

# 蛋白质的凝胶电泳

## 实践方法

B. D. 哈密斯 D. 利克伍德 著

科学出版社

# 蛋白质的凝胶电泳

## 实践方法

B. D. 哈密斯 D. 利克伍德 著

刘毓秀 程桂芳 译

(KG30/32)



科学出版社

1994

(京)新登字092号

## 内 容 简 介

本书为蛋白质凝胶电泳的现代理论和实践的专论。全书在详尽地论述聚丙烯酰胺凝胶电泳原理及实验技术的基础上，对等速电泳、聚丙烯酰胺凝胶电泳及双向凝胶电泳等技术作了系统介绍，并介绍了如何应用电子计算机“选择”凝胶电泳最适工作条件的最新技术，附录中列举了蛋白质研究工作中常用的方法和同位素标记蛋白质所应用的各种试剂，便于读者查阅。

本书适于生物化学、免疫学、分子生物学等领域的科学工作者阅读，也可供大专院校基础医学、生物化学等专业师生参考。

B. D. Hames and D. Rickwood

GEL ELECTROPHORESIS OF PROTEINS

A PRACTICAL APPROACH

IRL Press Limited, 1981

## 蛋白 质 的 凝 胶 电 泳

### 实 践 方 法

B. D. 哈密斯 D. 利克伍德著

刘毓秀 程桂芳 译

责任编辑 吴铁双

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码：100717

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

\*

1986年9月第 一 版

开本：787×1092 1/16

1994年8月第二次印刷

印张：14 1/8

印数：2 801—4 300

字数：313 000

ISBN 7-03-004196-8/Q·513

定价：16.95 元

## 前　　言

分离方法的发展对生物学系统的阐明起了重要作用。在常用的各种技术方法中，凝胶电泳是最重要的方法之一。本书及其姐妹篇《核酸的凝胶电泳》详述了分离大分子的凝胶电泳方法。书中着重强调现代使用的电泳技术的实践。为了防止过分重复，对某些章节，其中包括某些重要的实际课题，作了必要的修订。我们感谢有关的作者，特别是出版者在这项工作中所表现出的耐性和谅解，同时还感谢 Irene Hames 对全书所作的精心校对。

B. D. 哈密斯  
D. 利克伍德

## 重 要 说 明

### 凝胶电泳对健康的危害

(i) 许多常应用于凝胶电泳的化学物质具有毒性，而另外一些试剂对健康的影响尚不了解。因此，重要的是使实验者了解他们在处理本书所提及的各种化学物质时，应采取防护措施。处理丙烯酰胺时尤须特别注意，因为这类物质具有强烈的神经毒性，但聚丙烯酰胺凝胶无毒(除非凝胶中含有未聚合的单体)。

(ii) 使用凝胶电泳仪时应当小心，因为缺乏电学安全装置的仪器是危险的。在使用非商品性的电泳仪时更应特别注意，因为它们可能未达到通常所需要的安全措施标准。建议所有仪器在使用前均应由熟练的电工检查。

