

# 聚丙烯酰胺凝胶电泳

莽克强 徐乃正 方荣祥 编



科学出版社

# 聚丙烯酰胺凝胶电泳

莽克强 徐乃正 方荣祥 编

科学出版社

1975

## 内 容 简 介

本书介绍了聚丙烯酰胺凝胶电泳技术在分离、分析和制备蛋白质、核糖核酸等生物大分子方面的基本原理和具体操作。应用部分着重介绍了蛋白质、核糖核酸的分子量测定及该技术近年来在病毒学研究工作中的一些应用。

本书可供临床化学、食品化学、药理学、生物化学、免疫学等有关科技人员和大专院校师生参考。

### 聚丙烯酰胺凝胶电泳

莽克强 徐乃正 方荣祥 编

\*

科学出版社出版

北京朝阳门内大街 137 号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

\*

1975年8月第一版	开本：787×1092 1/32
1975年8月第一次印刷	印张：4 1/8
印数：0001—5,250	字数：93,000

统一书号：13031·314

本社书号：484·13—10

定价：0.44 元

## 编 者 的 话

在毛主席革命路线指引下，无产阶级文化大革命斗批改逐步深入，三大革命运动蓬勃发展。随着社会主义建设的飞跃前进，对于各种科学新技术的需要也愈来愈多。聚丙烯酰胺凝胶电泳作为一种新的、设备简便、分辨率高的生物化学分离分析技术已得到日益广泛的应用。为了适应生产、教学、科研的需要，我们结合自己的工作收集了一些资料，编写了这本小册子。

本书从原理到具体操作尽可能详细地介绍了盘状聚丙烯酰胺凝胶分析电泳。关于聚丙烯酰胺凝胶电泳的其他方法仅就基本原理作了概括介绍。我们应遵循毛主席关于“**人类总得不断地总结经验，有所发现，有所发明，有所创造，有所前进**”的教导，本着**独立自主、自力更生**的方针，根据具体要求和实际条件，大胆创造适合于自己所需要的设备和方法。目前聚丙烯酰胺凝胶电泳虽已广泛应用于临床化学、食品化学、药理学、生物化学、免疫学以及分子生物学等领域，但限于篇幅及编著者的工作经验，本书应用部分仅列举近年来在病毒学领域中几个方面的进展来说明此种电泳技术所起的重要作用。近几年来随着我国生产、教学、科研广泛使用此种技术，相信一定积累了不少经验和资料，但由于编写时间仓促未能及时收集。

本书承张树政、周家炽同志审阅，虞彩章同志绘图，孙荣钦同志照像。

我们的政治水平和业务水平有限，实践经验不多，书中定有不少缺点错误，希望读者给予批评指正。

编 者

1973. 2.

# 目 录

第一章 引言 .....	1
第二章 基本原理 .....	4
一、丙烯酰胺的聚合 .....	4
二、聚丙烯酰胺的孔径 .....	8
三、缓冲系统的选择 .....	12
四、不连续盘状聚丙烯酰胺凝胶电泳 .....	18
第三章 具体操作 .....	26
一、垂直管型分析盘状电泳 .....	26
二、垂直板型电泳 .....	43
三、垂直柱型制备电泳 .....	48
四、分离区带的鉴定 .....	54
五、聚丙烯酰胺凝胶电泳的其他方法 .....	71
第四章 聚丙烯酰胺凝胶电泳在研究病毒蛋白质和 核酸方面的应用 .....	88
一、蛋白质和核酸分子量的测定 .....	88
二、病毒复制的研究 .....	115
三、植物病毒多型性的研究 .....	119
四、RNA 的序列分析的研究 .....	122

