

第三章 电泳技术

实验十二 聚丙烯酰胺凝胶净电荷电泳—— 乳酸脱氢酶同工酶的鉴定

概述

带电颗粒在电场的作用下,向着与其电性相反的电极方向移动,这种现象称之为电泳(electrophoresis)。1959年,S. Raymond 和 L. Weintraub 最早建立了利用聚丙烯酰胺凝胶作为支持介质的区带电泳方法即聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)。聚丙烯酰胺凝胶在一定浓度范围内机械性能好,电渗作用小,化学惰性强,具有良好的分子筛效应,电泳结果具有很好的重复性,已成为目前生化实验室最常用的支持介质。聚丙烯酰胺凝胶净电荷电泳是对天然状态生物大分子进行分离的电泳,保持了蛋白质的天然构象及其生物学活性。本实验利用聚丙烯酰胺凝胶净电荷电泳对乳酸脱氢酶同工酶进行电泳分离,用酶活性染色液对乳酸脱氢酶进行定位染色。

实验目的

学习聚丙烯酰胺凝胶净电荷电泳的基本原理,了解有关乳酸脱氢酶同工酶的知识及活性染色鉴定法的原理,掌握垂直板聚丙烯酰胺凝胶连续电泳分离技术。

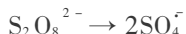
实验原理

聚丙烯酰胺凝胶是由单体丙烯酰胺(acrylamide, Acr)和交联剂 N,N'-亚甲基双丙烯酰胺(N,N'-methylenebisacrylamide, Bis)在催化剂和加速剂作用下聚合交联而成的三维网状结构的凝胶。凝胶的聚合作用通常是使用能提供游离基的催化-氧化还原体系来完成,是化学或光化学反应过程。实验室常用过硫酸铵[ammonium persulfate, (NH₄)₂S₂O₈, AP]或核黄素(riboflavin 或 vitamin B₂, C₁₇H₂₀O₆N₄)来引发这个反应过程,N,N,N',N'-四甲基乙二胺(N,N,N',N'-tetramethyl ethylenediamine, TEMED)作为加速剂。以 AP-TEMED 化学催化体系为例,TEMED 是一种脂肪族叔胺,分子式为:

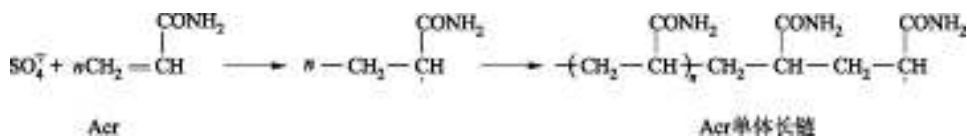


它的碱基可催化溶液中的 AP 使其形成游离氧自由基,激活 Acr 单体形成单体长链,同时在交联剂 Bis 的作用下长链彼此交联聚合成凝胶,反应式如下:

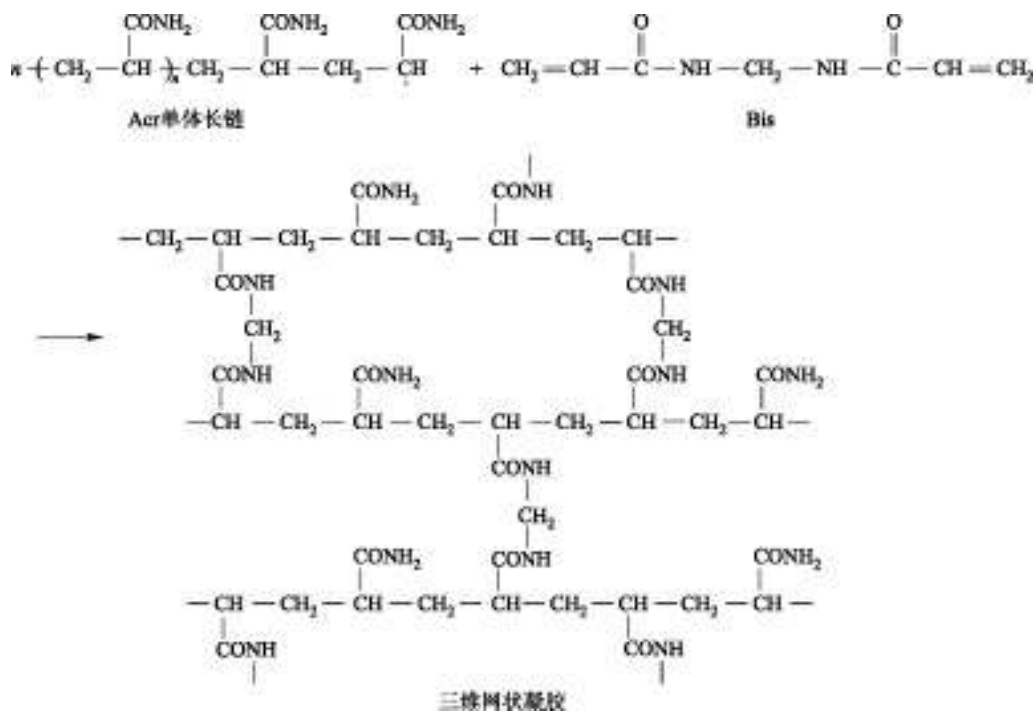
(1) TEMED 催化 AP 生成硫酸自由基:



(2) 硫酸自由基的氧原子激活 Acr 单体并形成单体长链:



(3) Bis 在单体长链间连成网状结构:



凝胶的聚合反应受各种因素的影响,如系统中催化剂和加速剂的浓度、pH、温度、分子氧和杂质都会影响凝胶的聚合过程。AP 和 TEMED 浓度的增加可缩短凝胶的聚合时间,但使用过量的 AP 和 TEMED 在电泳时会引起烧胶和蛋白质条带的畸变,所以在实际操作中应选择合适的浓度使聚合时间控制在 30 ~ 60 min 内较好。TEMED 只能以游离碱的形式发挥作用,所以在碱性条件下,叔胺才能引发 AP 产生自由基,使凝胶正常聚合。温度也是影响凝胶特性的重要因素,在 25 ~ 35℃ 条件下聚合的凝胶透明且有弹性,若温度高,聚合速度加快,导致凝胶聚合不均匀。所以聚合的速度会影响交联孔径的大小,若要获得较好的聚焦效果,凝胶聚合时最好保持温度恒定。分子氧的存在会阻止碳链的延长,在聚合过程中要尽量避免接触空气,如可在不连续系统的分离胶聚合时在其表面加一薄层水以隔绝空气。某些金属离子或其他杂质也会影响凝胶的化学聚合,所以应选择高纯度的 Acr、Bis 和 AP。化学聚合的凝胶孔径较小,常用于制备分离胶(小孔凝胶),重复性好。

凝胶溶液中单体和交联剂的总浓度和两者的比例是决定聚丙烯酰胺凝胶的特性包括其机械性能、弹性、透明度、黏着度及孔径大小的主要因素。凝胶总浓度 T 为凝胶溶液中单体和交联剂的总质量浓度,实际应用时采用其质量浓度($\text{g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$)的数值表示。交联度 C 为凝胶溶液中交联剂占单体和交联剂总量的质量分数。

$$T = \frac{a+b}{m} \times 100\%$$

$$C = \frac{b}{a+b} \times 100\%$$

式中, a 为丙烯酰胺单体的质量(g), b 为交联剂 $\text{N,N}'$ -亚甲基双丙烯酰胺的质量(g), m 为溶液的终体积(mL)。通常 $a:b$ 在 30 左右,并且丙烯酰胺浓度高于 3%,凝胶透明并且有弹性。

聚丙烯酰胺凝胶的三维网状结构具有分子筛效应,孔径的大小取决于凝胶的总浓度 T 和交联度 C 。有效孔径随着凝胶总浓度的增加而减小,在凝胶总浓度一定时,交联剂含量不同也影响着凝胶的孔径。凝胶浓度不同,平均孔径也不同,不同大小和形状的大分子通过凝胶孔径时所受的阻滞力也不同,加上大分子的电荷效应,使分子大小不同、所带净电荷数量不同的大分子在凝胶中的迁移率不同而得以分离。在实际工作中,常依据待分离蛋白质的相对分子质量来选择合适的凝胶浓度,使蛋白质混合物得到最大限度的分离。表 3-1 列出了聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质的相对分子质量与凝胶浓度的关系,当已知待分离蛋白质的相对分子质量范围时可以查到适合使用的凝胶浓度。当分离一个未知样品时,常用 7.5% 的标准胶或梯度凝胶来测试,而后确定适宜的凝胶浓度。

表 3-1 蛋白质相对分子质量与凝胶浓度的关系

蛋白质相对分子质量范围	适用的凝胶质量浓度 $T/\%$
$< 1 \times 10^4$	20 ~ 30
$1 \times 10^4 \sim 4 \times 10^4$	15 ~ 20
$4 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$	10 ~ 15
$1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$	5 ~ 10
$> 5 \times 10^5$	2 ~ 5

在大部分生物大分子中都同时存在阳离子和阴离子基团,这些基团的解离常数不同,溶液的 pH 决定被分离物质带电基团的解离程度,即决定生物大分子所带净电荷的数量,所以 pH 影响着生物大分子的电泳迁移率。蛋白质的带电行为是蛋白质电泳技术的基础,蛋白质分子中可解离的基团除肽链末端 α -氨基和 α -羧基外,还有多肽链中氨基酸残基上的侧链基团如 ϵ -氨基、 β -羧基、 γ -羧基、咪唑基、胍基、酚基和巯基等,蛋白质的净电荷来自于这些可解离基团所带正负电荷的总和。溶液的 pH 距离蛋白质的等电点 pI 越远,蛋白质带电性越强,泳动速度越快;反之蛋白质的泳动速度越慢,所以在电泳分离蛋白质时,要选择合适 pH 的缓冲液,使待分离的各种蛋白质所带的电荷数量有较大差异,有利于彼此分开。多数蛋白质的等电点在中性偏酸性范围,通常是将样品在碱性缓冲系统中进行电泳,蛋白质分子带负电荷,以不同速度向阳极迁移。许多蛋白质的 pI 在 pH 4 ~ 7 范围内,所以通常使用 pH 8.0 ~ 9.5 范围的缓冲系统。

