大鼠肝胞浆 RNA<sup>[8]</sup>, 用浓度 3%, 交联度 5% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离呈色后, 把凝胶柱装在一个长方形小玻璃槽中, 后者被固定在自制附件 (图 4) 的游尺中, 转动附件的旋钮可使游尺每次

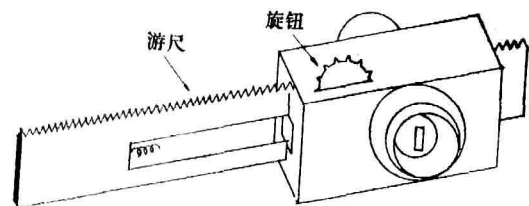


图 4 可安装在分光光度计上的自制附件

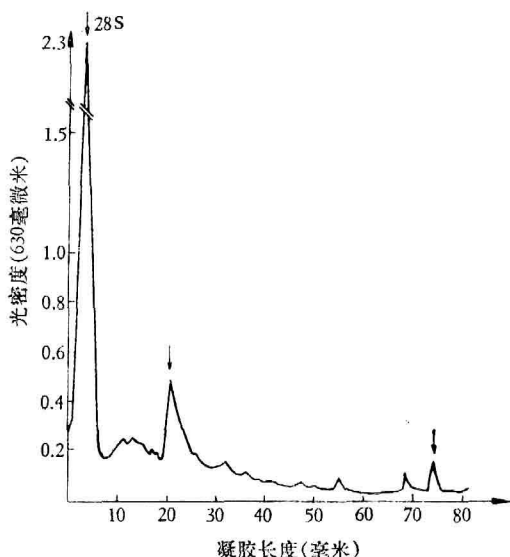


图 5 大鼠肝胞浆 RNA 的电泳图谱

最少横移 0.5 毫米。将附件安装在分光光度计出光狭缝与光电池之间, 测定 630 毫微米的光密度。以光密度为纵坐标, 凝胶柱上各点到原点的长度为横坐标作图, 如图 5。每种 RNA 成分的含量可用与其对应的峰的面积来表示。因此, 用求积仪可算出各 RNA 成分的百分含量。图 5 显示出大鼠肝胞浆 RNA (cRNA) 中主要有 28S, 18S tRNA 和 4S RNA, 与蔗糖密度梯度超速离心的结果是一致的, 此外还有几个少量的其它的

同时进行电泳, 呈色后 (见图 7), 测量并计算出各区带 RNA 的泳动度, 在半对数坐标纸上, 先根据大肠杆菌三个组份的 S 值与泳动度, 划出一条“标准直线”, 然后根据各未知组份的泳动度, 便可从“标准直线”上查到其对应的 S 值或分子量 (图 8)。cRNA 样品主要组份是 28S、18S 和 4S RNA; nRNA 样品中主要有 69—70S, 33S, 28S, 18S 和 4S RNA, 还有少量 45S 和 38S RNA。

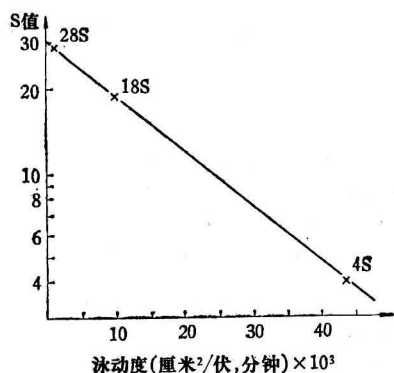


图6 大鼠肝胞浆 RNA 中三个主要成分的 S 值与其泳动度的关系 (电泳条件略)

