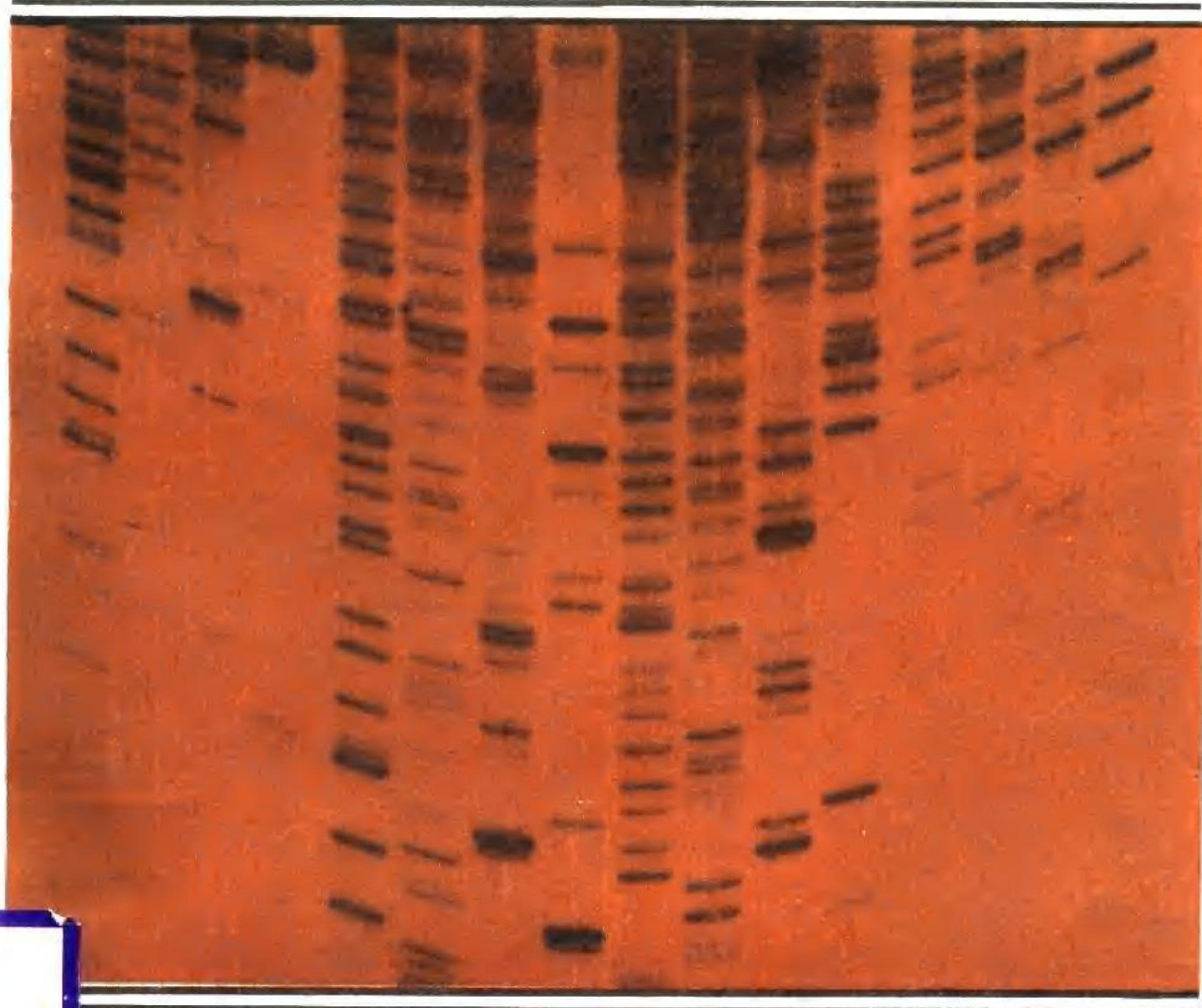


核酸的凝胶电泳

实践方法

〔英〕D. 里克伍德 B. D. 黑姆斯 主编



0.3

科学出版社

内 容 简 介

本书详细地论述了凝胶电泳技术在分离、分析和制备核酸上的应用。主要内容包括 RNA 和 DNA 的凝胶电泳,核酸双向凝胶电泳,DNA 和 RNA 的序列分析,核蛋白的电泳等等。书中着重强调现代使用的凝胶电泳技术的实践,这对我国从事生物化学、遗传学和分子生物学的科研工作者,有关工、农、医的大专院校的师生很有参考价值。

Edited by D. Rickwood and B. D. Hames
GEL ELECTROPHORESIS OF NUCLEIC ACIDS
A Practical Approach
IRL Press Limited, 1982