聚丙烯酰胺凝胶净电荷电泳是对天然状态的蛋白质进行分离,保持蛋白质的天然构

象及其生物学活性。利用蛋白质分子带有净电荷的性质和数目差异、相对分子质量及分子形状等因素,使蛋白质在电场中具有不同的泳动速度和方向,从而达到分离的目的(图 3-1)。

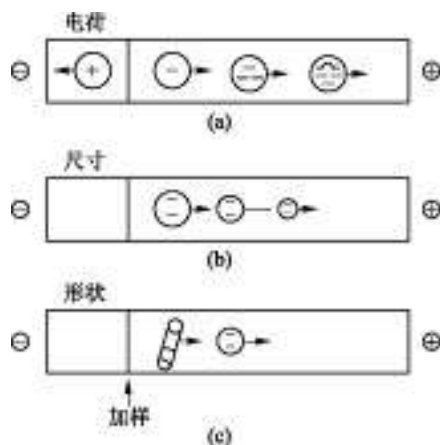


图 3-1 在净电荷聚丙烯酰胺凝胶电泳中蛋白质分离的影响因素

(a) 电荷因素:蛋白质分子形状和大小相同,所带电荷性质和数量不同 (b) 分子大小:蛋白质分子形状和所带电荷性质和数量相同,分子大小不同 (c) 分子形状:蛋白质分子所带电荷性质和数量相同,分子形状不同

本实验聚丙烯酰胺凝胶电泳是连续系统,是指电泳系统采用相同孔径的凝胶和相同的缓冲系统(样品缓冲液、凝胶缓冲液和电极缓冲液),在 pH 恒定、离子强度不同的条件下进行区带电泳。该方法制备凝胶简单,一般只用于分离一些比较简单的样品,最大的不足是分辨率不高。但对于一些浓度比较高的样品,在加样量很少的情况下,有时也能得到较好的分离效果。

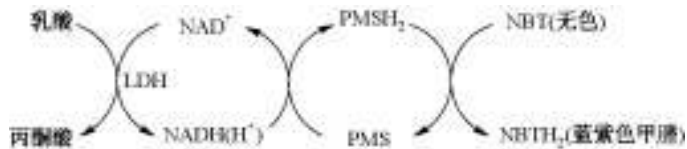
1959 年 Markert 等用电泳的方法将从牛心肌提纯的乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)结晶分离出 5 条区带,由阳极到阴极依次命名为 LDH₁、LDH₂、LDH₃、LDH₄、LDH₅,它们均具有 LDH 催化活性,从而首先提出了同工酶(isoenzyme)的概念。目前已知 LDH 同工酶是由 H 和 M 2 种亚基按不同比例组成的四聚体,它们是 H₄(LDH₁), H₃M(LDH₂), H₂M₂(LDH₃), HM₃(LDH₄)及 M₄(LDH₅)5 种(图 3-2)。LDH 同工酶广泛分布于动植物及微生物中,动物各组织中 LDH 同工酶各组分含量不同。



图 3-2 LDH 同工酶亚基的组成

蛋白质经过净电荷聚丙烯酰胺凝胶电泳后可以保持其原有的分子构象和生物学活性包括酶活性,这就给同工酶的检测创造了条件,在凝胶上对同工酶进行原位染色,这是一种特异性的染色方法。本实验用同工酶活性染色对 LDH 进行鉴定,即染色液中含有乳酸脱氢酶的底物,LDH 与底物的反应,用甲硫吩嗪(phenazine methosulphate, PMS)作为电子

的中间载体,氯化硝基四氮唑蓝(nitroblue tetrazolium chloride, NBT)作为最终电子受体,底物脱下的氢最后传递给NBT, NBT被还原后,产生蓝紫色的不溶于水的物质以对LDH定位。反应式如下:



器材与试剂

1. 实验器材

电子分析天平,小型台式离心机,玻璃匀浆器,小型夹心式垂直板电泳槽,电泳仪(与电泳槽型号配套),可调式移液器,微量进样器(50 μ L),电热恒温水浴。

2. 实验材料

小鼠骨骼肌、肝、心肌和脑组织。

3. 实验试剂

(1) 30%凝胶贮液 含有291 g/L Acr和9 g/L Bis水溶液($T = 30\%$, $C = 3\%$),充分溶解后过滤置于棕色瓶中,4 $^{\circ}$ C保存。

(2) Tris-甘氨酸缓冲液贮液(pH 8.9) 称量12 g甘氨酸,6 g Tris,用去离子水溶解并定容至1 L。该溶液原浓度用于配制凝胶,稀释10倍即组织匀浆缓冲液,稀释2倍即电极缓冲液。

(3) 100 g/L过硫酸铵(AP)贮液 用去离子水小量配制,分装在小离心管中,4 $^{\circ}$ C保存1周,-20 $^{\circ}$ C保存2个月。

(4) TEMED 4 $^{\circ}$ C保存。

(5) 样品处理液 400 g/L的蔗糖溶液(含少许溴酚蓝)。

(6) 0.5 mol/L磷酸钾盐缓冲液,pH 7.5 称量19.03 g $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$,2.26 g KH_2PO_4 ,用去离子水溶解并定容至200 mL。

(7) LDH同工酶染色贮存液

贮液 I:含有5 mg/mL氧化型辅酶 I (NAD^+)的水溶液,置于棕色瓶中4 $^{\circ}$ C保存2周,-20 $^{\circ}$ C保存半年。

贮液 II:含有0.5 mol/L、pH 7.5磷酸钾盐缓冲液5 mL,氯化钠14.6 mg,60%的乳酸钠0.46 mL,PMS 1.0 mg,NBT 10 mg,用去离子水溶解并定容至21 mL,此溶液为黄色,置棕色瓶中4 $^{\circ}$ C保存2周,-20 $^{\circ}$ C保存半年。如果溶液变成绿色,则不能使用。

使用当天,贮液 I和贮液 II按照4:21比例混合,置于棕色瓶中备用。

(8) 脱色液 7%的乙酸溶液。

实验步骤

1. 样品制备

断脊椎处死小鼠,取适量小鼠骨骼肌、肝、心肌和脑组织,加入5倍组织重的匀浆缓冲液,用玻璃匀浆器匀浆,将匀浆液离心(10 000 r/min,15 min),吸出上清液,加入等体积400 g/L的蔗糖(含少许溴酚蓝)混匀,放置4℃冰箱中备用,-20℃可保存1年。

2. 安装夹心式垂直板电泳槽(以GE公司SE250小型垂直板电泳槽为例)

(1) 夹心式垂直板电泳槽的组成 此电泳装置分为灌胶模具和电泳槽两个部分。首先需要在灌胶模具上制备凝胶板(图3-3),然后将凝胶板移到电泳槽中进行电泳(图3-4)。