## 第一章 引 言

自从 1959—1964 年利用聚丙烯酰胺凝胶电泳法分离人血清蛋白成功以后,此方法为分离蛋白质、核酸这些大分子化合物提供了极为有力的武器<sup>[14,52]</sup>。在此以前利用区带电泳分离仅是根据组分(离子状态)的自由泳动率的差别,因此当自由泳动率差别很小时就得不到满意的分离结果。如纸电泳的纸只起着支持被分离物质和抗对流作用,而对分离过程本身不起什么作用。1955 年有人首先利用淀粉凝胶做电泳支柱,发现凝胶有分子筛的作用。凝胶有较高的粘度,在电泳时产生一定的摩擦阻力,因此它不仅具有防止对流、减低扩散的能力,还能和正在移动的颗粒相互作用,主动参与分离过程。假若淀粉凝胶的孔洞平均大小接近于所分离的蛋白质分子的大小,那么各种蛋白质分子通过凝胶孔时所受的阻碍程度是和蛋白质的大小、形状有密切关系,这样就为分开自由泳动率很相近的大分子提供了一种简单而有效的方法。以人血清蛋白的分离为例,可看出具有分子筛作用的凝胶电泳的分辨力比纸上电泳要高的多;人血清在纸电泳上通常分辨出 5—6 种蛋白,在淀粉凝胶上则分出 20—30 种。

凝胶电泳有分子筛的作用给人们很大启发。实践证明并不是所有凝胶都能起分子筛的作用,淀粉凝胶的这种作用较明显,琼脂凝胶就很小。琼脂凝胶中往往有电渗现象,对分离有不好的影响。淀粉凝胶电泳能否得到满意的分离结果往往取决于淀粉凝胶的纯度,用天然淀粉往往不能制备出匀一的重复性高的凝胶。因此有人考虑用人工合成的凝胶。

聚丙烯酰胺凝胶就是一种人工合成的凝胶，是丙烯酰胺单体和交联剂甲叉双丙烯酰胺在催化剂的作用下聚合并交联而成的一种凝胶。这种凝胶电泳和淀粉凝胶电泳比较，除具有和淀粉凝胶相似的分子筛作用外，还有如下的一些优点：

1. 不同浓度的淀粉凝胶所具有的孔洞大小至今没有得到确切数据供参考，淀粉是天然产物，不易制备出匀一的、重复性高的凝胶。聚丙烯酰胺是人工合成的多聚体，用调节控制单体浓度或单体和交联剂的比例很容易得到孔洞大小范围广泛的凝胶。因此试验重复性高。

2. 聚丙烯酰胺形成的凝胶比淀粉凝胶机械强度高，弹性大类似橡皮，利于电泳后做各种处理。

3. 聚丙烯酰胺是  $C-C-C-C-\dots$  的多聚体，侧链是不活泼的酰胺基，没有其他离子基，没有电渗作用。如果需要的话也可以把阳离子或阴离子掺入到多聚体中。

4. 设备简单，所需样品量小（1—100 微克），而分辨率又较高。近年来已在开展超微量分析，能检出含量在  $10^{-9}$ — $10^{-12}$  克的样品。

5. 用途较广：对生物高分子化合物（蛋白质、多肽、核酸）能进行分离、定性、定量分析，又能用于制备毫克水平的材料。近几年来利用聚丙烯酰胺凝胶电泳测定蛋白质、核酸分子量的技术日趋成熟。尤其在测定蛋白质分子量方面大有全部取代超离心沉降法之趋势。

常用的聚丙烯酰胺凝胶电泳按凝胶支柱形状可分为以下两种：

### 1. 盘状电泳

Davis 和 Orstein (1964) 首先在直立的玻璃管内(5 毫米 × 6 厘米) 利用不连续的缓冲液、pH 值和不连续的凝胶孔径

进行电泳而命名为 Disc-electrophoresis [Disc 为 Discontinuity (不连续性)的字头];同时又由于样品混合物被分开后形成的带很狭,呈圆盘状(Discoid shape),因此 Disc-electrophoresis 这个名字成了不连续性和盘状的双关语。此后有不少人利用连续的系统也得到了不连续系统那样的盘状效果。因此“disc”一字的“不连续”含意不那样突出了,所以采用盘状电泳的称呼较妥。广义地将所有在直立的玻璃管内的聚丙烯酰胺电泳称之为盘状电泳是可取的<sup>[3]</sup>。盘状电泳设备简单,操作简便,分辨率高,被人们大量应用。无产阶级文化大革命以来,随着我国科学研究的发展,盘状电泳已广泛应用于分子生物学、生物化学、细胞学、微生物学、植物学、动物学、免疫学、酶学等等学科方面的研究以及临床诊断。关于盘状电泳的原理及其方法已有专文介绍<sup>[1]</sup>。