核 酸 的 凝 胶 电 泳

实 践 方 法

【英】D. 里克伍德 B. D. 黑姆斯 主编

赵大健 孙存祯 齐义鹏 译

齐义鹏 校

责任编辑 赵甘泉

科 学 出 版 社 出 版

北京朝阳门内大街 137 号

中国科学院科技印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

1989 年 2 月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

1989 年 2 月第一次印刷 印张: 11 1/2

印数: 0001—1,550 字数: 259,000

ISBN 7-03-000593-7/Q·109

定价: 9.40 元

前 言

分离技术的进展在生物学研究中占有举足轻重的地位。在各种生化技术中,最重要的是凝胶电泳。本书及其姐妹篇*详细讨论了凝胶电泳分离生物大分子的实验程序,每本书的重点都偏重在凝胶电泳的应用方面,对于那些有重要实用价值的章节我们几经修订以避免过多重复。我们衷心感谢有关作者,尤其出版者,对我们工作的信任、理解和支持。

D. Rickwood 和 B.D. Hames

* 即指《蛋白质的凝胶电泳》,此书已有中译本,1986年科学出版社出版。——译者注

重 要 说 明

凝胶电泳的健康措施

一、用于凝胶电泳的化学物质中,多数对人体有害,少数至今仍不了解。所以,实验人员在使用本书中提到的各种化学物质时,首先要了解一些必要的预防措施,这一点非常重要。由于丙烯酰胺是一种已知的烈性神经毒素,因而操作时应特别小心。不含有未聚合单体的聚丙烯酰胺凝胶是无毒的。

二、在使用凝胶电泳装置时,如果没有电安全设备的话,那就应该采取谨慎态度。使用非商品标准仪器时,就有碰到非常情况的可能,应加倍小心地操作。为安全起见,建议使用仪器前,由具有电学知识的人员检查全部仪器。

缩 写

A_{540}	波长 540nm 的吸收	ddH ₂ O	重蒸水
A	腺嘌呤(仅用作序列的一部分)	ddNTP	双脱氧核苷酸三磷酸
A	安培	DMAFN	3-二甲基氨基丙腈
ABM-paper	氨基苯甲基纸	DMS	硫酸二甲酯
AC	交流电	DMSO	二甲基亚砷
% acrylamide	以总单体(即: 丙烯酰胺和交联剂)表示的聚丙烯酰胺凝胶浓度	DNase	脱氧核糖核酸酶
Ara CTP	阿拉伯糖酰 CTP	dNTP	脱氧核苷酸三磷酸
BAC	N,N'-双丙烯基脒胺	dpm	每分钟蜕变数(60 贝可)
Bisacrylamide	N,N'-甲叉双丙烯酰胺	DTT	二硫苏糖醇
bp	碱基对	EDTA	乙二胺四乙酸
Bq	贝可(1 次蜕变/秒)	G	鸟嘌呤
C	胞嘧啶	g	克
cDNA	互补 DNA	Xg	离心力(x 单位重力场)
Ci	居里(3.7×10^{10} 贝可)	h	小时
cpm	每分钟多少计数(放射性的精确数量取决于同位素及所使用的测定方法)	HEPES	N-2-羟乙基 哌 嗪-N'-2-乙烷磺酸
% crosslinker	以总单体数(即: 丙烯酰胺和交联剂)表示	HTAB	十六(烷)基三甲基溴化铵
CTAB	十六(烷)基三甲基溴化铵	i.d.	内径
DATD	N,N'-二烯丙基酒石酸二酰胺	IPTG	异丙基硫代- β -D-半乳糖苷
DBM-paper	重氮苯氧甲基纸	kb	千碱基对
DC	直流电	kBq	千贝可($Bq \times 10^3$)
		kV	千伏
		mol/L	摩尔浓度
		M	迁移率
		mA	毫安
		MBq	兆贝可($Bq \times 10^6$)

目 录

重要说明	(1)
缩写	(2)
第一章 RNA 的凝胶电泳.....Don Grierson	(3)
1. 引言	(3)
2. 管状聚丙烯酰胺凝胶电泳	(4)
2.1 设备	(4)
2.2 制备凝胶	(4)
2.3 电泳设备的组装	(6)
2.4 样品制备和加样	(6)
2.5 凝胶的电泳	(7)
2.6 凝胶扫描	(8)
2.7 凝胶切片	(8)
2.8 凝胶切片放射性的测定	(9)
2.9 RNA 的洗脱和回收	(10)
3. 管状凝胶法的若干改进	(11)
3.1 电泳前 DNA 的去除	(11)
3.2 加样前 RNA 的变性	(11)
3.3 非控制温度下的电泳	(11)
3.4 梯度凝胶	(12)
3.5 可溶性聚丙烯酰胺凝胶	(12)
3.6 琼脂糖-丙烯酰胺复合凝胶	(13)
3.7 其他电泳缓冲液	(13)
4. 变性凝胶	(13)
4.1 甲酰胺凝胶	(13)
4.2 尿素凝胶	(14)
4.3 羟甲基汞凝胶	(14)
5. 分子量的测定	(15)
5.1 非变性凝胶	(15)
5.2 变性凝胶	(16)
6. 板状聚丙烯酰胺凝胶电泳	(16)
6.1 装置	(16)
6.2 凝胶配方	(17)
6.3 灌胶	(19)
6.4 电泳	(20)
6.5 板状凝胶中 RNA 的检测和回收	(20)
6.6 RNA 转移至重氮苄氧甲基纸上的杂交分析	(23)
7. 聚丙烯酰胺凝胶电泳存在的问题及其解决办法	(25)