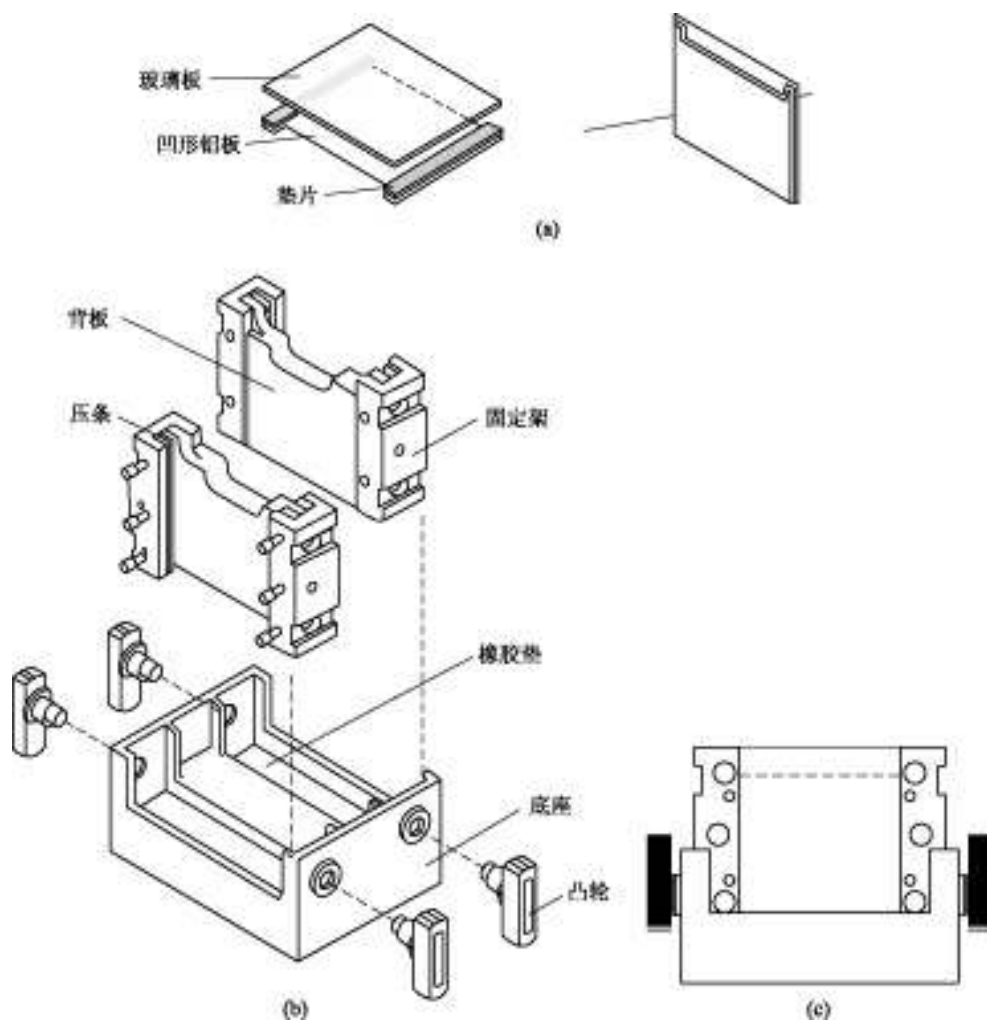


图3-3 GE公司SE250小型垂直板灌胶模具的组装

(a)凝胶模的组装 包括凹形铝板、玻璃板、垫片(0.75 mm) (b)灌胶模具各部件的组装 (c)组装完成的灌胶模具

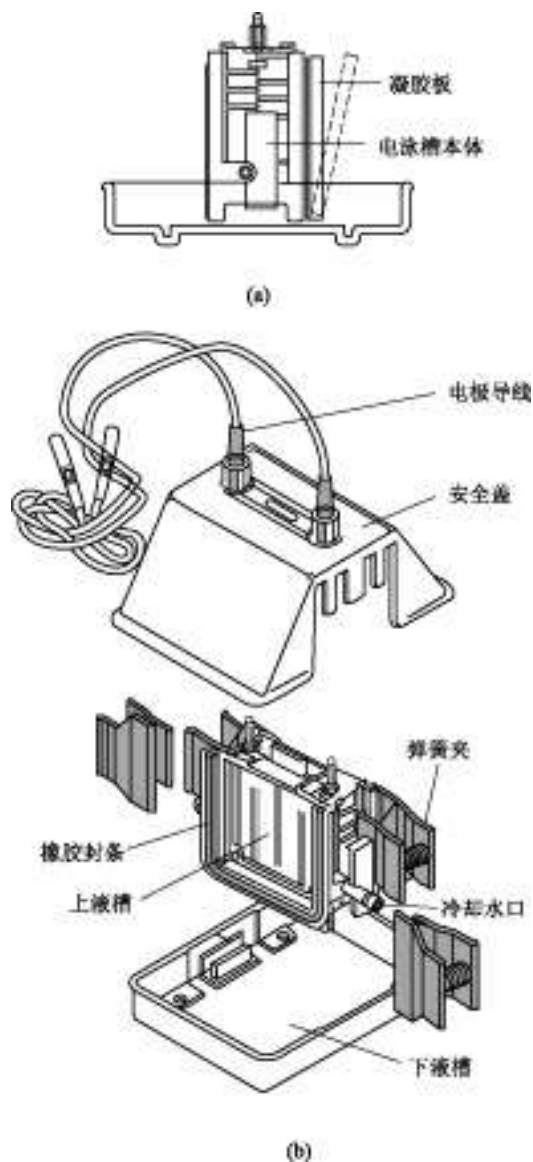


图 3-4 GE 公司 SE250 小型垂直板电泳槽的组装

(a) 将凝胶模安装在电泳槽本体上 (b) 电泳槽各部件, 包括下液槽、电泳槽本体(上液槽)、安全盖(带导线)等

(2) 灌胶模具各部件的组装

① 凝胶模的组装: 将洗净干燥的玻璃板、垫片、凹形铝板按照图 3-3a 所示组装, 两侧及下端对齐, 注意勿用手指接触玻璃板和铝板的灌胶面。

② 将凝胶模安装在固定架上: 将凝胶模插入固定架, 使凹形铝板紧贴固定架的背板, 将固定架放在一个水平玻璃板上, 使凝胶模各部件与固定架的压条下端对齐, 轻轻拧紧螺丝, 使压条紧压凝胶模。

③ 将固定架安装在底座上: 将固定架置于底座上, 螺丝朝外, 凸轮插入固定架两侧并旋转 180° 使凝胶模的下缘在固定架的橡胶垫上被压紧, 这样就形成了一个两侧和底部均密闭

的夹心式凝胶模(图 3-3b、3-3c),准备灌胶。

3. 制胶

表 3-2 列出了不同质量浓度凝胶的配方。根据乳酸脱氢酶的分子大小,选用质量浓度为 6% 的凝胶,也可以使用 7.5% 的标准胶。在小烧杯中按所使用的凝胶质量浓度配制凝胶混合液。

表 3-2 制备连续聚丙烯酰胺凝胶电泳不同质量浓度凝胶的配方

溶液成分	10 mL* 凝胶液中各成分的体积(C=3%)				
	T=6%	T=7.5%	T=10%	T=12%	T=15%
30% 凝胶贮液/mL	2.0	2.5	3.3	4.0	5.0
Tris-甘氨酸缓冲液贮液 (pH 8.9)/mL	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
去离子水/mL	2.95	2.45	1.65	0.95	0
10% AP/ μ L**	50	50	50	50	50
TEMED/ μ L	5	5	5	5	5

* GE 公司 SE250 小型垂直板电泳槽凝胶板需配制凝胶溶液 5 mL/凝胶板。

** 可根据室温和聚合情况予以适当调整 AP 和 TEMED 的加入量,使凝胶溶液在 40~60 min 内聚合完全。

加入 AP 和 TEMED 后立即混匀,迅速将凝胶溶液灌注在玻璃板和凹形铝板的间隙中,灌注时可用烧杯沿着玻璃板内侧缓缓倒入,也可以用可调式移液器加入。当凝胶溶液距凹形铝板上缘 2~3 mm 时,立即轻轻将样品槽模板插入凝胶溶液中,目的是使凝胶溶液聚合后,在凝胶顶部形成数个加样槽。灌胶模具在室温下垂直放置,40~60 min 聚合反应完成。

4. 加样

(1) 将凝胶板安装在电泳槽本体上 将凝胶板从灌胶模具上取下,安装到电泳槽本体上,使凹形铝板紧贴在本体的密封橡胶封条上,用弹簧夹夹紧(图 3-4a),在凝胶板和本体之间形成一个封闭的上液槽。

(2) 加样的准备工作 在上液槽和下液槽中均加入电极缓冲液,注意上槽电极缓冲液要高过凹形铝板,凝胶板与下液槽之间的缝隙处充满电极缓冲液,这样电泳时就形成了电流通路。将上样指示器(印有样品槽模板形状的塑料片)贴在玻璃板上,使其与样品槽重合(加完样后将其取下再进行电泳),小心拔出样品槽模板。

(3) 加样 用微量进样器吸取 3~10 μ L 样品溶液,小心地将样品加在样品槽底部(图 3-5),注意样品溶液不能漫过样品槽,每加一种样品后要用去离子水清洗进样器,避免样品相互污染。样品加入体积可以根据每次制备的样品 LDH 浓度而定,一般肝脏 LDH 浓度高,只需加 3 μ L,脑的 LDH 浓度较低需要加 8~10 μ L,骨骼肌和心肌居中。

5. 电泳

加样后,盖上电泳槽安全盖,将电泳槽的正负电极与电泳仪的正负电极正确连接,调至恒压 80 V,观察样品中的溴酚蓝指示剂全部进入凝胶后,将电压提高到 120~150 V,继续电泳,直到溴酚蓝前沿到达距凝胶下端约 0.5 cm 时,关闭电源。

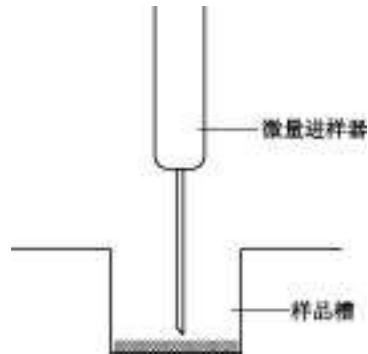


图 3-5 加样示意图

6. 染色、脱色和照相

电泳结束后,将凝胶板取下,取出垫片,用薄尺子轻轻将玻璃板和凹形铝板撬开,在凝胶下部切去一角以标注凝胶的方位,然后将带有凝胶的一块板反扣过来,胶面朝下,用尺子小心地将凝胶从一角剥离,直到凝胶完全掉入一个装有活性染色液的培养皿中。轻轻摇动培养皿,使凝胶完全浸泡在染色液中,放入 37℃ 电热恒温水浴中避光保温,待大多数条带显现蓝紫色时除去染色液,显色时间一般为 10~20 min。加入脱色液终止酶促反应,并使凝胶底色脱去直至背景清亮,脱色过程约需 5 min,即可用凝胶成像仪照相。

实验结果

图 3-6 是正常小鼠骨骼肌、心肌、肝和脑组织提取液的 LDH 同工酶电泳条带图谱。从图中看到,动物不同组织中 LDH 同工酶各组分含量不同,如骨骼肌和肝脏中 LDH₅ 含量丰富,但其他组分含量并不相同,骨骼肌含有少量的 LDH₁~LDH₄,但肝中几乎不含 LDH₁~LDH₄。

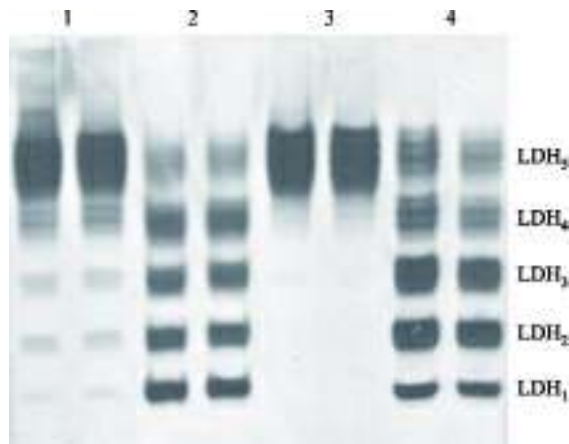


图 3-6 聚丙烯酰胺凝胶净电荷电泳分离小鼠 LDH 同工酶活性染色结果

1. 骨骼肌 2. 心肌 3. 肝 4. 脑



注意事项

1. 选择高纯度的 Acr 和 Bis, 否则会影响凝胶的聚合与电泳的分离效果。Acr 和 Bis 均为神经毒剂, 对皮肤有刺激作用, 操作时应避免皮肤接触和吸入粉尘, 尽量避免污染台面及用具, 灌胶剩余的凝胶溶液应待聚合后再丢弃。
2. 玻璃板、凹形铝板及垫片均应严格地清洗, 应注意使用海绵清洗, 避免产生划痕。
3. 灌注凝胶溶液时, 凝胶中及样品槽下沿不能存有气泡, 凝胶溶液应充满样品槽间隙, 凝胶聚合后必须再放置 20 ~ 30 min 使其充分“老化”, 这样才能使凝胶均一, 样品槽底部平整, 才有可能得到平整的电泳条带。
4. 根据乳酸脱氢酶的分子大小, 凝胶的质量浓度选择 6% 比较适宜, 但由于 6% 的凝胶比较软, 给后期操作带来不便, 所以也可以选用 7.5% 的标准胶, 但要注意电泳时要在溴酚蓝走出凝胶下沿后继续电泳 30 ~ 60 min, 这样才能使各同工酶条带分离效果较好。
5. LDH 同工酶活性染色时间不宜过长, 当大多数条带显现蓝紫色时即可终止染色。使用后的染色液如果仍为黄色, 则可再次使用, 显色时间会较慢, 但不影响最后的染色效果, 染色液变为绿色则不能再使用。



思考题

1. 聚丙烯酰胺凝胶净电荷电泳分离蛋白质的特点是什么?
2. 连续电泳的特点是什么? 有什么优缺点?
3. 简述 LDH 同工酶活性染色的原理, 分析活性染色与常用的考马斯亮蓝染色法有什么本质的不同? 在实验过程中需要注意什么问题?
4. 本实验的样品处理液中加入溴酚蓝和蔗糖的作用是什么?