## 2. 垂直板型电泳 (Slab electrophoresis)

将丙烯酰胺聚成长方形或方形薄片状,薄片可大可小,一般 10 多厘米见方,大的可达  $40 \times 20$  厘米。这种电泳虽有一些缺点,如制备凝胶时较盘状电泳复杂,所需电压较高,电泳时间较长,但优点是(1)在同一条件下可同时电泳多个要比较的样品;(2)一个样品在第一次电泳后可将薄片转 90 度进行第二次电泳即所谓双向电泳,可提高分辨力;(3)便于电泳后进行放射自显影的分析。

近年来为了提高分辨率,在上述两种类型电泳基础上发展出凝胶浓度梯度电泳,或将聚丙烯酰胺凝胶电泳和等电聚焦电泳、免疫电泳等结合使用的电泳分析方法。

根据电泳的用途,盘状和垂直板型电泳又有分析用和制备用之分。本书着重介绍盘状分析电泳,读者需用其他种类电泳,可参考这方面专著<sup>[3,5]</sup>和有关文章<sup>[2,4,15]</sup>。



## 第二章 基本原理

### 一、丙烯酰胺的聚合

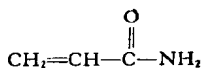
聚丙烯酰胺凝胶是由丙烯酰胺单体和交联剂甲叉双丙烯酰胺在催化剂的作用下聚合成含酰胺基侧链的脂肪族长链，相邻的两个链通过甲叉桥交链起来而形成三维网状结构的凝胶。单体的聚合物化学结构式如下页所示。

常用的催化系统(包括催化剂和加速剂)有以下两种:

**1. 过硫酸铵-TEMED 系统 (TEMED: tetramethylethylene diamine 四甲基乙二胺)** 当 Acr 和 Bis 的溶液中放入这个催化系统后, 过硫酸铵  $[(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8]$  产生出游离氧原子使单体成为具有游离基的状态从而发生聚合作用。聚合的初速率和过硫酸铵浓度的平方根成正比。这种催化系统需要在碱性条件下进行, 如在 pH 8.8 条件下 7% 的丙烯酰胺溶液 30 分钟就能聚合完毕, 在 pH 4.3 时聚合得很慢, 要 90 分钟才能完成; 温度过低、有氧分子或不纯物存在时都能延迟凝胶的聚合。一般在室温下就能很快的聚合。为避免溶液中气泡窝藏有氧分子而妨碍聚合, 在聚合前有必要将溶液分别抽气, 然后再混合。将混合后的凝胶溶液放在近  $0^\circ\text{C}$  就能延迟聚合。

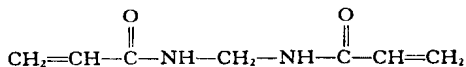
**2. 核黄素-TEMED 系统** 这是个光激发的催化反应。核黄素在光照下分解, 黄素被还原成无色型; 但在有氧条件下无色型又被氧化成有游离基的黄素环, 使聚合作用开始。核黄素催化系统的优点是(1)用量极少(1毫克/100毫升), 因此不

丙烯酰胺:



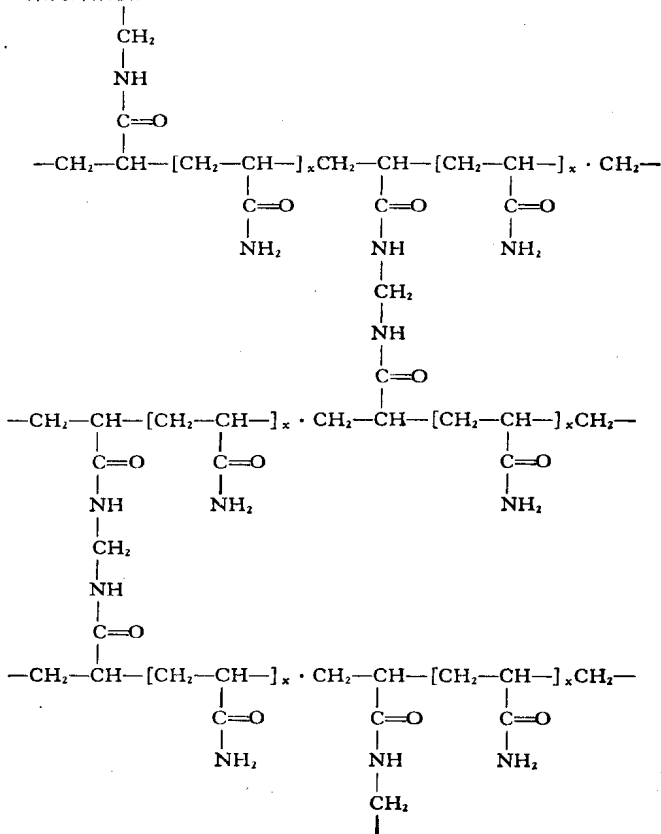
(简称为 Acr)

甲叉双丙烯酰胺:



(简称为 Bis)

聚丙烯酰胺:



会对所分析的样品有任何不良影响；(2) 聚合作用所需时间可以较自由的控制。可变化光照时间、强度使聚合延迟或加速。而过硫酸铵-TEMED 系统的聚合作用所需时间取决于它们的浓度。为了使分析结果重复性高，核黄素催化系统的光照时间、强度最好标准化。

在一定浓度的单体和交联剂存在时这两种催化系统所得到的凝胶柱的机械强度是相似的，但核黄素系统所形成的胶孔比过硫酸铵的要大些。如果将光照时间延长使充分曝光，则两者所形成的胶孔大小没什么区别。

TEMED 是一种加速剂，也可用三乙醇胺代替，但效能不如 TEMED 好，也可用  $\beta$ -二甲基氨丙腈 ( $\beta$ -dimethylamino-propionitrile)，但效能不如前两者。

凝胶的机械性能、弹性是否适中是很重要的，胶太软易于断裂，尤其在制作板型电泳的薄片状凝胶时太软很难操作。太硬则脆，也易折断。凝胶的透明度、粘着度是否合适也影响分离效果。凝胶的机械性能、弹性、透明度和粘着度取决于凝胶总浓度和 Acr 与 Bis 两者之比例。

$$\text{设 } T (\text{Acr 和 Bis 总浓度}) = \frac{a+b}{m} \cdot 100(\%)$$

$$C (\text{交联剂百分比}) = \frac{b}{a+b} \cdot 100(\%)$$

$a = \text{Acr 克数}$ ,  $b = \text{Bis 克数}$ ,  $m = \text{缓冲液体积(毫升)}$

$a:b(W/W)$  是很关键的。当  $a:b < 10$  时，凝胶变脆、硬，呈乳白色； $a:b > 100$  时，5% 的凝胶呈糊状，也易于断裂。欲制备完全透明而又有弹性的凝胶应控制  $a:b = 30$  左右。不同浓度单体对凝胶性质是有影响的，发现 Acr 低于 2%，Bis 在 0.5% 以下就不能聚合了。当增加 Acr 浓度时要适当降低 Bis 的浓度。通常  $T$  为 2—5% 时  $a:b = 20$  左右；5—10%，