8. 组蛋白信使 RNA 的纯化: 实例研究	(28)
参考文献	(29)
第二章 DNA 的凝胶电泳Paul G. Sealey 和 Ed M. Southern	(31)
1. 引言	(31)
2. 主要技术及其应用	(31)
2.1 装置	(31)
2.2 非变性凝胶缓冲液	(33)
2.3 变性凝胶缓冲液	(34)
2.4 凝胶制备	(34)
2.5 样品制备和加样	(37)
2.6 凝胶电泳标准 DNA 的大小	(38)
2.7 电泳条件	(38)
2.8 电泳后的凝胶分析	(39)
2.9 从琼脂糖凝胶回收 DNA 片段	(41)
2.10 用杂交法分析 DNA 片段	(43)
3. DNA 的大规模制备性凝胶电泳	(46)
3.1 环形制备装置	(46)
3.2 线形制备装置	(52)
3.3 分级分离的实例	(55)
4. 致谢	(58)
参考文献	(58)
第三章 核酸双向凝胶电泳Rupert De Wachter 和 Walter Fiers	(60)
1. RNA 双向凝胶电泳导论	(60)
1.1 影响 RNA 在聚丙烯酰胺凝胶中电泳迁移率的因素	(60)
1.2 双向凝胶系统的主要类型	(61)
2. RNA 双向电泳分离的仪器和实验程序	(63)
2.1 第一向电泳分离	(63)
2.2 第二向电泳分离	(65)
2.3 程序的变动与修正	(66)
2.4 温度控制	(67)
2.5 放射自显影	(67)
2.6 无放射性 RNA 的检测	(68)
2.7 切片放射性的测定	(68)
2.8 从凝胶中回收 RNA	(68)
3. 双向电泳分离 RNA 的实例	(69)
3.1 寡核苷酸的分离	(69)
3.2 RNA 片段的分离	(73)
3.3 小分子 RNA 的分离	(75)
3.4 mRNA 的分离	(76)
4. DNA 双向凝胶电泳概述	(79)
5. 限制片段的常规凝胶电泳分离 DNA	(79)

5.1 电泳分离的基础	(79)
5.2 第一向凝胶电泳分离	(79)
5.3 第二向凝胶电泳分离	(80)
5.4 技术应用实例: 病毒 DNA 限制酶切片段的分离	(81)
6. 变性梯度凝胶分离DNA限制酶切片段	(82)
6.1 分离的基础	(82)
6.2 装置	(82)
6.3 第一向分离	(83)
6.4 第二向分离	(84)
6.5 凝胶的染色和放射自显影	(85)
6.6 技术应用实例: 细菌 DNA 限制酶切片段的分离	(85)
7. 致谢	(85)
参考文献	(86)
第四章 DNA 序列分析	R. Wayne Davies (87)
1. 引言	(87)
2. 用链终止法进行 DNA 序列分析	(89)
2.1 仪器和材料	(89)
2.2 微量液体的操作	(90)
2.3 引物片的特征	(91)
2.4 DNA 片段的分离	(91)
2.5 单链 DNA 模板的制备	(96)
2.6 引物和模板的退火	(97)
2.7 引物 DNA 的合成反应	(98)
2.8 核糖取代反应: 除去引物片段的另一种方法	(101)
2.9 链终止法测定 DNA 序列的应用	(102)
3. DNA 序列分析用聚丙烯酰胺凝胶的制备	(104)
3.1 仪器	(104)
3.2 材料	(106)
3.3 制备凝胶模型	(106)
3.4 贮备液	(106)
3.5 灌胶	(107)
3.6 制备电泳凝胶	(107)
3.7 加样	(108)
3.8 电泳	(108)
3.9 制备放射自显影凝胶	(108)
3.10 放射自显影	(109)
4. 链终止序列测定中放射自显影图谱的阅读和释意	(109)
4.1 凝胶放射自显影图谱释义中的一般性问题	(110)
5. M13 序列分析系统	(111)
5.1 噬菌体 M13 的特征	(111)
5.2 M13 克隆系统	(112)

5.3 M13 克隆系统的应用	(113)
5.4 用 M13 系统进行链终止序列分析	(116)
6. DNA 序列的化学分析法	(119)
6.1 主要方法步骤	(119)
6.2 仪器和材料	(120)
6.3 DNA 片段的用量和纯化	(121)
6.4 DNA 片段的末端标记	(121)
6.5 标记一端的 DNA 片段的分离	(125)
6.6 碱基特异性的裂解反应	(126)
6.7 反应产物的电泳	(129)
6.8 Maxam-Gilbert 序列分析凝胶的放射自显影图谱的阅读与释意	(129)
7. 计算机的使用	(129)
参考文献	(129)

第五章 RNA 序列分析James M. D'Alessio (131)