实验十三 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳—— 测定蛋白质相对分子质量

概述

SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 是在聚丙烯酰胺凝胶系统中加入一定量的阴离子去污剂和强还原剂后, 蛋白质分子解聚成单链并与 SDS 结合形成带负电的复合物, 该复合物的电泳迁移率主要取决于蛋白质的相对分子质量, 即 SDS-PAGE 是根据蛋白质分子大小不同进行分离, 因此 SDS-PAGE 可以用于测定单链蛋白质或亚基的相对分子质量。由于 SDS-PAGE 不连续系统电泳具有较强的浓缩效应, 分辨率比 SDS-PAGE 连续系统电泳要高得多, 所以 SDS-PAGE 不连续系统电泳是生物化学实验室中测定蛋白质相对分子质量及纯度常用的实验方法。

实验目的

了解 SDS - PAGE 的基本原理,掌握垂直板 SDS - PAGE 不连续电泳技术,学习 SDS - PAGE 测定蛋白质相对分子质量的方法。

实验原理

十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)是一种阴离子去污剂,能破坏蛋白质分子内和分子间的非共价键,使分子去折叠,破坏蛋白质分子内的二级和三级结构,并与蛋白质分子结合形成蛋白质 - SDS 复合物。 β -巯基乙醇(β -mercaptoethanol)和二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)作为一种强还原剂,作用是使蛋白质分子中半胱氨酸残基之间的二硫键打开并不易再氧化。在样品溶液中同时加入 SDS 和 DTT 后,蛋白质分子被解聚成组成它们的亚基。由于 SDS 带有大量负电荷,蛋白质 - SDS 复合物所带的电荷大大超过了蛋白质分子原有的净电荷量,从而降低或消除了各种蛋白质分子之间天然的电荷差异。SDS 与蛋白质结合后还引起了蛋白质构象的改变,在水溶液中的形状近似于雪茄烟形的长椭圆棒形结构(图 3-7),其短轴的长度相同,长轴的长度则与蛋白质亚基的相对分子质量成正比,这样的蛋白质 - SDS 复合物在凝胶中的迁移率不再受蛋白质原有的电荷和形状的影响,而只与椭圆棒的长度也就是蛋白质亚基相对分子质量有关。

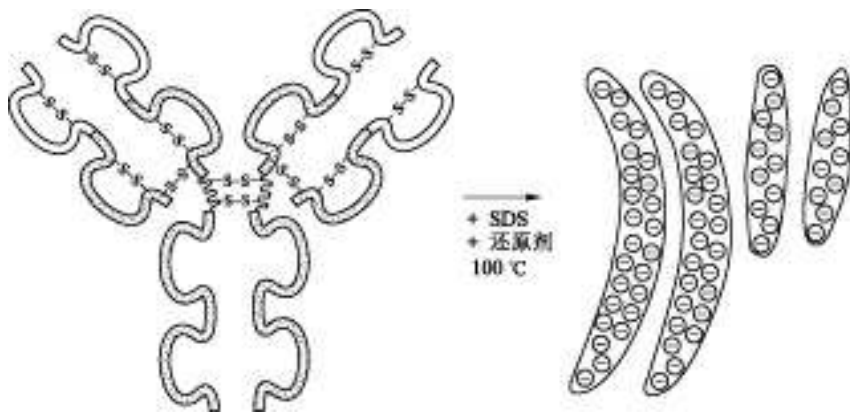


图 3-7 免疫球蛋白分子在 100℃ 用 SDS 和 DTT 处理 3~5 min 后解聚成单链分子并形成带负电荷的蛋白质 - SDS 复合物

不同浓度和交联度的凝胶对蛋白质亚基 - SDS 复合物具有阻滞作用,在电场下,相对分子质量大的亚基受到的阻力大,在凝胶中迁移速度慢,反之相对分子质量小的亚基受到的阻力小,在凝胶中迁移速度快。不同相对分子质量的亚基受阻程度不同,表现出不同的迁移距离,这样利用凝胶的分子筛效应就把同一样品中不同大小相对分子质量的蛋白质亚基分开。1969 年 Weber 等人对 37 种已知相对分子质量的蛋白质进行测定,实验证实电泳迁移率与相对分子质量的对数呈线性关系(图 3-8),符合下列方程式:

$$\lg M_r = -b \cdot m_R + K$$

式中： M_r 为蛋白质或亚基的相对分子质量， m_R 为电泳相对迁移率， b 为斜率， K 为截距。在一定的条件下， b 和 K 均为常数。所以采用 SDS - PAGE 不仅可以按照相对分子质量大小对蛋白质进行分离，而且可以根据电泳迁移率大小测定蛋白质的相对分子质量，测定范围为 M_r 15 000 ~ 200 000。

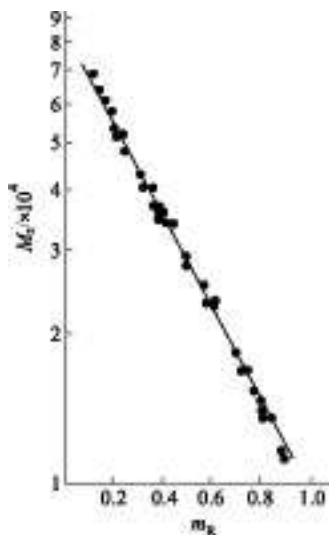


图 3-8 37 种蛋白质相对分子质量的对数与电泳相对迁移率的关系图

M_r 为 11 000 ~ 70 000, 10% 凝胶, SDS - 磷酸盐缓冲系统, pH 7.2

SDS - PAGE 在制备样品的过程中蛋白质与 SDS 结合的程度是实验成败的关键之一。SDS 与蛋白质结合是按照质量成比例进行结合的, 当 SDS 单体浓度大于 1 mmol/L 时, 它与大多数蛋白质结合的质量比为 1.4 g SDS : 1 g 蛋白质, 如果达不到这个比率, 蛋白质 - SDS 复合物的构象就会发生变化, 影响测定结果。为保证 SDS 与蛋白质充分结合, 要求蛋白质分子内的二硫键被彻底打开, 蛋白质分子完全解聚, 在较低离子强度的溶液中 SDS 的总量至少要比蛋白质的量高 3 倍, 这样 SDS 才能定量地结合到蛋白质分子上, 并使之具有相同的构象, 蛋白质亚基的相对分子质量才能定量测出。

在测定蛋白质相对分子质量时, 通常选用已知相对分子质量的标准蛋白质作为参照物, 与未知相对分子质量的待测蛋白质在同一块凝胶上进行 SDS - PAGE, 用标准蛋白质的相对迁移率与相对分子质量的对数作图, 可获得一条 $m_R \sim \lg M_r$ 标准曲线, 根据未知蛋白质的相对迁移率即可在标准曲线上求得其相对分子质量。有许多蛋白质由几个亚基(如血红蛋白)或两条以上肽链(如免疫球蛋白 IgG)组成, 利用 SDS - PAGE 测定的相对分子质量只是它们的亚基或单条肽链的相对分子质量, 为了得到更全面的信息, 还必须用其他方法测定其相对分子质量和肽链的数目等参数, 与 SDS - PAGE 结果互相参照。

SDS - PAGE 作为一种单向电泳技术, 根据电泳系统中的缓冲液、pH 和凝胶孔径的区别来分类, 可分为 SDS - PAGE 连续系统和 SDS - PAGE 不连续系统两种类型, 不连续系统需要分别制备分离胶和浓缩胶, 其他操作方法与连续系统完全相同。由于 SDS - PAGE 不连续系统对样品具有较强的浓缩效应, 因而它的分辨率比 SDS - PAGE 连续系统大大提高, 虽然制胶操作难度较大, 但是它具有连续体系不可比拟的优越性, 尤其是在分离比较复杂和特殊的

样品时,所以人们更倾向于采用不连续体系。

不连续系统电泳是指使用不同孔径的凝胶和不同缓冲体系的电泳方式,与连续系统相比具有很大的不同。在电泳过程中,由于浓缩胶的浓缩效应使样品先在浓缩胶和分离胶的界面上被浓缩成一窄带,然后进入一定浓度或浓度梯度的分离胶,受到凝胶的分子筛效应和电荷效应的作用表现出不同的迁移率,从而使样品各组分分离。不连续系统电泳有4个不连续性:①凝胶浓度不连续。分离胶和浓缩胶浓度不同,浓缩胶浓度低,属于大孔胶,所以对蛋白质分子没有分子筛作用,只起浓缩作用;分离胶浓度较高,属于小孔胶,具有分子筛效应将蛋白质分离。②缓冲液离子成分不连续。常用的凝胶缓冲系统为 Tris(三羟甲基氨基甲烷)-HCl 系统,但其在浓缩胶和分离胶中浓度不同;电极缓冲液为 Tris-Gly(甘氨酸)系统,甘氨酸在浓缩胶和分离胶中的解离程度不同;Cl⁻和 Gly⁻在浓缩胶中迁移速度不同,造成离子成分的不连续性。③缓冲液 pH 梯度不连续。样品缓冲液 pH 6.8,浓缩胶缓冲液 pH 6.8,分离胶缓冲液 pH 8.9,电极缓冲液 pH 8.3,浓缩胶与分离胶之间 pH 的不连续性,是为了控制 Gly⁻的解离度,从而控制其有效迁移率。④电位梯度不连续。样品和浓缩胶缓冲液均使用 pH 6.8 的 Tris-HCl 系统,电极缓冲液使用 Tris-Gly 系统,电泳开始后,缓冲系统中 HCl 全部解离成 Cl⁻,在电场中迁移速度快,为先导离子,走在最前面,其后形成一个低电导区,具有较高的电位梯度;甘氨酸解离度较小,仅有 0.1%~1% 解离成 Gly⁻,在电场中迁移很慢,为尾随离子,走在最后面;样品中蛋白质在此 pH 下也带负电,移动速度介于两者之间。这3种离子同时向正极方向移动,Cl⁻后面较高的电位梯度使后面的蛋白质和尾随离子加速移动,当3者的移动速度相同时,在先导离子和尾随离子之间就形成了一个稳定的不断向阳极移动的界面,蛋白质在这个界面上逐步堆积成一个狭窄的中间层,从而达到样品浓缩的目的。当 Gly⁻-蛋白质⁻-Cl⁻的移动界面到达浓缩胶和分离胶的界面时,由于分离胶缓冲液的 pH 是 8.9,导致 Gly 的大量解离,此时 Gly⁻的迁移速度也随之增加,赶上并超过蛋白质紧随 Cl⁻之后移动,蛋白质移动速度较慢被留在后面,不再受离子界面的影响,被堆积的样品组分从凝胶不连续的界面开始,在分离胶中以固定的电位梯度进行电泳,受到分离胶电荷效应和分子筛效应的作用使各个组分被分级分离。