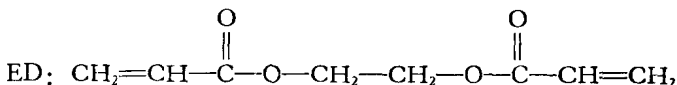
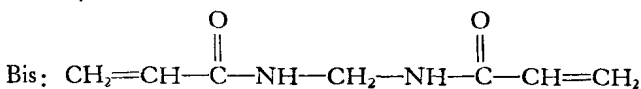
$a : b = 40$  左右;  $15-20\%$ ,  $a : b = 125-200$  左右, 为此 Richard 等 (1965) 提出一个便于选择  $T$  和  $C$  的经验式<sup>[55]</sup>:

$$C = 6.5 - 0.3T$$

此公式可用来计算  $T = 5-20\%$  范围内的  $C$  值。

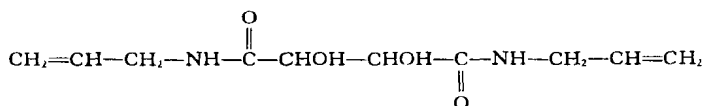
用于研究大分子核酸的凝胶多为  $T = 2.4\%$  的大孔径凝胶, 太软, 不易操作, 最好加入  $0.5\%$  琼脂糖。有的在  $3\%$  凝胶中加  $20\%$  蔗糖也可增加机械强度而又不影响孔径大小。至于粘着度, 一般说只要容器内壁干净, 单体浓度适中, 凝胶与器壁粘着情况令人满意, 不会出现样品渗漏。新制备的凝胶与器壁附着力较大, 随存放时间的延长附着力降低, 有时在电泳结束时一部分胶柱就可能从管壁上滑脱出来。

丙烯酰胺单体的交联剂除 Bis 外还有用二丙烯酸乙酯(Ethylene Diacrylate) 的, 常缩写成 ED, 这两种交联剂的结构如下:



对比这两种交联剂不难看出 ED 中的酯键代替了 Bis 中的酰胺键, 因此 ED 是一种对碱不稳定的交联剂, 由它所交联而成的凝胶能被碱水解成一种线性多聚体溶液。这种交联剂多用来制做可溶性凝胶, 便于回收被分离的样品做定性、定量的测定。如带放射性同位素的样品电泳后, 凝胶被切成薄片直接溶在哌啶(Piperidine) 和海胺(Hyamine) 中进行闪烁计数测量, 或放在浓氨中水解, 将样品吸到玻璃纤维盘上干燥后进行闪烁计数测量。ED 的用量和 Bis 相同, 但 ED 交联的凝胶其有效孔径比同一单体浓度以 Bis 交联的凝胶孔径要大。ED 交联的凝胶不能长期储存, 因有自发溶解的可能。

制备可溶性凝胶的另一种交联剂是 N, N'-二烯丙基酒石酸二酰胺 (N, N'-diallyl tartardiamide), 分子结构式:



这种凝胶在室温下 30 分钟内溶于过碘酸。此种交联剂交联的凝胶和 Bis 交联的很相似。此交联剂很容易由酒石酸二乙酯和烯丙胺来制备。

## 二、聚丙烯酰胺的孔径

凝胶电泳所以有分子筛作用,经典的解释是“孔洞学说”。凝胶是个三维网状结构,某个分子通过这种网孔的能力显然取决于凝胶孔洞的大小和形状,也取决于被分离的物质的形状和大小。当所分离的物质不变,凝胶愈浓时,孔洞愈小,所受阻力也就愈大。根据这一理论推算出凝胶的平均孔径。但往往根据的理论稍有不同而导出不同的结果。下面介绍几种推算方法:

$$1. \quad \bar{P} = \frac{Kd^{[53]}}{\sqrt{c}}$$

$\bar{P}$ : 孔洞的平均直径;

$c$ : 多聚体浓度;

$d$ : 多聚体分子直径,若不是卷曲的分子应为  $5 \text{ \AA}$ ;

$K$ : 常数,取决于凝胶的几何构型。假若多聚体的链是以近于直角交联的,则约为 1.5。

以 5% 凝胶为例可计算出其孔洞平均直径约为  $38 \text{ \AA}$ 。

2. 有人计算 7.5% 凝胶孔洞平均直径为  $50 \text{ \AA}$ , 30% 的为  $20 \text{ \AA}$  左右<sup>[49]</sup>。