1. 引言	(131)
2. 用于序列分析的 RNA 分离	(132)
3. RNA 微克数量级的处理	(132)
3.1 核糖核酸酶的预防	(132)
3.2 反应容器	(133)
3.3 RNA 的乙醇沉淀	(133)
4. 序列分析用 RNA 的末端标记综述	(133)
4.1 5' 末端标记	(133)
4.2 3' 末端标记	(134)
4.3 制备性凝胶电泳	(134)
5. 序列分析所用末端标记 RNA 的制备	(135)
5.1 除去帽子结构	(135)
5.2 用(γ - 32 P)ATP 和 T4 多核苷酸激酶标记 5' 末端	(136)
5.3 用(5'- 32 P)pCp 和 T4RNA 连接酶标记 3' 末端	(136)
5.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化 32 P-RNA	(137)
5.5 从聚丙烯酰胺凝胶中洗脱 32 P-RNA	(138)
6. 序列分析前的 RNA 专一性裂解	(139)
6.1 核糖核酸酶 H 的片段化战略	(139)
6.2 RNA 的位点专一性切割	(139)
7. RNA 的碱基专一性切割: 酶促序列分析	(140)
7.1 概述	(140)
7.2 RNA 酶法序列分析的步骤	(141)
7.3 RNA 的碱水解	(142)
8. RNA 的碱基专一性切割: 化学序列分析法	(142)
8.1 概述	(142)
8.2 RNA 化学序列分析的程序	(143)
9. RNA 序列分析用凝胶	(145)

9.1 主要考虑的因素	(145)
9.2 薄层序列分析凝胶的灌胶	(146)
9.3 序列分析凝胶的放射自显影	(147)
9.4 放射自显影图谱的解读	(147)
参考文献	(149)
第六章 核蛋白的电泳	Graham H. Goodwin 和 Albert E. Dahlberg (150)
1. 核小体的电泳	(150)
1.1 引言	(150)
1.2 仪器	(150)
1.3 贮备液	(151)
1.4 样品的制备	(152)
1.5 聚丙烯酰胺凝胶平板的制备	(152)
1.6 加样与电泳	(153)
1.7 各种核小体带的检测	(153)
1.8 从凝胶中提取核小体颗粒	(154)
1.9 核小体中蛋白质和 DNA 的回收与分析	(155)
1.10 可能出现的问题及其解决办法	(156)
1.11 核小体的双向电泳	(157)
2. 核糖体和多核糖体的电泳	(159)
2.1 引言	(159)
2.2 仪器	(159)
2.3 贮备液	(160)
2.4 样品制备	(160)
2.5 琼脂糖-丙烯酰胺复合凝胶的制备	(161)
2.6 加样与电泳	(162)
2.7 凝胶染色	(162)
2.8 双向凝胶电泳	(162)
2.9 各种复合凝胶的应用	(163)
2.10 可能出现的问题及其矫正措施	(167)
参考文献	(168)
附录 I 核酸分子量的标准试剂	Stephen Minter 和 Paul Sealey (169)
II 供应电泳专用商品的厂商	(173)

重 要 说 明

凝胶电泳的健康措施

一、用于凝胶电泳的化学物质中，多数对人体有害，少数至今仍不了解。所以，实验人员在使用本书中提到的各种化学物质时，首先要了解一些必要的预防措施，这一点非常重要。由于丙烯酰胺是一种已知的烈性神经毒素，因而操作时应特别小心。不含有未聚合单体的聚丙烯酰胺凝胶是无毒的。

二、在使用凝胶电泳装置时，如果没有电安全设备的话，那就应该采取谨慎态度。使用非商品标准仪器时，就有碰到非常情况的可能，应加倍小心地操作。为安全起见，建议使用仪器前，由具有电学知识的人员检查全部仪器。

缩 写

A_{540}	波长 540nm 的吸收	ddH ₂ O	重蒸水
A	腺嘌呤(仅用作序列的一部分)	ddNTP	双脱氧核苷酸三磷酸
A	安培	DMAPN	3-二甲基氨基丙腈
ABM-paper	氨基苯甲基纸	DMS	硫酸二甲酯
AC	交流电	DMSO	二甲基亚砷
% acrylamide	以总单体(即: 丙烯酰胺和交联剂)表示的聚丙烯酰胺凝胶浓度	DNase	脱氧核糖核酸酶
Ara CTP	阿拉伯糖酰 CTP	dNTP	脱氧核苷酸三磷酸
BAC	N,N'-双丙烯基脒胺	dpm	每分钟蜕变数(60 贝可)
Bisacrylamide	N,N'-甲叉双丙烯酰胺	DTT	二硫苏糖醇
bp	碱基对	EDTA	乙二胺四乙酸
Bq	贝可(1 次蜕变/秒)	G	鸟嘌呤
C	胞嘧啶	g	克
cDNA	互补 DNA	Xg	离心力(x 单位重力场)
Ci	居里(3.7×10^{10} 贝可)	h	小时
cpm	每分钟多少计数(放射性的精确数量取决于同位素及所使用的测定方法)	HEPES	N-2-羟乙基 哌.嗪-N'-2-乙烷磺酸
% crosslinker	以总单体数(即: 丙烯酰胺和交联剂)表示	HTAB	十六(烷)基三甲基溴化铵
CTAB	十六(烷)基三甲基溴化铵	i.d.	内径
DATD	N,N'-二烯丙基酒石酸二酰胺	IPTG	异丙基硫代- β -D-半乳糖苷
DBM-paper	重氮苯氧甲基纸	kb	千碱基对
DC	直流电	kBq	千贝可($Bq \times 10^3$)
		kV	千伏
		mol/L	摩尔浓度
		M	迁移率
		mA	毫安
		MBq	兆贝可($Bq \times 10^6$)