## 缩 写

**A** 安培

**ACES** N-2-乙酰氨基-2-氨基乙基磺酸 (N-2-acetamido-2-aminoethanesulphonic acid)

**AEPD** 2-氨基, 2-乙基, 1, 3-丙二醇 (2-amino, 2-ethyl, 1, 3-propanediol; = Ammediol)

**AMP** 2-氨基-2-甲基-丙醇 (2-amino-2-methyl-propanol)

**ANS** 1-苯胺基-8-萘磺酸盐 (1-anilino-8-naphthalene sulphonate)

**BAC** N, N'-二丙烯酰胱胺 (N,N'-bisacrylylcystamine)

**BES** N, N-双(2-羟乙基)-2-氨基乙基磺酸 [N, N-bis (2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulphonic acid]

**Bicine** N, N'-双(2-羟乙基)甘氨酸 [N, N'-bis (2-hydroxyethyl) glycine]

**Bisacrylamide** N,N'-亚甲基双丙烯酰胺 (N, N'-methylene bisacrylamide)

**Bistris** [双(2-羟乙基)-氨基]三(羟甲基)甲烷 [bis (2-hydroxyethyl)-amino] tris (hydroxymethyl) methane]

**Bistrispropan** 1,3-双[三(羟甲基)甲胺基]丙烷 [1, 3-bis[tris (hydroxymethyl) methylamino] propane]

**%C** 交联剂的百分数(以总单体的百分数表示)

**%C<sub>Bis</sub>** 双丙烯酰胺交联剂的百分数

**%C<sub>DATD</sub>** DATD 交联剂的百分数

**CTAB** 溴化十六烷基三甲基胺 (cetyltrimmonium bromide)

**CZE** 连续区带电泳(用连续缓冲系统进行的区带电泳)

**DATD** N, N'-双丙烯基酒石酸二酰胺 (N, N'-diallyltartardiamide)

**D.C.** 直流电

**DMAPN** 3-二甲氨基-丙腈 (3-dimethylamino-propionitrile)

**DMSO** 二甲亚砜 (dimethylsulphoxide)

**EDTA** 乙二胺基四乙酸盐

**EF** 电聚焦

**EPPS** N-2-羟乙基哌嗪-N'-3-丙磺酸 (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-3-propylsulphonic acid)

**g** 克

**Xg** 离心力 (X 为单位重力场)

**GABA**  $\gamma$ -氨基丁酸 ( $\gamma$ -aminobutyric acid)

**GACA**  $\gamma$ -氨基己酸 ( $\gamma$ -aminocaproic acid)

**HEPES** N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸(N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesul-

	lphonic acid)
I. D.	内径
ITP	等速电泳
$K_R$	排阻系数 (Ferguson曲线的斜率); 分子大小的一种量度
mol/L	mol 浓度
$M$	泳动率
$M_o$	自由电泳泳动率 ( $\text{cm}^2/\text{s}/\text{v}$ )
mA	毫安
MDPF	2-甲氧基-2, 4-二苯基-3 (2 H)-呋喃酮 (2-methoxy-2, 4-diphenyl-3(2 H)-furanone)
MES	2-(N-吗啉)乙磺酸 [2-(N-morpholino) ethanesulphonic acid]
MOPS	3-(N-吗啉)丙磺酸 [3-(N-morpholino) propanesulphonic acid]
MTT	甲基噻唑四唑(𬭩) [methyl thiazolyl tetrazolium]
MW	分子量
MZE	多相区带电泳(以多相缓冲系统进行的区带电泳)
NBT	硝基蓝四唑(𬭩) [nitroblue tetrazolium]
O. D.	外径
PAGE	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PCA	过氯酸 (perchloric acid)
pI	等电点
pI'	表观等电点
PITC	异硫氰酸苯酯 (phenylisothiocyanate)
pK	解离常数的负对数(半数解离时的 pH 值)
PMS	吩嗪甲硫酸盐 (phenazine methosulphate)
PMSF	苯基甲基碘酰氟 (phenylmethylsulphonyl fluoride)
POPOP	1,4-二[2-(5-苯基噁唑基)]苯 [1, 4-bis [2-(5-phenyloxazolyl)] benzene]
PPO	2,5-二苯噁唑 (2, 5-diphenyloxazole)
$\bar{R}$	几何平均半径
$R_f$	相对电泳迁移率(即与染料前沿或与移动界面‘前沿’有关)
SDS	十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulphate; sodium lauryl sulphate)
SDS-PAGE	SDS 存在下的聚丙烯酰胺凝胶电泳
SSS	稳态堆积 (steady-state stacking)
%T	定义为聚丙烯酰胺凝胶中全部单体的百分浓度 (即丙烯酰胺 + 交联剂, g/100ml)
$T_{\max}$	两种蛋白质获得最大分离的凝胶浓度
$T_{\text{opt}}$	两种蛋白质之间获得最大分辨率时的凝胶浓度
TAPS	3-{[3(羟甲基)甲基]氨基}丙磺酸 [3-{[tris (hydroxymethyl) methyl] amino} propanesulphonic acid]
TCA	三氯醋酸