器材与试剂

1. 实验仪器

恒温金属浴,其他仪器与聚丙烯酰胺凝胶净电荷电泳相同(见实验十二)。

2. 实验材料

(1) 小鼠 IgG

(2) 标准蛋白质 包含6种预染的已知相对分子质量的标准蛋白质,相对分子质量范围为 $1.4 \times 10^4 \sim 9.7 \times 10^4$,各组分分别为:兔磷酸化酶 B(97 400)、牛血清白蛋白(67 000)、兔肌动蛋白(43 000)、牛碳酸酐酶(31 000)、胰蛋白酶抑制剂(20 100)及鸡蛋清溶菌酶(14 400)。使用前无需加热,电泳过程中可以观察到预染蛋白质条带的迁移。

3. 实验试剂

(1) 100 g/L SDS 贮液 必须选用高纯度的 SDS(电泳级),否则会影响电泳条带的分辨

效果,室温保存。

(2) 电极缓冲液 含 25 mmol/L Tris, 192 mmol/L Gly, 1 g/L SDS, pH 8.3, 可配成 5 × 贮液备用。

(3) 样品溶解液 在 50 mmol/L, pH 6.8 的 Tris - HCl 缓冲液中含有 10 g/L SDS、1% 巯基乙醇或 100 mmol/L DTT、10% 甘油和 0.2 g/L 的溴酚蓝。还原剂如用 DTT, 需在临用前加于样品溶解液中。当样品是溶液时, 可以配制高浓度的样品溶解液(2 倍或 4 倍), 处理样品时按照比例与待测样品混合(蛋白质的终浓度一般为 0.05 ~ 1 mg/mL), 这样可以加大样品的浓度。

(4) 浓缩胶缓冲液贮液 1.0 mol/L Tris - HCl 缓冲液, pH 6.8, 4°C 保存。

(5) 分离胶缓冲液贮液 1.5 mol/L Tris - HCl 缓冲液, pH 8.9, 4°C 保存。

(6) 固定液 50% 乙醇, 40% 去离子水, 10% 乙酸。

(7) 染色液 100 mg 考马斯亮蓝 G - 250 溶于 50 mL 无水乙醇中, 加入 100 mL 85% 磷酸, 100 g 硫酸铵, 用去离子水稀释到 1 000 mL, 用滤纸过滤。

(8) 脱色液 0.25 mol/L KCl 溶液。

30% 凝胶贮液、100 g/L AP 水溶液与聚丙烯酰胺凝胶净电荷电泳相同(见实验十二)。



实验步骤

1. 样品制备

称取 1 mg 小鼠 IgG 干粉, 加入 1 mL 样品溶解液使其充分溶解, 此溶液置于小离心管中, 轻轻盖上盖, 置于金属浴中加热 3 ~ 5 min, 取出冷却至室温, 即可加样。处理好的样品溶液可在冰箱保存较长时间, 使用前在金属浴中重新加热 1 ~ 2 min。

2. 实验仪器组装

实验仪器组装与聚丙烯酰胺凝胶净电荷电泳相同(见实验十二)。

3. 制胶

(1) 制备分离胶 安装好灌胶模具, 然后根据所测定蛋白质相对分子质量的范围, 选择相应的凝胶浓度, 按照表 3 - 3 给出的数值在小烧杯中按所需凝胶浓度配制一定体积的凝胶混合液。本实验选用 12% 的凝胶。

表 3 - 3 SDS - PAGE 不连续系统分离胶的配方

溶液成分	10 mL 凝胶液中各成分的体积(C = 3%)				
	T = 6%	T = 7.5%	T = 10%	T = 12%	T = 15%
去离子水/mL	5.3	4.8	4.0	3.3	2.3
30% 凝胶贮液/mL	2.0	2.5	3.3	4.0	5.0
分离胶缓冲液/mL	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
100 g/L SDS/mL	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
100 g/L AP/ μ L*	50	50	50	50	50
TEMED/ μ L	5	5	5	5	5

* 过硫酸铵和 TEMED 的量可根据室温和聚合情况予以适当调整, 使凝胶溶液在 40 ~ 60 min 内聚合完全。

凝胶溶液中加入过硫酸铵和 TEMED 后立即混匀,迅速在凝胶模的间隙中灌注凝胶溶液(灌注方法与聚丙烯酰胺凝胶净电荷电泳相同,见实验十二),留出灌注浓缩胶所需要的空间(即从凹形铝板上沿开始计算,留出样品槽模板的齿长再加 1 cm),用滴管或移液器小心地沿玻璃板内壁向凝胶溶液表面缓缓加入一薄层去离子水(高度 3 ~ 4 mm)密封,将灌胶模具在室温垂直放置,此时可观察到凝胶溶液和去离子水的界面平整。待 40 ~ 60 min 后分离胶完全聚合,倾斜灌胶模具倾出分离胶上覆盖的去离子水层,并用滤纸条吸干残留水分。

(2) 制备浓缩胶 浓缩胶的质量浓度一般选择 5%,按表 3-4 制备浓缩胶。

表 3-4 SDS-PAGE 不连续系统浓缩胶的配方

溶液成分	5 mL 凝胶液中各成分的体积($C=3\%$)	
	$T=5\%$	
去离子水/mL	3.4	
30% 凝胶贮液/mL	0.83	
浓缩胶缓冲液/mL	0.63	
100 g/L SDS/ μL	50	
100 g/L AP/ μL	25	
TEMED/ μL	5	

加入 AP 和 TEMED 后立即混匀,迅速在凝胶模的间隙中灌注浓缩胶溶液,当凝胶溶液距凹形铝板上沿 2 ~ 3 mm 时,插入样品槽模板,室温垂直放置,等待凝胶溶液聚合。

4. 加样

将聚胶后的凝胶板转移到电泳槽上安装好,在上液槽和下液槽中加入电极缓冲液,放好上样指示器,拔出样品槽模板,用微量进样器加样,标准蛋白质加样量为 5 μL ,样品溶液加 5 ~ 10 μL ,最后在空的样品槽中加入等体积的样品溶解液。

5. 电泳

盖上电泳槽安全盖,将电泳槽的正负电极与电泳仪的正负电极正确连接。调至恒压 80 V,待指示剂全部进入分离胶后,电压提高到 120 ~ 150 V,继续电泳直到溴酚蓝前沿到达距凝胶下沿约 0.5 cm 时关闭电源,停止电泳。

6. 染色

电泳结束后,取出凝胶。如果要做标准曲线,则需在溴酚蓝区带中心用金属丝做好标记,在凝胶下部切去一小角以标注凝胶的方位(注意,凝胶如果用于 Western 印迹实验,则要保持凝胶完好)。本实验采用考马斯亮蓝 G-250 染色法,先将凝胶用固定液固定 1 h,倾去固定液后加入考马斯亮蓝 G-250 染色液染色 1 ~ 2 h,倾出染色液,加入脱色液,每隔 2 ~ 3 h 更换 1 次,直到凝胶的蓝色背景完全褪去。

实验结果

1. 标准蛋白质及样品在 SDS - PAGE 凝胶上的分离示意图(图 3 - 9)

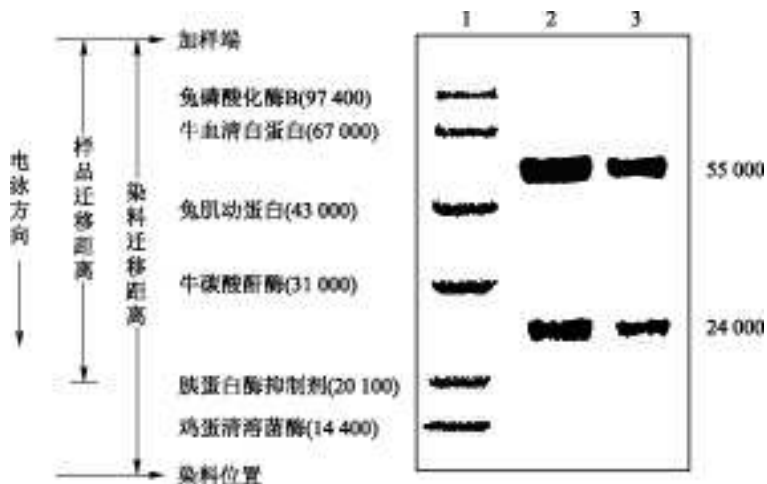


图 3 - 9 标准蛋白质及小鼠 IgG 在 SDS - PAGE 凝胶上的分离示意图

1. 蛋白质标准品 2,3. 小鼠 IgG

从图 3 - 9 中可以看到, SDS - PAGE 的结果是样品 IgG 有两条电泳条带, 测定结果是 IgG 的重链和轻链的相对分子质量, 由 IgG 的结构可知, IgG 的相对分子质量应该是两条重链和两条轻链的相对分子质量之和。