第一章 RNA的凝胶电泳

Don Grierson

1. 引言

电泳,一般是指在电场作用下溶液中各种离子和带电荷大分子的运动。其移动速率取决于分子的大小、形状、所带的电荷、使用的电流以及介质的阻抗。区带电泳是在支持介质中分离各种带电分子,使具有不同迁移率的带电分子列成明显的区带,从而和在游离溶液中进行的所谓界面电泳相区别。

本世纪60年代中期,应用电泳方法成功地分级分离了RNA,到60年代末,这种卓越的分离方法已成为常规分析法。成功的主要原因是RNA分离方法和操作技术的改进以及电泳支持凝胶的采用。基本凝胶技术没有复杂的理论,而是通过不断试验和修正发展起来的。在电场中只要pH适宜,带负电的RNA就会向着阳极移动。因为大分子通过凝胶的移动比小分子更缓慢,因此,选用一种孔径大小合适的凝胶,就可以分离已知大小范围的RNA,从而达到分级分离的目的。

电泳使用的电解质,一般由水溶性缓冲液组成,其中包括一种螯合剂如乙二胺四乙酸(EDTA)和一种核酸酶抑制剂如十二烷基硫酸钠(SDS)。为了某种目的,降低二级结构效应是很重要的,也可加入变性剂代替水作为溶剂。影响RNA分离的因素很多,譬如,增加电流引起迁移速度增大,但电流又会产热,产热过多,又引起区带拖尾与加宽,反而影响分离效果;增加离子强度将使迁移率降低,如果为了补偿这点而加大电流,那么由于产热量增加,重又产生不利影响。另外,离子强度太低,又会明显降低溶液的缓冲能力,并导致pH改变。

电泳是在管状或板状凝胶装置中完成的。许多种凝胶物质,如琼脂、琼脂糖和聚丙烯酰胺已被成功地采用。琼脂和琼脂糖凝胶的制备是将它们的颗粒材料在适当电解质缓冲液中加热、灌胶并使之冷却而成。凝胶分辨率取决于琼脂或琼脂糖的浓度:稀胶适于分离大分子RNA,浓胶适于小分子量RNA的分离。

聚丙烯酰胺凝胶是在电解质中溶解丙烯酰胺和N, N'-甲叉双丙烯酰胺并加化学催化剂聚合而制成的。丙烯酰胺浓度和加入的甲叉双丙烯酰胺交联剂比例决定了凝胶的物理性质与分辨率。本章最后部分将叙述管状和板状凝胶中随聚丙烯酰胺浓度不同得到不同分辨率的许多例子(图2,11,12和16)。孔径大小范围很宽的凝胶(通过聚丙烯酰胺的再生得到)使用极其广泛,另一些凝胶则用于特殊目的。但有些研究人员发现,为了分离非常大的RNA,需用极稀的聚丙烯酰胺凝胶,但操作困难,加入少量琼脂以增强其机械强度,可以克服这一缺陷,或者干脆就使用琼脂糖。

多数情况下,电泳时RNA分子泳动的距离与其分子量的对数($\log_{10}$)呈反比,然而,碱基成分、二级结构以及其他因素会改变这种关系。为了精确测定分子量,电泳需在完全

变性条件下进行,例如,在凝胶体系内加入甲基氢氧化汞或甲酰胺,后面将讨论这些技术。

详细讨论 RNA 凝胶电泳的所有各种细微变化是不可能的,因此,本章只介绍几种最常用的方法及其使用范围。然而,方法的最终确定要根据实验者本人的需要,也可根据自己的经验加以适当改进。

2. 管状聚丙烯酰胺凝胶电泳

2.1 设备

管状聚丙烯酰胺凝胶电泳用来分析微量样品或分析那些已被分离过的微量 RNA 是相当方便的。当然,也可按比例放大成为制备性电泳,表 1 列出了所需设备。有了合适的电泳设备和凝胶管(图 1),就可不花很多钱而又能很容易地在实验室里安装起来,或者干