TEMED	N, N, N', N'-四甲基乙二胺 (N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine)
TES	2-[三(羟甲基)甲基]氨基乙磺酸 (2-[tris(hydroxymethyl)methyl]amino)ethanesulphonic acid]
Tricine	N-[三(羟甲基)甲基]甘氨酸 [N-[tris(hydroxymethyl)methyl]glycine]
U. V.	紫外线
V	伏特
V	分子价(净质子/分子) [molecular valence (net protons/molecular)]
W	瓦特
y <sub>0</sub>	Ferguson 图上的 y 截距; 分子净电荷数的一种量度

# 目 录

<b>前言</b>	<b>i</b>
<b>重要说明</b>	<b>ix</b>
<b>缩写</b>	<b>x</b>
<b>第1章 聚丙烯酰胺凝胶电泳导论</b>	<b>1</b>
<b>引言</b>	<b>1</b>
聚丙烯酰胺凝胶的性质	2
化学结构	2
聚合催化剂	3
有效孔径	3
<b>实验方法</b>	<b>3</b>
柱胶和板胶	4
解离或非解离缓冲系统	5
连续或不连续(多相)缓冲系统	5
pH 选择	8
聚合催化剂的选择	9
凝胶浓度的选择	9
分子量测定	11
<b>仪器</b>	<b>14</b>
成胶装置和贮液槽	14
电泳所需要的其它装置	16
<b>聚丙烯酰胺凝胶的制备和电泳</b>	<b>18</b>
试剂	18
贮备液	19
凝胶混合液的制备	20
柱胶的制备	21
板胶的制备	24
样品制备	26
加样和电泳	29
<b>电泳后的凝胶分析</b>	<b>30</b>
凝胶的取出	31
蛋白质的染色及定量	32
放射性蛋白质的检定	36
糖蛋白及磷蛋白的测定	43
应用免疫学方法检测蛋白质	44
酶的检测	44
<b>分离蛋白质的回收</b>	<b>45</b>

蛋白质区带的定位 .....	45
蛋白质的洗脱 .....	46
<b>基本技术的改进.....</b>	<b>47</b>
寡肽的分子量分析 .....	47
特殊蛋白质的分离 .....	47
组蛋白.....	48
浓度梯度凝胶 .....	52
大批量凝胶 .....	57
微型柱胶和微型板胶 .....	57
琼脂糖-丙烯酰胺混合凝胶 .....	59
均一性和同一性.....	59
矫作物及故障.....	62
综合性参考文献.....	63
<b>第2章 “定量”和制备性的聚丙烯酰胺凝胶电泳.....</b>	<b>64</b>
引言.....	64
定量 PAGE 电泳仪概述 .....	64
凝胶的选择.....	66
缓冲系统的选择.....	67
不连续的和连续的区带电泳 .....	67
可供选择的不连续缓冲系统: Jovin 输出 .....	68
定量 PAGE 方法.....	70
策略 .....	70
最适 pH .....	71
堆积界限的选择 .....	77
对蛋白质稳定和分离最佳条件的选择 .....	77
最适孔径: Ferguson 曲线图 .....	79
同一性试验 .....	85
分子大小和电荷异构 .....	87
物理特性 .....	88
最适分离孔径 .....	92
制备性 PAGE .....	93
凝胶切片的提取 .....	94
连续区带洗脱 .....	96
<b>第3章 等速凝胶电泳.....</b>	<b>100</b>
引言.....	100
操作程序.....	100
稳态堆积条件的最佳化 .....	100
堆积区内的分离试验 .....	101
凝胶切片提取法进行制备性等速电泳 .....	102
用连续区带洗脱法进行制备性等速电泳 .....	105
连续区带洗脱法进行制备性稳态堆积 .....	106