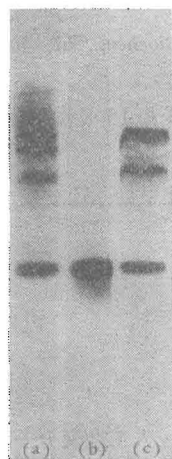


图7 L-2 小鼠腹水细胞的 nRNA(a) 和 cRNA(c) 及大肠杆菌 tRNA(b) 样品的电泳图谱

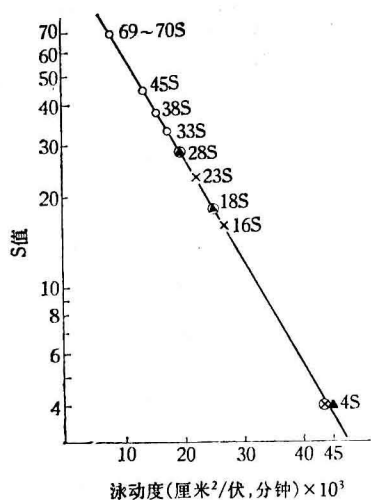


图8 L-2 网织腹水细胞的各种 RNA 与其泳动度间的关系

×——大肠杆菌 tRNA 组分; ▲——L-2 腹水细胞 cRNA 组分; ○——L-2 腹水细胞 nRNA 组分

## 五、影响聚丙烯酰胺凝胶电泳分离效果的几个因素

### 1. 凝胶浓度

假设 100 毫升单体母液或凝胶溶液中含丙烯酰胺  $a$  克, 含甲撑双丙烯酰胺  $b$  克, 则此溶液的浓度就是百分之  $(a+b)$ , 即  $(a+b)\%$ ; 交联度则表示为  $\frac{b}{a+b} \times 100\%$ 。低浓度的凝胶, 其孔径较大, 适于分离高分子量的 RNA; 随着浓度的增加, 高分子量的 RNA 的泳动速度降低更甚, 甚至根本不能进入凝胶中去。例如凝胶浓度  $>3\%$  时, 28S RNA 即被排除在外。相反低分子量的 RNA 只有在较高浓度的凝胶中才有好的分离效果。因此, 要根据样品的分子量范围,

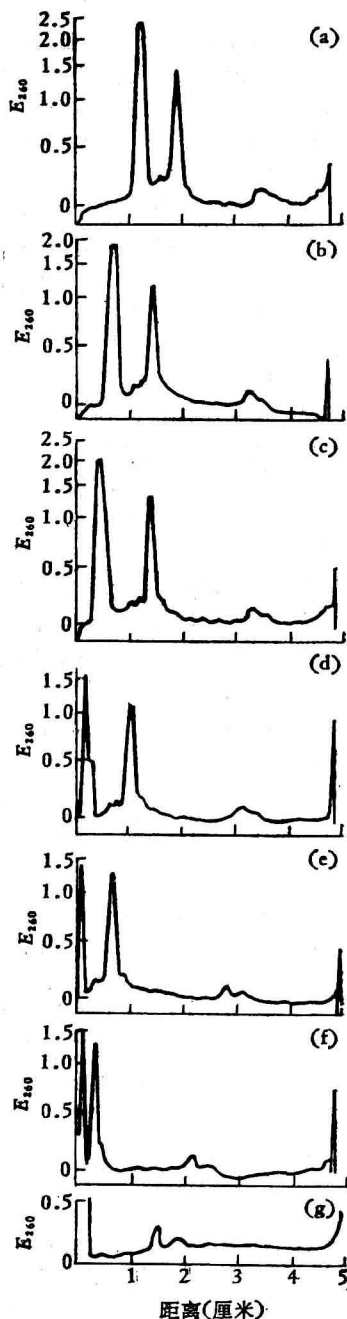


图9 凝胶浓度对电泳分离效果的影响  
凝胶浓度 (a)2.2% (b)2.4% (c)2.6% (d)3.0% (e)3.5% (f)5.0% (g)7.5%

选择凝胶的浓度与交联度, 以期取得最佳分离结果。Loening (1967)<sup>[31]</sup> 曾用浓度依次为 2.2%, 2.4%, 2.6%, 3.0%, 3.5%, 5.0%, 7.5% 等几种凝胶分离分析同一个 RNA 样品(网织细胞 RNA), 得到如图 9 所示的结果, 与上述的讨论是一致的。

### 2. 试剂的影响

配制凝胶所用的几种试剂的纯度,对电泳分离效果影响颇大。故两种单体均须重结晶后再用<sup>[1]</sup>。缓冲液和染液中如有不溶物存在,皆应先行过滤除去。试液(1)、(2)、(3)、(4)应贮放于低温避光处,但不宜放置过久(不超过二个月)。过硫酸铵则应每周新鲜配制。

### 3. 缓冲系统的影响

我们曾比较过两种缓冲液系统(0.4 M Tris-0.2 M NaAc-0.02 M Na<sub>2</sub>-EDTA, pH 7.8 及 0.89 M Tris-0.89 M 硼酸-0.025 M Na<sub>2</sub>-EDTA pH 8.3) 使用前者,得到的色带松散,模糊变宽;用后者,则色带窄细清晰,提高了分辨效果。