3. 用颗粒状聚丙烯酰胺凝胶做色层分析, 测定了总浓度 6.5—20% 的丙烯酰胺凝胶液在六种不同比例的双丙烯酰胺存在时聚合后的孔径大小<sup>[19]</sup>, 结果见图 1。从图 1 可以看出孔洞的大小在很大程度上取决于两者的总浓度  $T$ 。 $T$  值愈大, 孔径相应的变小, 机械强度增强。值得注意的是当  $T$  值不变时, Bis 浓度在 5% 时孔径最小, 高于或低于 5% 时孔径却相应变大。因此就可能有这样的现象出现: 当 Bis 浓度在 5% 以上或以下时, 尽管  $T$  值大, 但却比  $T$  值小而 Bis 为 5% 时的孔径要大。

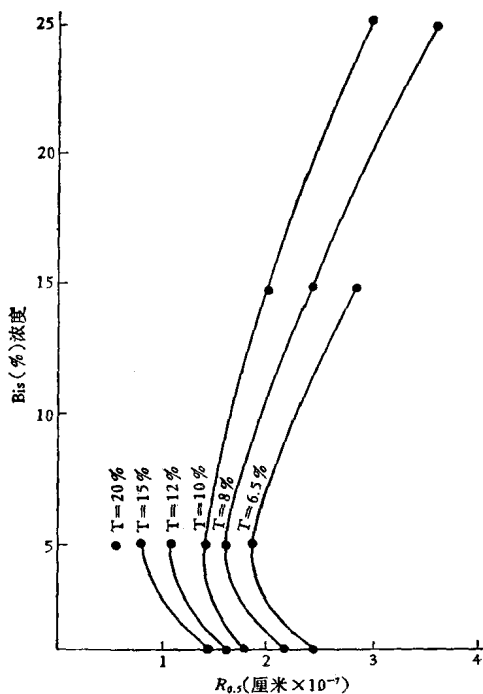


图 1  $R_{0.5}$  (凝胶体积中可利用的 50% 分子的半径) 在丙烯酰胺总浓度 6.5—20% 凝胶范围内与 Bis 百分率的关系

还有另一种意见认为孔洞学说不是解释凝胶电泳现象的唯一理论。某种蛋白质分子在凝胶中的扩散速率是很低的,但在同一凝胶中走电泳,这种蛋白质分子的泳动率就很快。因此认为凝胶的网状结构是弹性的凝胶链,可以在一定电场下被正在移动的蛋白质分子搞弯而通过。所以在扩散的基础上所测得的孔径不过是个有限的参考值,不能真正代表电泳条件下的真实有效孔径<sup>[3]</sup>。

最近有些工作强调交联剂对电泳泳动率的影响,引出所谓交联剂系数( $K_c$ )。当交联剂恒定时此系数是常数值(参看蛋白质分子量测定)。并认为在总浓度  $T$  不变时蛋白质泳动率与  $\sqrt{c}$  呈直线关系 ( $c$  为交联剂之百分比),  $c$  愈大泳动率愈小<sup>[5]</sup>。不管交联剂是以何种方式影响电泳时的泳动率,总之它是影响凝胶孔径很重要的一个参数。绝不象过去所认为的那样,交联剂只不过是增加了凝胶的强度。为了使试验的重复性较高,在制备凝胶时交联剂的浓度,交联剂和丙烯酰胺的比例,催化剂的浓度,聚胶所需时间这些影响泳动率的因子都应尽可能地保持恒定。

要想将一个蛋白质或核酸之类的大分子混合物很好的分开并在胶柱上形成很明显的带,选择一定孔径的凝胶是很关键的。但遗憾的是至今还没有一个普遍规律可循。以蛋白质为例,其种类如此之多,性质也不同,蛋白质混合物中各组分的组合更是千变万化,因此如何利用聚丙烯酰胺凝胶电泳很好地把一个蛋白质混合物的各组分分开,经验多于理论。不过在选择某种凝胶浓度时首先考虑一下所要分析的物质的大小和它的自由泳动率是必要的。从实践得到这样的看法:要想得到较好的分析结果,胶的孔径应大约是蛋白质分子平均大小的一半。例如肌红蛋白和细胞色素分子的半径为 2 毫微米,那么可选择平均胶孔半径为 1 毫微米的凝胶浓度(可参考