<b>第4章 分析和制备性凝胶聚丙烯酰胺电泳</b>	107
应用凝胶聚丙烯酰胺电泳的时机	107
仪器	108
柱胶与水平板胶装置	108
电压控制装置	109
梯度监测装置	110
凝胶	111
聚丙烯酰胺凝胶	111
Sephadex 凝胶	112
琼脂糖凝胶	112
pH 梯度的形成	112
“Ampholine”与缓冲液	112
两性或非两性载体组分	113
平坦的和陡峭的 pH 梯度	114
pH 梯度的直线性	114
高离子强度下电聚焦	114
去污剂存在下的聚丙烯酰胺电泳	116
阳极和阴极电解液的选择	116
聚丙烯酰胺电泳的动力学	117
pH 梯度	117
蛋白质	119
导电性	119
分析性凝胶聚丙烯酰胺电泳程序	120
制备性凝胶聚丙烯酰胺电泳	126
仪器	126
程序	127
<b>第5章 双向凝胶电泳</b>	129
导言	129
仪器	129
第一向凝胶	130
第二向凝胶	130
双向凝胶电泳的一般技术	131
溶液和仪器	131
样品的制备	132
第一向凝胶的制备	133
平衡第一向凝胶以便进行第二向分离	133
第二向凝胶的制备	134
多肽分布的分析	134
双向凝胶电泳的比较分析	136
根据等电点及分子量进行蛋白质双向分离	136
第一向分离	137

第二向分离 .....	138
基本技术的改进 .....	140
影响分离的因素 .....	142
膜蛋白分离的改进 .....	143
特殊类型蛋白质的分离.....	144
核糖体蛋白 .....	144
组蛋白 .....	146
核蛋白 .....	148
<b>第6章 蛋白质部分水解后的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳肽图</b> .....	151
导言.....	151
仪器.....	152
方法学.....	152
实验步骤 .....	152
基本技术的改进 .....	155
资料的解释.....	157
<b>第7章 免疫电泳</b> .....	158
引言.....	158
抗原和抗体的制备.....	159
抗原 .....	159
抗体的产生 .....	159
抗血清商品 .....	161
抗体活性分析 .....	161
IgG 抗体的纯化 .....	161
简易免疫电泳.....	162
仪器 .....	162
试剂 .....	163
方法 .....	164
放射免疫电泳.....	165
酶检测法.....	166
免疫电泳法的其它改进.....	167
对流电泳 .....	167
“火箭”免疫电泳 .....	167
双向免疫电泳(交叉免疫电泳) .....	167
故障.....	170
综合性参考文献.....	170
<b>附录 I 多肽检测方法文献目录</b> .....	171
多肽检测的一般方法.....	171
染色法 .....	171
荧光染色法 .....	172
直接检测法 .....	172
以放射性同位素为基础的检测方法.....	173