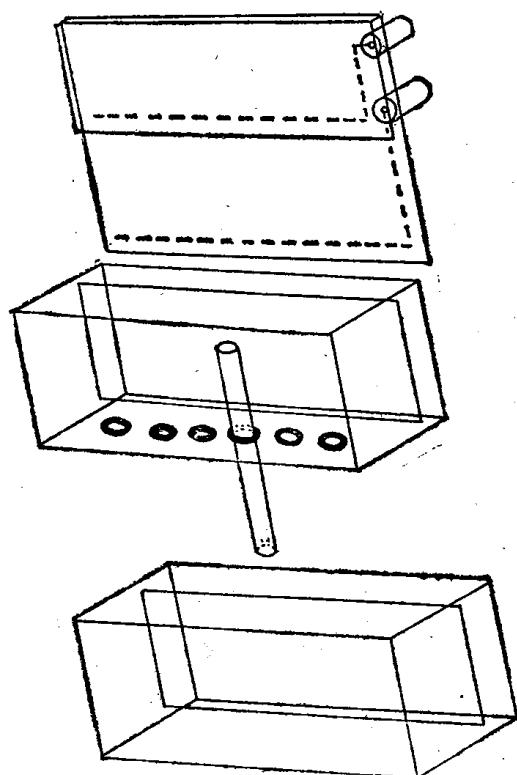


图1 管状凝胶电泳装置。许多实验室使用这种装置,由 3mm 厚有机玻璃板制成的两个矩形电泳槽和两个电极组成。上槽安在下槽上,上槽基部钻有孔,安放凝胶管,另加橡皮垫圈使管固定在适当的位置上。有机玻璃和铂丝组成的电极元件由两根导线分别恰当地连接到上下两个槽内。电泳装置的尺寸取决于凝胶管的大小与数目。应考虑到 pH 变化和电解产物在电极附近密集,故应使凝胶管避开电极加以保护。

脆从经销部门购买现成的全套系统。用氯仿粘合或熔凝 3mm 厚的有机玻璃板制成电泳槽。用白金丝做电极。把一定大小内径的有机玻璃管切成所需长度作为凝胶管,最好不用玻璃管,因为凝胶往往粘在玻璃壁上,不易回收分析。

2.2 制备凝胶

表 2 和表 8 列出了制备 2—10% 聚丙烯酰胺凝胶的成分,图 2 显示了 2.4%、3% 和

表1 管状聚丙烯酰胺凝胶电泳所需设备

电泳

- (1) 有机玻璃电泳装置(见图1)。
- (2) 凝胶管,尽可能用有机玻璃制作。容积不定,例如,把0.6或0.9cm内径管切成8—12cm长。内径过大,散热慢,不宜采用。
- (3) 性能良好的真空泵。
- (4) 500V, 100mA 电源装置;稳压不需稳流。

凝胶扫描

- (5) 凝胶扫描仪。有几种通用型号,例如Joyce-Loebl有限公司生产的“Polyfrac”,或带有凝胶扫描附加装置的分光光度计。要有两面平行的石英玻璃小杯或小管,在电泳之后把凝胶放进去。另外,可在石英玻璃管内电泳,原位扫描,但这样的装置更为昂贵。

放射性的测定

- (6) 凝胶切片机。要把2.2%或2.4%的稀胶精确地切成薄片是不容易的,除非首先冰冻,然后用自动切片机(例如,Joyce-Loebl公司出品)切才行。较浓的凝胶不经冰冻即可切成薄片。用刀片切也可以,但不精确。
- (7) 闪烁计数器或Planchette计数器。

10% 凝胶的分辨率。丙烯酰胺有毒,其毒害作用是累积性的,注意不要吸入,也不要接触皮肤。

制备凝胶之前,应暂时密封凝胶管底部,然后垂直固定在架上或电泳装置上。用密封薄膜(Parafilm)、橡皮塞或者是用玻棒塞住,与管内径相等的一小段塑料管封闭凝胶管底也可。用凝胶缓冲液和水把丙烯酰胺贮备液稀释到合适浓度(表3),溶解氧有抑制胶体凝聚的作用,所以使用真空泵抽气约30秒钟排除其中溶解的氧是必需的。抽真空时应使溶

表2 制备聚丙烯酰胺凝胶的贮备液

丙烯酰胺贮备液

丙烯酰胺	15g
甲叉双丙烯酰胺	0.75g
用蒸馏水定容到	100ml

配制最终浓度5%以上的丙烯酰胺,可把甲叉双丙烯酰胺降至每100毫升0.375g。丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺纯度要高,可以购买,也可用下述方法制备:

- (1) 在通气橱内用加热罩加热,50℃溶解70g丙烯酰胺于1升氯仿中,趁热抽滤,-20℃冰冻成为结晶,再把结晶在预冷漏斗中过滤,预冷氯仿冲洗,使用前彻底干燥。
- (2) 在通风橱用加热罩,在40—50℃把10g甲叉双丙烯酰胺溶于1升丙酮,趁热过滤,然后冷至-20℃,滤出结晶,用预冷丙酮冲洗,应用前彻底干燥。

注意:不要吸入、吞下,也不要让丙烯酰胺接触皮肤,其毒效是累积的。

凝胶缓冲液^a:

Tris 碱	21.7g(180mmol/L)
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	23.8g(150mmol/L)
EDTA·Na ₂ ·2H ₂ O	1.85g(5mmol/L)
用蒸馏水定容到	1升

室温下调缓冲液至pH7.7

催化剂: N,N,N',N'-四甲基乙二胺(TEMED)

新制的10%过硫酸铵[(NH₄)₂S₂O₈]