2. 利用相对迁移率计算相对分子质量

通常以相对迁移率 m_R 来表示迁移率, 用直尺分别测量出标准蛋白质及指示剂的迁移距离, 即从分离胶顶端到蛋白质样品区带中心或指示剂区带中心的距离(图 3 - 9), 计算出每一种蛋白质的 m_R :

$$\text{相对迁移率 } m_R = \frac{\text{蛋白质样品的迁移距离 (cm)}}{\text{指示剂的迁移距离 (cm)}}$$

以标准蛋白质的相对迁移率为横坐标, 标准蛋白质相对分子质量的对数值为纵坐标绘制标准曲线。根据样品蛋白质与标准蛋白质在同一电泳条件下迁移的距离, 计算出其相对迁移率 m_R , 从标准曲线上即可求得样品蛋白质的相对分子质量。对于垂直板电泳, 可直接以标准蛋白质的迁移距离对标准蛋白质相对分子质量的对数作图, 根据待测蛋白质样品的迁移距离同样可求得其相对分子质量。

3. 比较法

如果结果要求不是很精确时, 通常将未知蛋白质与标准蛋白质的相对位置目测进行比较, 粗略估计未知蛋白质的相对分子质量。



注意事项

1. 在 SDS - PAGE 中影响迁移率的因素很多,在每次制胶和电泳过程中,很难将各项条件控制得完全一致,因此,用 SDS - PAGE 测定蛋白质相对分子质量时,必须每次在同一块凝胶上将标准蛋白质和未知样品同时进行电泳,这样可以排除影响因素。

2. 灌制分离胶时做水封的作用:一是隔绝空气,避免氧气对凝胶聚合的影响,二是使凝胶表面平整。需要注意的是加入去离子水时要缓慢,避免水滴狠砸胶面与凝胶溶液融合。

3. 考马斯亮蓝 G - 250 染色法的优点是考马斯亮蓝 G - 250 能快速结合蛋白质,染色时间短,而且背景颜色很浅,易于脱色,对于蛋白质含量较大的样品染色 1 h 即可直接观察结果。固定液用乙醇代替甲醇,脱色液用 0.25 mol/L 氯化钾代替 7% 乙酸,使实验操作更加安全环保。在染色液中加入 100 g/L 硫酸铵,可使其染色灵敏度明显提高,染色 2 h 能够达到最佳效果,对于浓度较低的样品可适当延长染色时间。虽然考马斯亮蓝 G - 250 染色法灵敏度略逊于 R - 250 染色法,但是经过方法改良基本能达到 R - 250 的染色水平,所以考马斯亮蓝 G - 250 染色法是一种适用于蛋白质电泳定量分析快捷实用的实验方法。



思考题

1. 试述 SDS - PAGE 不连续系统中浓缩胶和分离胶的作用机制,说明不连续系统电泳的优点。

2. 简述 SDS - PAGE 测定蛋白质相对分子质量的原理及计算方法。

实验十四 聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳 ——测定蛋白质等电点

概述

等电聚焦(isoelectric focusing, IEF)是一种利用蛋白质分子或其他两性电解质分子具有不同等电点的性质,在一个稳定、连续、线性的 pH 梯度中进行分离的高分辨率的分离分析技术。近年来,等电聚焦电泳技术的分辨率有了很大提高,有文献报道等电聚焦电泳的分辨率可以达到 0.001 pH 单位的生物大分子,目前应用超薄水平板式等电聚焦电泳具有散热效果好、节省试剂、加样数量多等优点,而且电泳后凝胶处理方便,结果重复性好。等电聚焦后呈现高分辨率的蛋白质条带可以对样品进行定量分析和辨认,也可通过电泳转移或双向电泳对蛋白质条带进行进一步分析。



实验目的

学习等电聚焦的理论知识,掌握等电聚焦测定蛋白质等电点的实验技术。

实验原理

由于各种蛋白质的氨基酸组成不同,因而有不同的等电点。当环境的 $pH > pI$ 时,蛋白质带负电荷,在电场的作用下向正极移动;当环境的 $pH < pI$ 时,蛋白质带正电荷,在电场的作用下向负极移动;当环境的 $pH = pI$ 时,蛋白质所带净电荷为零,在电场的作用下不发生移动。因此可以利用蛋白质不同的等电点对其进行分析和分离。

等电聚焦电泳技术就是在电泳支持介质中加入载体两性电解质(carrier ampholytes),通以直流电后在正负极之间形成稳定、连续的线性 pH 梯度,蛋白质在凝胶中在电场力作用下泳动,在迁移过程中自身电荷被凝胶中的相反电荷中和,随着等电点位置的临近自身的电荷越来越少,当蛋白质分子到达它的等电点位置时,分子所带净电荷为零,就不能再迁移,蛋白质分子如有扩散,带有载体两性电解质的凝胶介质会使其荷电,阳极或阴极则将其重新吸引到等电点位置,因此蛋白质只能在与本身 pI 相等的 pH 位置被聚焦成窄而稳定的区带(图 3-10),这种“聚焦效应”使等电聚焦的分辨率大大高于常规电泳。

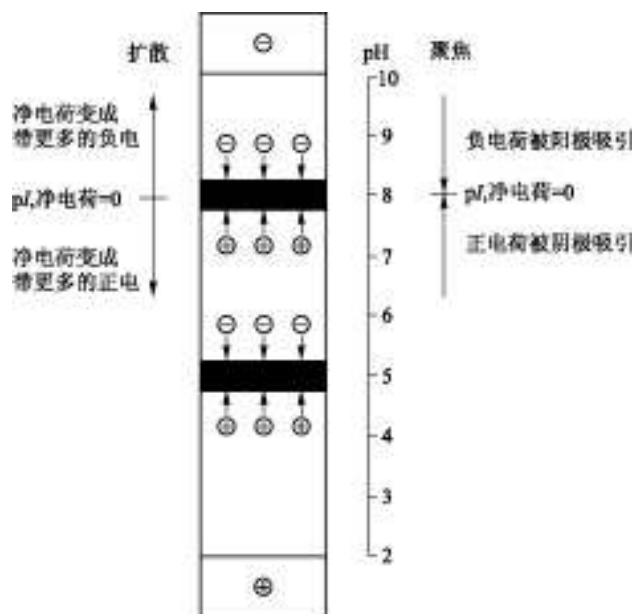
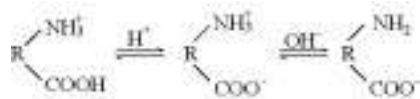


图 3-10 等电聚焦的“聚焦效应”

载体两性电解质是由脂肪族多氨基多羧基的异构物和同系物组成,有连续改变的氨基与羧基比,它既带有酸性基团(NH_3^+)又带有碱性基团(COO^-),即它既可释放质子,又可接受质子,在酸性条件下带正电荷,在碱性条件下带负电荷,当它所带的正负电荷相等即净电荷为零时呈电中性,此时溶液的 pH 即等于该两性电解质的等电点 pI 。反应式如下:



载体两性电解质的质量是高分辨率等电聚焦的关键因素,理想的载体两性电解质应该溶解性好,导电性能良好,化学性质稳定,在等电聚焦过程中能形成连续稳定的 pH 梯度,保持均匀的电场,不影响蛋白质活性。载体两性电解质紫外吸收低,与蛋白质可逆结合,易从聚焦的蛋白质条带中除去,有利于蛋白质的检测和分析。

在制备等电聚焦聚丙烯酰胺凝胶时,将两性电解质混溶在凝胶中,此时载体两性电解质分子所带总的净电荷为零(图 3-11a)。电泳时在电场作用下,载体两性电解质分子将向正极或负极方向泳动,到达净电荷为零的位置时停止。具有最低和最高等电点的分子带电荷最多,泳动速度最快,所以 pI 梯度从正、负极两端开始形成(图 3-11b),然后不同 pI 的载体两性电解质分子逐渐到达其等电点位置而形成一个连续的 pI 梯度(图 3-11c)。

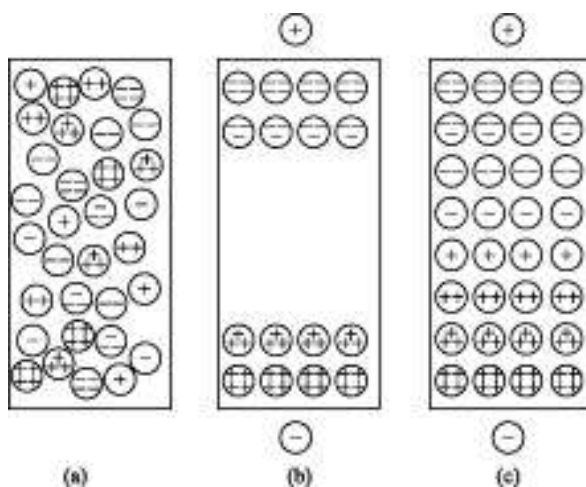


图 3-11 载体两性电解质在电场中形成 pI 梯度的模式图

(a) 原始状态 (b) pI 梯度的形成过程 (c) 形成连续的 pI 梯度

在溶液中的载体两性电解质一方面受溶液 pH 的影响,决定其带电的性质;另一方面它又影响周围环境,使溶液 pH 有所改变。根据载体两性电解质的特性,它在泳动过程中不断地与溶液交换质子,改变了周围溶液的 pH,当达到平衡时,载体两性电解质到达等电点并停留在自己的 pI 区域,pI 即是此处溶液的 pH。所以,随着载体两性电解质 pI 梯度的形成,环境溶液也形成连续的 pH 梯度。由于凝胶的防对流扩散作用,使 pH 梯度保持稳定不变,这样也就形成了从阳极到阴极逐渐增加的平滑而连续的 pH 梯度。

电极溶液通常是由不挥发的酸或碱配制,多数以强酸或强碱被作为宽 pH 范围的电极液,弱酸或弱碱被作为窄 pH 范围的电极液。使用合适的电极液可以增加 pH 梯度的稳定性,提高分辨率。每次实验应使用相同浓度和相同体积的电极液,才能得到重复的实验结果。对于不同 pH 范围的载体两性电解质,阳极、阴极电极溶液可按表 3-5 选用。

表 3-5 用于不同 pH 范围载体两性电解质的电极溶液

pH 范围	阳极	阴极
3.5 ~ 9.5	1 mol/L 磷酸	0.5 mol/L 氢氧化钠
2.5 ~ 4.5	1 mol/L 磷酸	0.4 mol/L HEPES