特殊多肽的检测方法	174
糖蛋白	174
磷蛋白	174
核蛋白	175
具有可以进行反应的巯基蛋白质	175
含镉蛋白	175
胶原(蛋白)及原胶原蛋白	175
免疫方法	175
酶检测法	176
<b>附录 II 同位素标记蛋白质用试剂</b>	180
一览表	180
试剂	181
乙酸酐 ( $^3\text{H}$ 或 $^{14}\text{C}$ )	181
Bolton 和 Hunter 试剂 ( $^{125}\text{I}$ )	181
溴乙酸 ( $^{14}\text{C}$ )	182
氯乙酸 ( $^{14}\text{C}$ )	182
对-氯汞苯磺酸 ( $^{203}\text{Hg}$ )	182
对-氯汞苯甲酸 ( $^{203}\text{Hg}$ )	183
丹磺酰氯 (5-二甲胺-1-萘磺酰氯) ( $^3\text{H}$ 或 $^{14}\text{C}$ )	183
DFP (二异丙基氟磷酸) ( $^3\text{H}$ )	184
乙基亚胺乙酯 ( $^{14}\text{C}$ )	184
N-乙基马来酰亚胺 ( $^{14}\text{C}$ )	185
1-氟-2,4-二硝基苯 ( $^3\text{H}$ 或 $^{14}\text{C}$ )	185
甲醛 ( $^{14}\text{C}$ )	186
碘 ( $^{125}\text{I}$ )	186
碘乙酰胺 ( $^{14}\text{C}$ )	187
碘乙酸 ( $^3\text{H}$ 或 $^{14}\text{C}$ )	187
乙磺酰乙酰亚胺 ( $^{14}\text{C}$ )	188
马来酸酐 ( $^{14}\text{C}$ )	188
甲基 3,5-二碘羟基苯亚胺 ( $^{125}\text{I}$ )	188
异硫氰酸苯酯 ( $^{14}\text{C}$ 或 $^{35}\text{S}$ )	189
氢硼化钾 ( $^3\text{H}$ )	190
氢硼化钠 ( $^3\text{H}$ )	190
琥珀酸酐 ( $^{14}\text{C}$ )	191
N-琥珀酰亚胺丙酸 ( $^3\text{H}$ )	191
<b>附录 III 选择蛋白质标志物的分子量及等电点</b>	193
<b>附录 IV 供应电泳专用附件的厂商</b>	195
<b>参考文献</b>	196

# 第1章 聚丙烯酰胺凝胶电泳导论

B. David Hames

## 引　　言

所有带电离子或基团在电场中都能泳动。除了在其等电点以外，蛋白质在任何 pH 下都带净电荷，因而也能泳动，其泳动速度取决于所研究的蛋白质的电荷密度（电荷与质量的比值）；电荷与质量的比值越大，分子泳动的速度越快。因此，给溶液中的蛋白质混合物施加电场将导致不同的蛋白质以不同速度朝向某一电极泳动。由于所有蛋白质最初分布于整个溶液中，故所获得的分离效果极低。区带电泳是这一方法的一种改进，它将待分离的蛋白质分子的混合物置于距电极适当距离的狭窄区域或区带上，以便在电泳时，迁移率各不相同的蛋白质以不连续的区带移动，从而使它们在电泳过程中逐步分离。理论上，若蛋白质的相对泳动率明显不同，且泳动的距离又足够大，则不同的蛋白质很容易通过形成不同的区带得到分离。然而，实际上自由溶液中的区带电泳存在着某些缺陷。首先，电泳引起的任何热效应能引起液柱的对流扰动并破坏正在分离的蛋白质区带。其次，扩散作用将不断地使蛋白质区带加宽，而且在电泳结束后，这一作用还在进行。为了减小这类效应，蛋白质区带电泳几乎不在自由溶液中进行，而是在具有起稳定作用的某种支持介质内的溶液中进行。除了能减少电泳时对流和扩散的有害作用外，使用支持介质使得研究者能在电泳后立即将分离的蛋白质固定在其最终的位置上，因而避免了由于电泳后的扩散作用所引起的分辨率的降低。所应用的固定方法随所选用的支持介质的不同而不同。

通常采用的支持介质有许多种，最通用的是滤纸条或醋酸纤维素薄膜，铺于玻璃或塑料板上形成一薄层的硅胶、氢氧化铝或纤维素等材料以及琼脂糖、淀粉或聚丙烯酰胺凝胶。这些介质分为两大类。纸、醋酸纤维素和薄层物质是相对惰性的材料，主要起支持作用并减少对流。因而以这类材料进行的蛋白质的分离主要取决于所选定的 pH 条件下蛋白质的电荷密度，如同在自由溶液中进行的电泳一样。与此相反，各种凝胶不仅阻止了对流和降低了扩散作用，而且在某些场合下，它们通过与泳动中的粒子相互作用，也积极地参与分离过程。这类凝胶可以认为是具有孔径与蛋白质分子大小大致相同的有孔介质，因而能产生分子筛效应，其分离作用既与电荷密度有关，又与分子大小有关。例如，用纸电泳不能将两种分子大小各异但电荷密度相同的蛋白质分离开来；然而若分子大小相差悬殊，用聚丙烯酰胺凝胶电泳，由于分子筛效应使分子量较大的蛋白质比分子量较小的蛋白质分子泳动慢，结果可以将它们分离开来。

