

经验交流

平板恒压式 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

陈曦 陈兰英

(中国医学科学院心血管病研究所生化研究室,北京)

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 作为分离分析生物大分子的有效手段已广泛应用于生物科学研究及医学临床工作中。国内文献所见 SDS-PAGE 分离蛋白质常用圆盘式管状电泳^[1-3]。近年来板状电泳逐渐增多,其中多为板状恒流方式^[4,5],采用板状恒压^[6]者不多。本实验室采用垂直平板恒压式 SDS-PAGE 分析了粗制肌浆网 (CSR) 蛋白,获得良好结果。

试剂及仪器

CSR 由本实验室从兔骨骼肌制备。 β -半乳糖苷酶和乳酸脱氢酶;牛血清白蛋白和卵清蛋白;溶菌酶和四甲基乙烯二胺 (TEMED); 丙烯酰胺、三羟甲基甲烷 (Tris) 和考马斯亮蓝 G250 分别为 Mannheim、Phar-

macia、Sigma 和 Fluka 产品。十二烷基硫酸钠 (SDS) 系重结晶品。其余试剂均为北京化工厂分析纯级产品。电泳槽和电泳玻璃板由本实验室自制。DY-W2 型电泳仪和 SH-1 型中压电泳仪分别由北京试验设备厂和北京新技术研究所制造。

实验操作

参考 Laemmli^[7] 方法,先将 24 及 10 毫升胶液在夹层玻璃板中制成分离胶 (长 \times 高 \times 厚=11.0 \times 9 \times 0.2 厘米)和浓缩胶 (长 \times 高 \times 厚=11.0 \times 4 \times 0.2 厘米),浓缩胶需当日新鲜配制,并于浓缩胶中插入梳状有机玻璃薄片,待胶凝固后取出薄片,形成样品槽 (长 \times 高 \times 厚=0.5 \times 2.5 \times 0.13 厘米)。

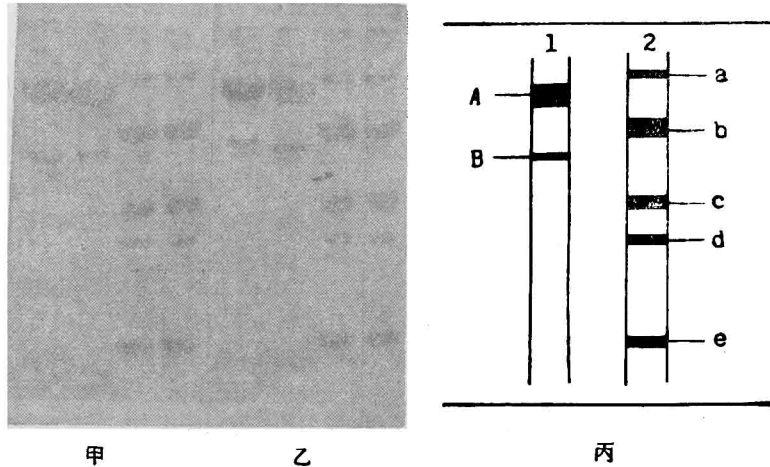


图1 恒压、恒流不同条件下 SDS-PAGE 比较
甲: 恒压 乙: 恒流 丙: CSR 及标准蛋白的 SDS-PAGE 图谱示意图

- (1) CSR
 - A: CSR-A 蛋白带
 - B: CSR-B 蛋白带
- (2) 标准蛋白
 - a. β -半乳糖苷酶(116,000)
 - b. 牛血清白蛋白(67,000)
 - c. 卵清蛋白(43,000)
 - d. 乳酸脱氢酶(35,000)
 - e. 溶菌酶(14,300)

表 1 胶液成分

	胶浓度	交联度	缓冲液	SDS	过硫酸铵	TEMED
分离胶	10%	2.6%	0.375M Tris-HCl pH8.8	0.1%	0.05%	0.1%
浓缩胶	6%	2.6%	0.125M Tris-HCl pH6.8	0.1%	0.1%	0.15%