续表

pH 范围	阳极	阴极
4.0~6.5	0.5 mol/L 乙酸	0.5 mol/L 氢氧化钠
5.0~8.0	0.5 mol/L 乙酸	0.5 mol/L 氢氧化钠
2.5~4.0	1 mol/L 磷酸	2% 载体两性电解质, pH 6~8
3.5~5.2	1 mol/L 磷酸	2% 载体两性电解质, pH 5~7
4.5~7	1 mol/L 磷酸	1 mol/L 氢氧化钠
5.5~7.7	2% 载体两性电解质, pH 4~6	1 mol/L 氢氧化钠
6~8.5	2% 载体两性电解质, pH 4~6	1 mol/L 氢氧化钠
7.8~10	2% 载体两性电解质, pH 4~8	1 mol/L 氢氧化钠

根据等电聚焦的原理,样品加在凝胶上任何位置都可得到相同的结果(图 3-12)。为了不使电泳带畸变和蛋白质变性,不要将样品加在等电点位置和紧靠阳、阴极的位置。如果是未知等电点的样品,可用不同加样量、不同加样位置来确定合适的加样浓度和位置。样品如加在其等电点位置附近,样品溶解度小,不易从滤纸块渗透到凝胶中。一般 pI 在 6 以下的样品置于负极附近, pI 在 6 以上的样品置于正极附近,加样点要离电极至少 1 cm,以防蛋白质变性。加样量取决于样品中蛋白质种类、数量、pH 梯度范围、凝胶厚度及检测方法的灵敏度。高浓度样品可用微量进样器直接加在胶面上,较稀样品用几层擦镜纸浸透样品溶液放在胶面上,聚焦一段时间后,去掉加样滤纸,可减少拖尾现象。一般用考马斯亮蓝 R-250 染色时,对 0.5 mm 厚的凝胶,样品浓度为 0.5~2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,加样体积为 5~20 μL ,如果样品较浓,可直接在凝胶上滴加 1~3 μL 样品。如果用银染法检测,加样量可减少 20~50 倍。

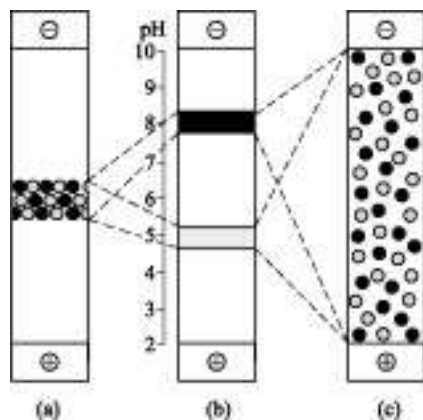


图 3-12 等电聚焦的加样方式

(a) 样品加在凝胶上任何位置 (b) 聚焦后结果相同 (c) 样品混合在整个凝胶中

在等电聚焦过程中电流会越来越小,当样品到达等电点位置时,电流为零,此时认为聚焦完成。为提高分辨率和缩短电泳时间,采用较高的电压,这就要求载体两性电解质导电性能好,电泳装置的冷却效果好,避免凝胶过热,造成样品变性,影响 pH 梯度的稳定性,甚至烧胶。等电聚焦的时间决定于凝胶的 pH 范围、样品的迁移率和电泳的电参数,一般在窄 pH

范围所需电泳时间较长,在宽 pH 范围所需电泳时间相对较短。等电聚焦的时间对电泳分离效果是重要的,聚焦时间不够,不能达到预期的分离效果;聚焦时间过长,pH 梯度会发生改变,样品生物活性丧失,也会影响分离效果。实验操作中,开始电泳时要求恒压 60 V, 15 min,目的在于使泳动快的小分子载体两性电解质在短时间内形成一个粗略的 pH 梯度;此后恒流 8 mA,是为了避免此时介质中带电颗粒较多、电流过高而破坏凝胶;当各种蛋白质逐渐泳动到各自等电点位置时,带电颗粒逐渐减少,出现电阻增大、电压随之增高的现象,当电压升到 550V 时,带电颗粒已大为减少,恒压到 580 V,继续电泳 2~4 h;当电流接近于零时,电泳也到此结束,此时蛋白质颗粒不再泳动,集中在它的等电点位置,因此等电点不同的蛋白质彼此分开。

器材与试剂

1. 实验仪器

稳流稳压电泳仪(100 mA,600 V),水冷式平板等电聚焦电泳槽及配件,可调式移液器(20 μ L),眼科剪子和镊子,擦镜纸,滤纸,坐标纸等。

2. 实验材料

(1) 待测蛋白质样品溶液 称鸡卵清清蛋白、牛血清白蛋白、马血红蛋白、糜蛋白酶原 A 各 1 mg,用 1 mL 超纯水溶解。

(2) 等电点蛋白质标准样品 按照使用说明溶解,其中包含胰蛋白酶原(pI 9.30),植物外源凝集素(碱性带)(pI 8.65),植物外源凝集素(中性带)(pI 8.45),植物外源凝集素(酸性带)(pI 8.15),马肌红蛋白(碱性带)(pI 7.35),马肌红蛋白(酸性带)(pI 6.85),人碳酸酐酶 B(pI 6.55),牛碳酸酐酶 B(pI 5.85), β 乳球蛋白 A(pI 5.20),大豆胰蛋白酶抑制剂(pI 4.55),淀粉葡萄糖苷酶(pI 3.50)。

3. 实验试剂

(1) 40% 载体两性电解质 为略带黄色的水溶液,pH 3.5~10,4 $^{\circ}$ C 保存。

(2) 电极液 阳极液:1 mol/L 磷酸;阴极液:0.5 mol/L 氢氧化钠。

(3) 固定液 35 mL 甲醇,10 g 三氯乙酸,3.5 g 磺基水杨酸,加去离子水并定容至 100 mL。

(4) 考马斯亮蓝 R-250 染色液 称取 0.1 g 考马斯亮蓝 R-250,加入 35 mL 95% 乙醇,10 mL 冰乙酸,混匀,用去离子水定容至 100 mL,必要时过滤。

(5) 脱色液 取 25 mL 95% 的乙醇,10 mL 无水乙酸,加去离子水至 100 mL。

(6) 液体石蜡

电泳试剂均用超纯水配制。300 g/L 凝胶贮液、100 g/L AP、TEMED 同聚丙烯酰胺凝胶净电荷电泳(见实验十二)。

实验步骤

1. 安装电泳槽

本实验采用水冷式平板等电聚焦电泳槽,电泳槽内有冷凝管道,电极板上镶有铂金电

极丝(图3-13a)。平板电泳槽调水平,槽上铺一张滤纸,上面放一块玻璃板(11.5 mm × 11.5 mm × 2 mm),玻璃板上放塑料模具(厚度0.5 mm,中间开孔9 cm × 9 cm)(图3-13b),用铁文具夹将模具和玻璃板固定在水平电泳槽上,在模具上面,文具夹的另一端再放上一块玻璃板。

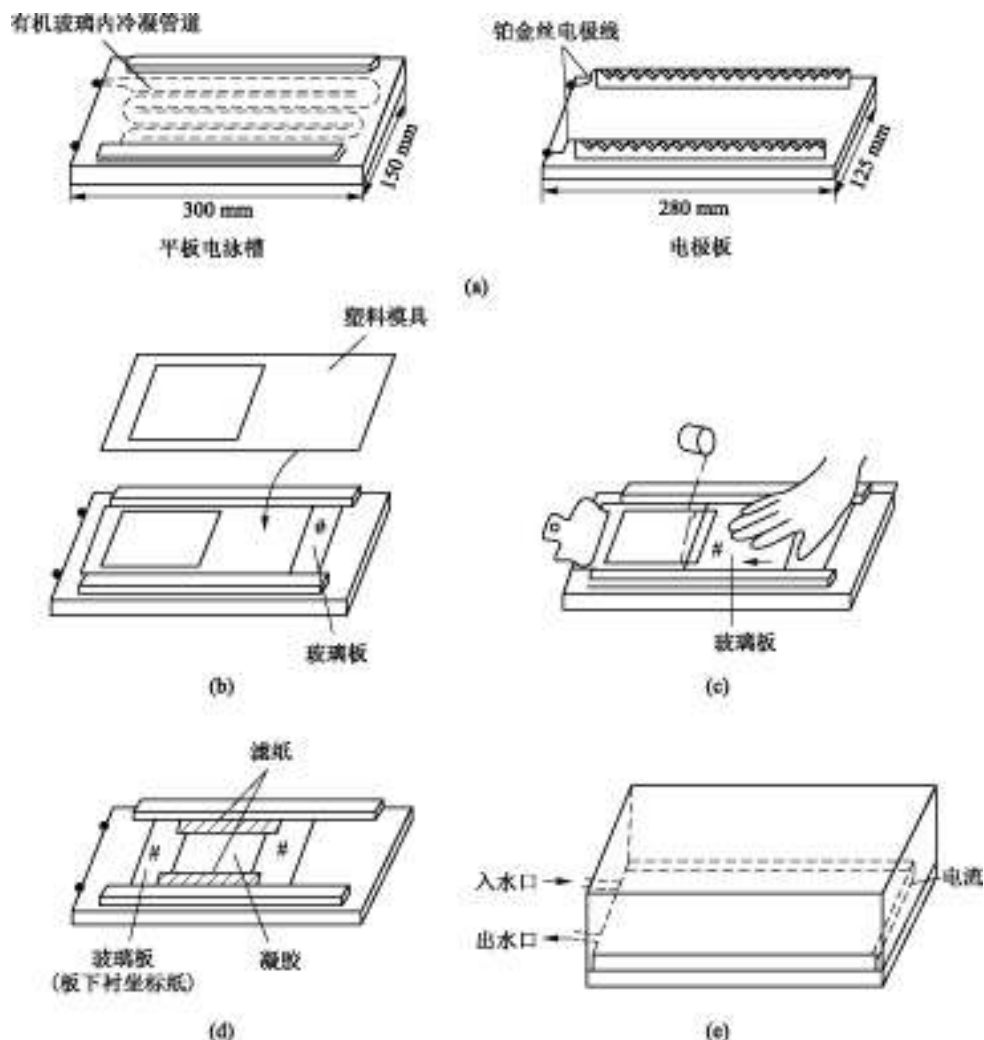


图3-13 聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳操作示意图

(a) 平板电泳槽和电极板 (b) 准备制胶 (c) 制胶 (d) 放置电极条 (e) 电泳

2. 制胶

按照表3-6配制凝胶,凝胶质量浓度 $T=7.5\%$,交联度 $C=3\%$ 。

将凝胶溶液混匀后,从远离文具夹的一端开始灌胶,边灌胶边向文具夹方向推动上面的玻璃板,使模具框内充满凝胶溶液,其中不能有气泡,上面的玻璃板一直推到文具夹处,使两块玻璃板把凝胶溶液封在框内(图3-13c)。