分子筛效应的大小取决于凝胶孔径大小与泳动粒子大小相接近的程度。由于琼脂糖凝胶孔径相当大，对大多数蛋白质分子而言，其分子筛效应微不足道，因而分离作用主要决定于电荷密度。相反，淀粉及聚丙烯酰胺凝胶的孔径与蛋白质分子大小相近，因而这类凝胶的确具有分子筛作用。但是，淀粉凝胶电泳的成功与否极大程度取决于淀粉凝胶本

身的性质。从生物材料中制备的淀粉凝胶其重现性不佳，还可能含有对结果产生不良影响的杂质。另一方面，在标准化的聚合状态下，由丙烯酰胺单体聚合而成的聚丙烯酰胺凝胶，常常能以可重复的方式用高纯度的试剂制备。可以从市面上以合理的价格购得聚合反应中所需的高纯度制剂，尽管出于某种目的，有时需将它进一步纯化。此外，聚丙烯酰胺凝胶具有化学性质不活泼，在范围较大的 pH、温度和离子强度的条件下稳定，以及透明等优点。最后，聚丙烯酰胺容易制备成孔径范围很宽的凝胶以适应不同大小蛋白质分子的分级分离，而用淀粉凝胶所获得的孔径范围十分有限。基于上述及其它原因，虽然淀粉凝胶已广泛用于同工酶的分析，但聚丙烯酰胺凝胶已成为大多数蛋白质进行区带电泳所选用的介质。Gordon<sup>[1]</sup> 和 Smith<sup>[2]</sup> 对淀粉凝胶电泳已进行评述。琼脂糖凝胶所分级分离的分子或复合物比聚丙烯酰胺凝胶大，特别适合于分离某些核酸和核蛋白。此外，琼脂糖还广泛应用于将蛋白质区带电泳与免疫检定和免疫定量相结合的免疫电泳中（见第7章）。