将含有 β -半乳糖苷酶、牛血清白蛋白、卵清蛋白、乳酸脱氢酶和溶菌酶各 20 微克的标准蛋白溶液及 50 微克 CSR 置于样品槽中。以 0.025M Tris-0.192M 甘氨酸(内含 0.1% SDS) pH8.3 的缓冲液为电泳缓冲系统,在冰浴下分别作恒流(26 毫安)或恒压(360 伏)垂直平板电泳。电泳 4 小时左右,取出凝胶,用考马斯亮蓝 G250 显色^[9]。

CSR 经 SDS-PAGE 分析,获得主带 A, 测其分子量 99,000, 另有一较明显的蛋白带 B, 分子量为 66,600。此外尚有微量的其它蛋白带(图 1)。据文献报道^[9],骨骼肌 CSR 含有 4 种主要蛋白,其中分子量为 100,000 的 Ca-ATPase 含量占 60—80%。我们的实验结果表明,本室自制的 CSR 所含主要蛋白(主带 A)即为 Ca-ATPase, 所测分子量与文献报道值十分接近。可见上述平板型 SDS-PAGE 分离分析方法结果可靠。

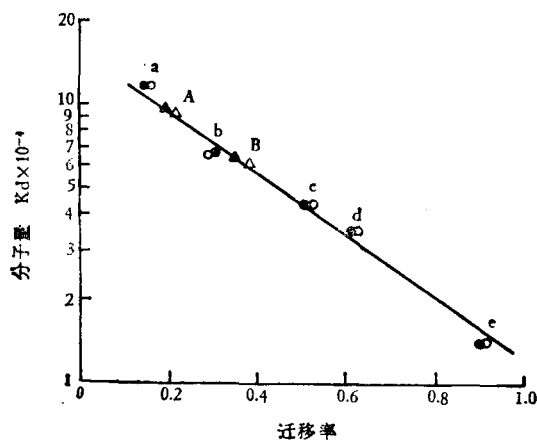


图 2 SDS-PAGE 测定 CSR 分子量

●——● 标准蛋白恒压 ▲——▲ 样品恒压
○——○ 标准蛋白恒流 △——△ 样品恒流
A、B、a、b、c、d、e 同图 1

平板电泳条件均衡,适于多种实验样品的对照比较。采用平板电泳,由于其凝胶厚度薄,便于使用高压,缩短电泳时间,减少样品扩散。此外,薄板电阻大,电流小,还可降低对电泳仪输出电流值的要求。这点对于无高电流输出电泳仪的实验室更有意义。平板电泳较管状电泳还有操作简便、取胶容易,原标本易保存等优点。

实验中,我们同时比较了控制恒压与控制恒流对蛋白质分离的影响。图 1 甲、乙两图中 CSR 均含两条主要蛋白带。恒压与恒流两方法测得 Ca-ATPase 分子量分别为 99,000 和 95,000(图 2),可见两方法的分辨率和灵敏度相近,说明控制恒压与恒流,其电泳结果相同,这与 Takacs^[10] 结果一致。目前,国产电泳仪多只有恒压装置。近年来有些厂家试制了配有恒流装置的电泳仪,但尚未批量生产。而且,由于电路设计复杂,特别是高压高电流稳流对元件质量要求较高等原因,仪器价格昂贵,性能不易稳定。根据国内实验条件,尤其是中、小型生化实验室,进行 SDS-PAGE 采用平板恒压似更相宜。

参 考 文 献

- [1] 林志新等:《生物化学与生物物理学报》, 15, 307, 1983.
- [2] 甘午君等:《生物化学与生物物理进展》, 1, 59, 1984.
- [3] 张宗玉等:《生物化学与生物物理进展》, 2, 45, 1984.
- [4] 蒋传葵:《生物化学与生物物理进展》, 2, 69, 1984.
- [5] 梅百根等:《生物化学与生物物理学报》, 16, 440, 1984.
- [6] 张向明:《生物化学与生物物理进展》, 3, 63, 1983.
- [7] Laemmli, U. K.: *Nature*, 227, 680, 1970.
- [8] 李成文等:《生物化学与生物物理进展》, 6, 71, 1983.
- [9] Tada, M. et al.: *Physiological Reviews*, 58 (No. 1), 1, 1978.
- [10] Takacs, B.: *Immunological Methods*, 81, 58, 1979.

【本文于 1985 年 9 月 18 日收到】