图 1)。显然这种实践经验使人更加相信 Gordon 所指出那样，在电泳时胶孔扩大了，足以使比孔径还大的蛋白质分子通过。

实用中，常按样品的分子量大小来选择适宜的凝胶孔径。例如：

分子量范围	适用的凝胶浓度 %
蛋白质	
$< 10^4$	20—30
$1-4 \cdot 10^4$	15—20
$4 \cdot 10^4-1 \cdot 10^5$	10—15
$1-5 \cdot 10^5$	5—10
$> 5 \cdot 10^5$	2—5
核酸 (RNA)	
$< 10^4$	15—20
$10^4-10^5$	5—10
$10^5-2 \times 10^6$	2—2.6

常用的所谓标准凝胶是指浓度为 7.5% 的凝胶，大多数生物体内的蛋白质在此凝胶中电泳能得到满意的结果。当分析一个未知样品时，常先用 7.5% 的标准凝胶或用 4—10% 的凝胶梯度来试测，选出适宜的凝胶浓度。

从图 2 可看出大多数蛋白质被分开的程度是随胶孔变小而增大的。但值得注意的是  $\gamma$ -球蛋白 ( $\gamma$ ) 和肌红蛋白 (MYO) 这两种蛋白质在小孔胶上分的最好，与此相反的是牛血清蛋白的二聚体 ( $BSA_2$ ) 和 MYO 这组蛋白质在胶孔较大时分的开，随着胶孔变小直到平均胶孔直径为 1.3 毫微米时这两个蛋白质却分不开了，显然在大于 1.3 毫微米时分子小的蛋白质 ( $BSA_2$ ) 泳动率高，但小于 1.3 毫微米时却是分子大的蛋白质 (MYO) 泳动率高，蛋白质分子量和泳动率之间的关系颠倒了。可见在一定的缓冲液条件下用一种所谓最适孔洞的胶



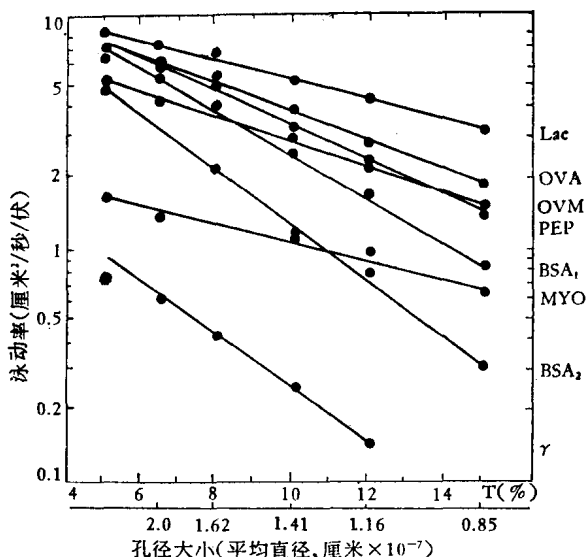


图2 几种蛋白质的泳动率和凝胶浓度的关系

图中几种蛋白质泳动率对数和孔径呈直线关系。凝胶中的甲叉双丙烯酰胺浓度为5%，pH 8.83。Lac:  $\beta$ -乳球蛋白；OVA: 卵白蛋白；OVM: 类卵粘蛋白；PEP: 胃蛋白酶；BSA<sub>1</sub>, BSA<sub>2</sub>: 牛血清白蛋白单体和二聚体；MYO: 肌红蛋白； $\gamma$ : 牛  $\gamma$ -球蛋白。

柱就能将所有蛋白质很清楚地分开的看法往往是不正确的。因此分析一个蛋白质混合物时在一定条件下（一定的 pH 值，一定的胶浓度）得到的单一的区带很可能是个不均一的区带。很可能这个“单一的带”在另一种 pH 条件和另一种胶浓度时会呈现出至少是两种蛋白质。

### 三、缓冲系统的选择

要想利用聚丙烯酰胺凝胶电泳将某个样品成功地分离，除选择适当的凝胶浓度外，所选用的缓冲系统也是很关键的。