### 4. RNA 样品纯度

RNA 样品中未除尽的杂质(如蛋白质,多糖等)皆可能造成区带模糊,拖尾,底色洗不清,甚至有的带被歪曲等现象。因此,改进样品提取方法,努力提高其纯度是十分重要的。

### 5. 铺样量

如果铺样量过多或体积过大,都会影响分离效果。我们认为,每个凝胶柱铺样 10—60 微克,体积 5—30 微升为宜。样品纯度高时,铺样量可适当放大,仍能取得好的分离效果。

(上接第 57 页)

## 五、结 束 语

血红蛋白的分子杂交技术虽然建立不久,但它已广泛地应用于这种蛋白质的许多研究领域,得到不少成果。分子杂交开始于血红蛋白,现在已延伸到其他蛋白质、酶和核酸。不过,我们对血红蛋白分子杂交的认识并没有完结。目前看来,血红蛋白不仅在人工条件下可以杂交,就是在自然的生理条件下也能发生亚单位的交换,它们的过程和关系可归纳成(7)式:

$2\alpha\beta\alpha'\beta'$ ……天然杂交分子

(上接封3)

附表 4 K 组(包括对照组)比较用 t 值表 ( $df \rightarrow \infty$ )

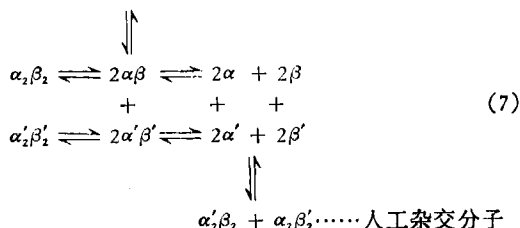
|    | $t_{0.05}$ | $t_{0.01}$ |
|----|------------|------------|
| 2  | 1.96       | 2.58       |
| 3  | 2.21       | 2.79       |
| 4  | 2.35       | 2.92       |
| 5  | 2.44       | 3.00       |
| 6  | 2.51       | 3.06       |
| 7  | 2.57       | 3.11       |
| 8  | 2.61       | 3.15       |
| 9  | 2.65       | 3.19       |
| 10 | 2.69       | 3.22       |

其它,如电泳需在低温环境下进行,串流电压要稳定以及精细的操作等,对于得到好的能重复的结果,也是必要的。

## 参 考 资 料

- [1] Slater, G.: *Fed. Proc.*, 24, 225, 1965.
- [2] Dale, G. et al.: *Lancet.*, 1, (7547), 847, 1968.
- [3] Loening, U. E.: *Biochem. J.*, 102, 251, 1967.
- [4] Peacock, A. C. et al.: *Biochem.*, 7, (2), 668, 1968.
- [5] Watcher, R. et al.: *Methods in Enzymol.*, XXI, part D, p. 167.
- [6] Pollard, D. et al.: *Anal. Biochem.*, 42, 286, 1971.
- [7] Zubay, G.: *J. Mol. Biol.*, 4, 347, 1962.
- [8] Kirby, K.: *Methods in Enzymol.*, XII, Nucleic Acid, part B, p. 87.
- [9] Bishop, D. H. L. et al.: *J. Mol. Biol.*, 26, 373, 1967.
- [10] Athuton, K. et al.: *Anal. Biochem.*, 57, 403, 1974.

[本文于 1975 年 3 月 15 日收到]



人工分子杂交的机制尚未完全弄清,但是,可以相信,随着分子杂交理论的深入和其应用面的扩大,这一问题会很快得到解决。天然分子杂交是最近才逐步产生的新知识,估计今后它会解决更多理论和实践中的问题。

## 参 考 资 料

- [1] 中国科学院数学研究所统计组编: 常用数理统计方法, 科学出版社, 1973.
- [2] 中国科学院数学研究所概率统计室编: 常用数理统计表, 科学出版社, 1974.
- [3] Steel, R. G. D. & Torrie, J. H.: *Principles and procedures of statistics*, 1960.
- [4] 王广仪: 简易医用数理统计方法初稿, 吉林省医学科学情报室、吉林医大科研处编: 《学术活动资料》, 1964.

(待续)