灌胶后室温放置约1 h,凝胶聚合,此时可在模具和凝胶的边缘观察到折光,待凝胶老化

表 3-6 等电聚焦凝胶配方

溶液成分	各成分所需体积
30% 凝胶贮液/mL	2.0
超纯水/mL	5.5
40% 载体两性电解质/mL	0.5
100 g/L 过硫酸铵/ μL	60
TEMED/ μL	8

0.5 h 后,将两块玻璃板小心打开,凝胶和模具会自然地贴在其中一块玻璃板上,小心去掉模具和凝胶周围的残胶。

在电泳槽上涂一层液体石蜡,再铺一张方格坐标纸,坐标纸应浸透石蜡,与电泳槽间无气泡,将带胶的玻璃板放在坐标纸上面,玻璃板与坐标纸之间应无气泡,以保证凝胶板和冷却板之间接触良好。将 1 cm 宽、9 cm 长的两层滤纸条浸透电极液,在一张干滤纸上吸去表面多余的电极液,铺在凝胶两端,使电极条和凝胶紧贴,剪去两端多余的部分,电极条的长度要一致,平行放置。用干滤纸吸干胶面上的残液,即可准备加样(图 3-13d)。

3. 加样

借助冷却板上的坐标纸定位,在接近凝胶中部胶面上加样。取 5~8 层重叠的擦镜纸,用眼科剪刀剪成约 5 mm \times 5 mm 的小块,用眼科镊子夹住,将其浸透样品液,放在凝胶上,使其紧贴胶面,各样品间隔一定距离。微量标准样品可少几层擦镜纸或用可调式移液器直接加在凝胶面上。

4. 电泳

将电极分别放在滤纸电极条的中心,压好电极板,磷酸电极条为阳极,氢氧化钠电极条为阴极,盖好电泳槽上盖,再调电泳槽水平,接通冷凝水,打开恒流恒压电泳仪,开始电泳(图 3-13e)。恒压 60 V,15 min 后,调节恒流 8 mA,电压不断上升,直至 550V 时,关电源;打开盖子,去掉加样纸,以免纸上残留的样品在染色时干扰结果的判断;打开电源,调节恒压 580 V,继续电泳,2~4 h 后电流降为零,停止电泳。在实际电泳中,当凝胶的电流已达到最小值,不再降低,即可认为聚焦完成。

5. 凝胶的处理

(1) 固定 小心取出凝胶,放入固定液中固定 4 h 或过夜,其间更换一次固定液。

(2) 染色 去掉固定液,用脱色液漂洗除去酸溶性的载体两性电解质,然后用考马斯亮蓝 R-250 染色 30 min。

(3) 脱色 倾去染色液,用脱色液浸泡凝胶,并及时更换直至凝胶背景无底色。脱色液中应有适量的醇,用于溶解染料-两性电解质复合物,有利于背景脱色,较高的温度和不断摇动可加速这一过程。

实验结果

1. 标准蛋白质和样品蛋白质的等电聚焦图谱(图 3-14)

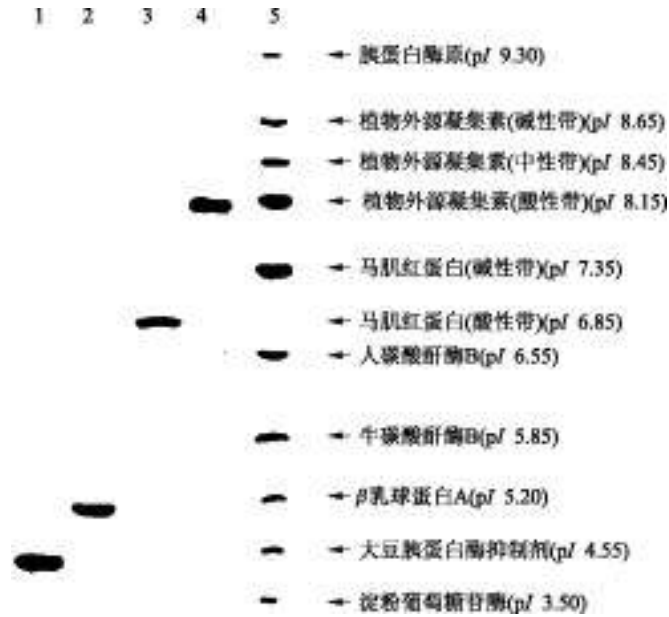


图 3-14 不同等电点蛋白质的等电聚焦电泳图谱

1. 鸡卵清蛋白 2. 牛血清白蛋白 3. 马血红蛋白 4. 糜蛋白酶原 A 5. 等电点蛋白质标准样品

2. 绘制等电点的蛋白质标准品的泳动距离与等电点的关系曲线, 求出待测蛋白质样品的 pI

目前最常用的方法是用等电点蛋白质标准品来做 pH 梯度的测定。已知 pI 的蛋白质标准品与待测蛋白质样品在同一块凝胶上等电聚焦后, 根据蛋白质标准品条带所在的位置对其相应的 pI 做出关系曲线(图 3-15), 再根据待测样品在凝胶上的位置从关系曲线上查出它的 pI 。

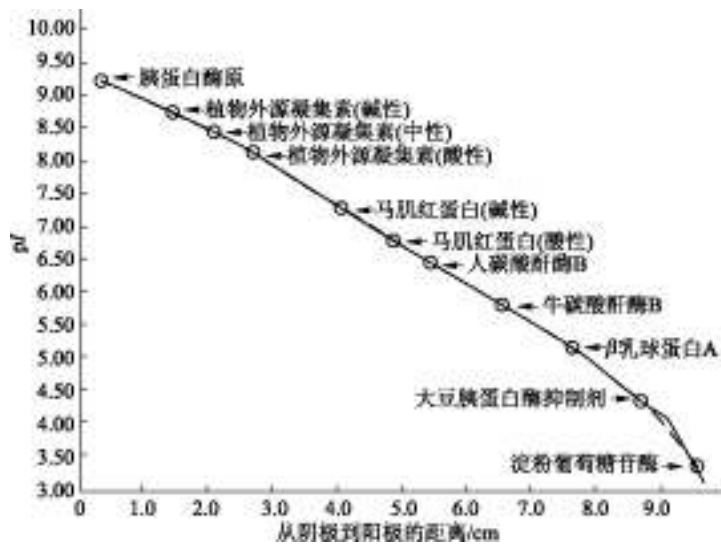


图 3-15 不同等电点的蛋白质从阴极到阳极的泳动距离与等电点关系曲线



注意事项

1. 等电聚焦对支持介质纯度要求较高,在聚焦过程中聚丙烯酰胺凝胶不影响 pH 梯度的形成和蛋白质的分离。一般在等电聚焦中选择聚丙烯酰胺凝胶质量浓度为 5% ~ 8%,交联度约 3%,保证凝胶有良好的机械性能,有弹性和高透明度。

2. 优质的载体两性电解质是得到连续稳定的 pH 梯度、高分辨率等电聚焦的关键因素,宽范围 pH 梯度的载体两性电解质适应范围广,对于具有不同 pI 的蛋白质混合样品或未知蛋白质样品尤其适用;窄范围的 pH 梯度用于已知 pI 的蛋白质样品,可以提供高分辨率,增大加样量。对于未知样品,通常先用宽 pH 范围的载体两性电解质确定待测蛋白质样品的 pI 位置,然后再用合适的窄 pH 范围载体两性电解质以高分辨率精确地测定其等电点。

3. 等电聚焦的样品应溶解在水中或极低盐浓度的缓冲液中,因为盐离子会破坏 pH 梯度,使蛋白质条带畸变,盐离子还会产生高电流导致烧胶,在等电聚焦之前,可以通过透析或凝胶过滤柱层析除盐。样品溶解性要好,否则会产生蛋白质条带的拖尾和纹理现象。一些蛋白质在水中溶解度低,可在样品和凝胶中添加适当浓度的甘氨酸、蔗糖、尿素、无离子去污剂如 Triton X-100、NP-40、Tween 20 和 Chaps 等,保持蛋白质的天然结构,增加蛋白质的溶解度,样品中还可以加入低浓度的还原试剂如 β -巯基乙醇、二硫苏糖醇等,防止蛋白质的氧化,保持酶的生物活性。



思考题

1. 简述等电聚焦测定蛋白质等电点的原理。
2. 在等电聚焦实验操作中应注意哪些细节才能使样品得到很好的分离?

参考文献

- [1] 萧能,余瑞元,陈雅蕙等. 生物化学实验原理和方法. 2版. 北京:北京大学出版社,2005.
- [2] 王重庆,李云兰,李德昌,等. 高级生物化学实验教程. 北京:北京大学出版社,1994.
- [3] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术. 2版. 北京:科学出版社,2005.
- [4] 萨姆布鲁克 J,弗里奇 E F,曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南. 2版. 北京:科学出版社,1993.
- [5] 洪光元,萧能,李建武. 人体乳酸脱氢酶同工酶系统研究(一). 北京大学学报(自然科学版),1987,23(6):99~102.
- [6] 洪光元,李建武,萧能. 人体乳酸脱氢酶同工酶系统研究(二). 北京大学学报(自然科学版),1988,24(2):195~201.
- [7] Bradford M M. A Rapid Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding. Anal Biochem, 1976, 72: 248~254.

- [8] Neuhoff V, Arold N, Taube D, *et al.* Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G - 250 and R - 250. *Electrophoresis*, 1988, 9:255 ~ 262.
- [9] Candiano G, Bruschi M, Musante L, *et al.* Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G - 250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*, 2004, 25: 1327 ~ 1333.
- [10] 周国权, 巫光宏, 黄翠颜, 等. 聚丙烯酰胺凝胶电泳的快速脱色方法. *植物生理学通讯*, 2006, 42(1): 95 ~ 97.
- [11] 胡晓倩, 陈来同, 赵健. SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳染色方法. *中国生化药物杂志*, 2011, 32(2): 128 ~ 130.
- [12] 郭尧君. 薄层等电聚焦技术. *生物物理学报*, 1988, 4(4): 389 ~ 391.