### 聚丙烯酰胺凝胶的性质

#### 化学结构

聚丙烯酰胺是由丙烯酰胺单体聚合成长链，并且通过双功能化合物如 N, N'-亚甲基双丙烯酰胺（通常缩写为双丙烯酰胺）与长链末端游离的功能基反应交联而成。出于

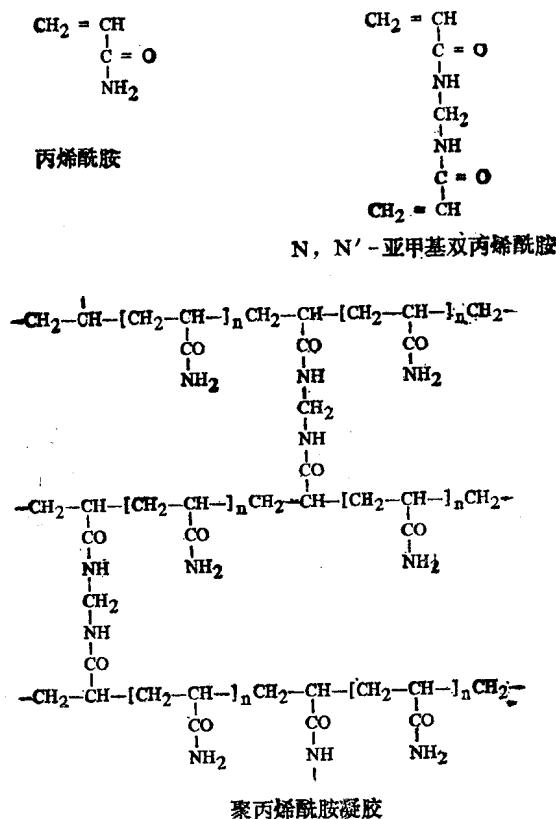


图 1 丙烯酰胺、N, N'-亚甲基双丙烯酰胺及聚丙烯酰胺凝胶的化学结构。

某些特殊目的，也采用其它交联剂以赋予凝胶特殊的溶解性质。单体及交联以后凝胶的最终结构见图1。

### 聚合催化剂

丙烯酰胺的聚合是通过加入过硫酸铵或核黄素来起动的。此外，也可以加入N,N',N'-四甲基乙二胺(TEMED)或3-二甲胺-丙腈(DMAPN)(3-dimethylamino-propionitrile)(不常用)作为聚合过程的促进剂。

在过硫酸盐-TEMED系统中，TEMED催化过硫酸盐形成自由基，而形成的自由基反过来又起动聚合反应。由于反应需要TEMED的游离碱基，所以在pH偏低的条件下，聚合反应可能延迟甚至被阻止。增加TEMED或过硫酸铵浓度可以增加聚合反应速率。

与用过硫酸盐催化的化学聚合反应不同，使用核黄素-TEMED的系统需要光来起动聚合反应。光照引起核黄素光分解并生成必需的自由基。虽然照射仅含丙烯酰胺和核黄素的溶液也能生成凝胶，但常需加入TEMED，使聚合反应更好地进行。

氧抑制聚合反应，因此凝胶混合物在使用前常需要脱气。

### 有效孔径

聚合反应混合物中，丙烯酰胺的总浓度对聚丙烯酰胺凝胶的有效孔径有很大的影响。丙烯酰胺浓度增加，有效孔径减小。丙烯酰胺浓度低于2.5%左右，对分子量大于 $10^5$ 的分子具有分子筛作用的凝胶几乎为液体，但可以加入0.5%的琼脂糖来弥补。在另一种极端的例子中，对分子量低至2,000的多肽有明显分子筛作用的凝胶，其丙烯酰胺浓度高达30%以上。正如人们所预计的那样，选择丙烯酰胺浓度是利用区带电泳对蛋白质组分作最佳分离的关键，下文将就此进行更详尽的探讨。

对于任何单体浓度已确定的聚丙烯酰胺凝胶，其有效孔径、硬度、脆性、光散射性及膨胀性质随所使用的交联剂的比例变化而变化。在无交联剂存在下的聚合将导致散乱的聚合链的形成，结果产生粘稠的溶液。若在聚合的混合液中加入双丙烯酰胺，由于散乱的聚合链之间交联形成共价网络而产生凝胶。随着交联剂比例增加，凝胶孔径减小，当双丙烯酰胺达单体总浓度的5%(即 $C_{Bis} = 5\%$ )时，孔径最小。随着双丙烯酰胺比例增加，聚合链交联成越来越大的束，束与束之间具有大的空间，结果有效孔径再次增加。孔径依赖于交联剂的比例而与所使用的单体总浓度无关，因此若双丙烯酰胺的比例大于或小于5%的最佳值，单体总浓度较大的凝胶比总浓度较低的凝胶有更大的有效孔径。

## 实验方法

在研究者仔细斟酌聚丙烯酰胺凝胶区带电泳的详细方法学之前，就分离工作的总策略加以考虑是有价值的。实际上，研究者必须决定凝胶应当采用的最适的物理形式(柱胶或板胶)，是使用解离缓冲液还是非解离缓冲液(以及是否应当应用连续的或非连续的系统)，分离时应采用的pH和缓冲剂的离子强度，最后，还应决定哪种凝胶浓度对所分离的蛋白质最适合。一旦研究者对欲获取的资料和利用电泳法获得的某些资料加以考虑分