电极缓冲液: 同凝胶缓冲液。使用时稀释5倍,含有0.2%SDS。

^a 括号中列出的试剂浓度,系凝胶缓冲液的最终浓度。

液快速冒泡,以达到足够的真空程度。即使氧未被排净,胶体也会聚合,只是用低浓度丙烯酰胺时,常形成软凝胶或不均一凝胶。隔夜凝胶如不排除气泡,往往难以凝聚。排气后加入四甲基乙二胺(TEMED)和过硫酸铵(聚合催化剂),缓慢混合,立即注入凝胶管,然后用巴斯德移液管或弯针注射器,小心地覆盖 1cm 左右厚的水层,在聚合的凝胶顶部形成一个水平面,防止凝胶在使用前变干。虽然经过较长时间后仍有微弱的聚合作用,然而一般聚合后 2 小时就可使用,也可以在室温下或冰箱中存放几天。2.6% 左右以下聚丙烯酰胺凝胶几乎是半透明的,而浓度更大的凝胶对可见光会逐渐变得更为透明。

表 3 聚丙烯酰胺凝胶的制备

	聚丙烯酰胺最终浓度(%)									
	2.0	2.2	2.4	2.5	2.6	3.0	4.0	5.0	7.5	10.0
丙烯酰胺										
原液(ml)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	10.0	10.0	10.0
凝胶缓冲液(ml)	7.5	6.8	6.25	6.0	5.8	5.0	3.75	6.0	4.0	3.0
水(ml)	24.7	22.0	19.7	18.7	17.8	14.7	9.7	13.4	5.4	2.0
最终体积(ml)	37.5	34.5	31.25	30.0	28.9	25.0	18.75	29.7	19.4	15.0

把凝胶混合液真空抽气 30 秒钟左右,然后加 25 μ l TEMED,随后加入 250 μ l 新鲜配制的 10% 过硫酸铵溶液。稍为混合后,迅速把混合液移入凝胶管中,至顶端 1—2cm 处,并用水覆盖。10cm 长、内径 0.6cm 的凝胶管可容纳 3ml。2.4% 浓度的凝胶在 15 分钟后开始聚合,而 7.5% 凝胶聚合将更快。为了延缓聚合作用,以便有时间把浓缩的混合液吸入到凝胶管里,并用水覆盖,因此在加入催化剂以前,或者用冰冷却凝胶混合液,或者减少加到凝胶混合液的 TEMED 的量。

2.3 电泳设备的组装

为了准备加样,大约需花半个钟头。把凝胶管穿过上面电泳槽的橡皮垫圈垂直排列好,用巴斯德移液管或手指轻弹移去凝胶顶部的水覆盖层,然后去掉凝胶管底部的塞子。很稀的凝胶可以在胶管底部上方用橡皮胶布缠住一小片纱布,避免凝胶从管中滑落出来。凝胶管底部的塑料圈也能阻止最稀的凝胶滑出。然后,在上下槽中加入足够的电极缓冲液(表 2)使其超过胶体顶部,把上槽放在下槽上。重要的是除去每个凝胶管底部气泡。先把弯嘴巴斯德管对准凝胶基部,用缓冲液喷射,即可把气泡逐出。也可用此法去除凝胶顶端的气泡。然后把电极放在适当位置(下面为正电极),打开电源开关,在室温或冷室(5℃)进行电泳。加样之前,用 5V/cm 预电泳 15—30 分钟,以除去催化剂和吸收紫外线的物质。

2.4 样品制备和加样

RNA 如被蛋白质污染,会在凝胶顶部出现聚集现象。在提取和纯化 RNA 时如果用蛋白水解酶或酚-甲酚或酚-氯仿^[22]处理,即不会有蛋白质存在。典型的去蛋白混合剂含有 1 kg 重蒸酚,140ml 间甲酚和 1.0g 8-羟基喹啉,8-羟基喹啉需用水饱和才能使用。有些人爱把等体积的氯仿加到这种混合溶液中,以增加去蛋白的效果。如有可能,可用乙醇或高浓度盐沉淀纯化的 RNA,起到浓缩 RNA 并除去杂质的作用,不然会干扰电泳或影响凝胶的紫外扫描。把 RNA 溶于 0.15mol/L 乙酸钠,除去微量的酚和去污剂,再用乙酸调 pH 到 6.0,用两倍体积乙醇在 -20℃ 下再次沉淀数小时。为了防止核酸酶污染,通常是向乙酸钠溶液中加入 0.5% SDS。在乙醇沉淀之后,经离心即可收集 RNA。如果需

要,可在真空干燥器中抽真空几分钟,使乙醇挥发,并使样品得到部分干燥(如果样品中有较多乙醇而不是极微量的话,那么在上样时样品就不会漂浮在凝胶的表面上)。

为安全起见,在上样时应关闭电源。理论上,应把 RNA 溶于少量的含有 5—15% 蔗糖的电泳缓冲液中(36mmol/L Tris 碱, 30mmol/L NaH_2PO_4 , 1mmol/L EDTA, 0.2% SDS, pH7.7), 加蔗糖是为了增加密度,促使样品在凝胶上形成一个环状的薄层。样品浓度以每 μl 含 $1\mu\text{g}$ RNA 为好。槽内充满缓冲液后,用微量吸管的吸嘴 (tip) 把样品准确地加到凝胶面上,使吸嘴刚好保持在凝胶表面上方。也可以把溶解在缓冲液中的样品加到制胶的缓冲液中。盐干扰电泳效果,因而其浓度应相当低,减低盐的浓度也保证了 RNA 的浓度,便于随后的检测。如果需要,可加溴酚蓝作为标记。