析，上述问题中的一部分可立即得到解答。其它问题可能需要预实验才能获得满意的解答。

### 柱胶和板胶

最初的分析性区带电泳使用装在玻璃管中的聚丙烯酰胺柱状胶条，而目前常使用厚0.75—1.5mm的板胶。板胶最重要的优点之一是包括标志分子量的蛋白质在内的许多样品，能在同一板胶中在相同的条件下电泳，因此便于直接比较产生的区带图(图2)。相反，由于聚合效率、凝胶长度和直径等的细微差别，即使是同一样品在柱胶上电泳，其结果也

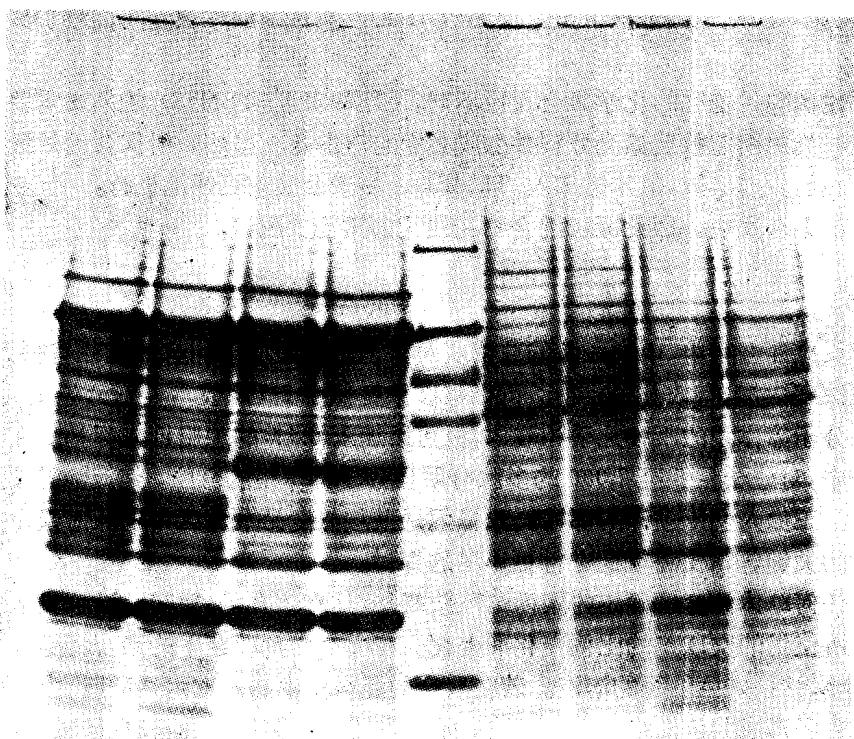


图2 用板胶对多肽样品组分进行 SDS-PAGE 分析的典型图谱。用 SDS-不连续缓冲系统，在10—15% 线性梯度凝胶中，室温下将从大鼠附睾不同区域管腔中获得的可溶性蛋白质电泳5小时，电流为20 mA。图中央部位的区带为下列分子量标志多肽： $\beta$  半乳糖苷酶，牛血清白蛋白， $\gamma$  球蛋白重链，卵清蛋白， $\gamma$  球蛋白轻链和细胞色素c。电泳后，用考马斯蓝 R 250 (coomassie blue R 250) 染色显示多肽  
(承 D. Brooks 博士允许拍照)。

极少相同。板胶的其它优点如下：

- (i) 与常用的较厚的柱胶相比较，标准板胶电泳时产生的热更容易消散，因而使热效应所引起的蛋白质区带变形减少；
- (ii) 板胶的矩形截面可使光密度测定和照象时产生光学假象的可能性减小，并且便于干燥贮存或放射性自显影；
- (iii) 在相同条件下，制备供多个样品电泳用的凝胶所需时间较短。在一块标准板胶上，能顺利地容纳下多至25个样品。

鉴于上述多种优点，人们可能提出进行分析性分离工作时是否还需要使用柱胶的问