加样多少的主要依据是,既保证有足够的 RNA 浓度,便于电泳后准确的测定,又不能过度的加样而引起 RNA 带不必要的加宽。在 0.6cm 直径凝胶中加样 10—50 μl 含 RNA 10—100 μg 就能获得清晰的分离。加样 30 μl 以上或每个胶柱 50 μg RNA 以上,就会出现稍微增宽的带。对于一次试验,加每 μl 含有 $1\mu\text{g}$ RNA 样品的 30 μl 。0.9cm 直径的凝胶中,一个凝胶可以加含 10—250 μg RNA 的样品 10—200 μl ,虽然有时每个凝胶加样 150 μl 或 100 μg 以上会发生带稍加宽。

2.5 凝胶的电泳

室温下进行电泳非常顺利。对于 9cm $\times$ 0.6cm 凝胶柱,每厘米凝胶柱 5V 和 6mA 左右的电流,能分离得非常清楚。在此条件下,用 2.2% 或 2.4% 凝胶分离前体 rRNA 和 rRNA 3—4 小时后,得到令人满意的结果(图 2A)。此时,低分子量 RNA 走出凝胶外,只有增加凝胶浓度才能

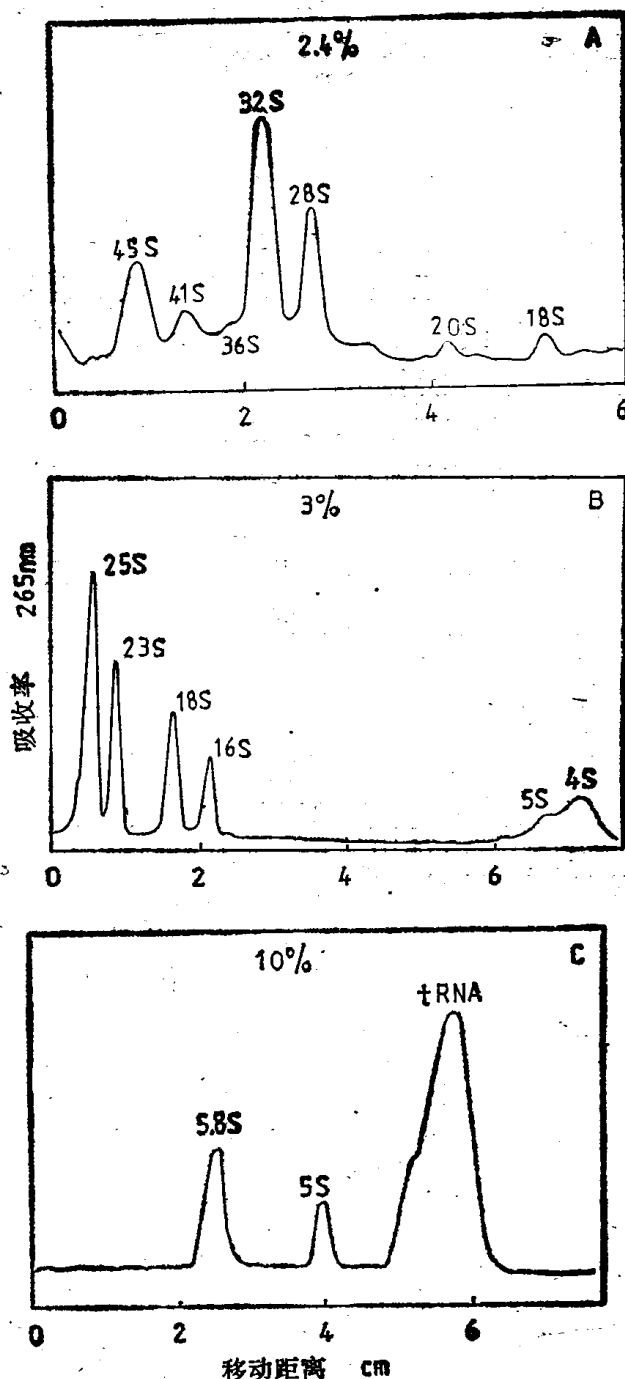


图2 用不同浓度的聚丙烯酰胺凝胶所得到的分离结果。(A)室温,胶液 2.4%,电压 50V,电泳 4 小时,分离的 HeLa 细胞核仁 RNA。(B)胶液 3%,电压 50V, 5°C,4 小时,分离菠菜子叶的 RNA。(C)mung 蚕豆细胞质 RNA,10% 凝胶,电压 50V,5°C 分离 5 小时。加样前 65°C 下加热 RNA,并迅速冷却。电泳后所有凝胶柱在 265nm 扫描。资料(A)、(B)和(C)分别由参考文献[26]、[27]和[28]复制。