

# 用聚丙烯酰胺凝胶电泳测定蛋白质分子量

陈冬兰 邝秀芳

(中国科学院上海植物生理研究所)

测定蛋白质分子量的方法有：氨基酸组成分析、渗透压计算、超离心沉降平衡和葡聚糖凝胶过滤等。这些方法各有独特之处。但也都有一定的局限性。

聚丙烯酰胺凝胶电泳方法具有较好的分离效果，样品不易扩散，热稳定性强，机械强度大，化学上惰性不带电荷，不会产生电渗现象，以及凝胶浓度可以控制，制成不同的“孔径”能把分子筛的分离效应和电荷效应结合起来。此外，操作比较简单，设备要求不高。近几年来，这种方法已被广泛用于蛋白质分离纯化、鉴定，以至分子量测定等方面。现在结合蛋白质分子量测定实验中的一些体会，对用聚丙烯酰胺电泳测定蛋白质分子量的方法作一简单的介绍。

## 一、实验操作方法

### 1. 试剂配制

I. 缓冲液<sup>1)</sup>：三羟甲基氨基甲烷 215.5 克，EDTA 钠盐 18.5 克，硼酸 110 克溶解在 1,000 毫升水中，pH 调至 9.2。

### II. 贮存溶液<sup>2)</sup>：

A. 20% 丙烯酰胺溶液：19 克丙烯酰胺加 1 克甲叉双丙烯酰胺溶解在 100 毫升水中。

B. 二甲基氨基丙腈缓冲液：二甲基氨基丙腈 1 毫升加缓冲液 I 10 毫升，用水稀释到 25 毫升作聚合催化剂用。

C. 5% 过硫酸铵溶液：100 毫克过硫酸铵溶解在 2 毫升水中，此试剂现配现用。

D. 0.05% 溴酚兰溶液(BPB)作指示剂。

E. 40% 蔗糖溶液。

F. 1% 氨基黑溶液：将 1 克氨基黑溶解在 100 毫升 7.5% 醋酸溶液中。

G. 7.5% 醋酸溶液。

H. 已知分子量的蛋白质溶液 (1 毫克/毫升) 胃蛋白酶 (分子量 35,000)；牛血清白蛋白 (单体分子量 67,000；二聚体分子量 134,000；三聚体分子量 201,000)； $\gamma$ -球蛋白 (分子量 165,000—170,000)；鸡卵白蛋白 (分子量 43,000)；乳酸脱氢酶 (分子量 72,000) 均来自上海生物化学研究所。

## 2. 凝胶的制备

将一定量的贮存液 A、B 和水混合，抽气，加一定量贮存液 C，混合，再将混合液加到 0.5 × 10 厘米的玻璃管中 (大约加到 9 厘米左右)，然后加几滴水保护，使胶成水平面。室温下，约 15—20 分钟聚合，聚合后和水形成很清楚的界面。各种凝胶浓度的配制比例，以做 6 根凝胶为例列表 1。

## 3. 电泳

甩去凝胶上层的水并用滤纸吸干，安放在

1) Andrew, C. et al. 1965. Serum protein Electrophoresis in Acrylamide Gel: Patterns from Normal Human subjects. Science. 147, 1451.

2) Kingsbury, N. et al. 1970. On the Determination of Component Molecular Weights in complex protein Mixtures by Means of Disc Electrophoresis. Anal. Biochem. 36, 144.

表1 各种凝胶浓度的配制\*

凝胶浓度 (%) \ 贮存液 (毫升)	5	6.5	8	10
A	0.25	3.25	4	5
B	1.56	1.56	1.56	1.56
水	5.69	4.94	4.19	3.19
C	0.25	0.25	0.25	0.25

\* 各种凝胶浓度所含催化剂B为0.6%, C为1%。

电泳槽中,加蛋白质样品(约20—80微克),10微升溴酚兰和20微升蔗糖溶液轻轻混合后,用电极槽缓冲液将每根胶装满后,再慢慢倒入上、下电极槽中。电极槽缓冲液是将缓冲液I用水稀释20倍。上槽接负极,下槽接正极,每管胶以3毫安恒定电流进行电泳。待溴酚兰泳动到离正极端凝胶约0.5厘米时,停止泳动。在此条件下大约泳动1.5小时左右。泳动后,用长针灸针插入,沿玻璃壁转动一周,再以洗耳球将凝胶压出,测量凝胶的长度和BPB迁移的距离。上、下槽中的缓冲液分别取下贮存,留下下次电泳用。一般用4—5次后弃去。

#### 4. 染色和脱色:

将取出的凝胶先放在7.5%醋酸溶液中浸泡半小时,然后放入1%的氨基黑染料溶液中染色15—30分钟移出,转放到7.5%醋酸溶液中进行电解脱色,直到凝胶透明为止。脱色后,测量凝胶的长度和兰色蛋白带迁移的距离。将凝胶贮存在7.5%的醋酸溶液中。凝胶经染色和脱色处理,约膨胀5%,所以

$$R_m (\text{相对迁移率}) = \frac{\text{蛋白质迁移的距离}}{\text{染色后凝胶的长度}} \times \frac{\text{染色前凝胶的长度}}{\text{BPB迁移的距离}}$$

同一种蛋白质分别对5%、6.5%、8%、10%凝胶浓度进行电泳,算出在各种凝胶浓度中的相对迁移率( $R_m$ )。实验时必须注意以下几点:

(1) 做凝胶时尽量没有气泡。

(2) 加上槽缓冲液时,应尽量沿玻璃棒慢慢加入,以免冲跑样品。

(3) 挤凝胶时,玻璃管要放一些水,这样易把凝胶压出,且可避免凝胶挤断。

(4) 每次电泳时,只能用同一凝胶浓度进行,不可将不同浓度的凝胶放在一起电泳。

## 二、结果和讨论

在不同浓度的凝胶中,几种蛋白质的相对迁移率和几种蛋白质在任何两种凝胶浓度的相对迁移率比值见表2,以相对迁移率几种蛋白

表2 几种蛋白质在不同凝胶浓度中的相对迁移率( $R_m$ )

凝胶浓度 (%) \ 蛋白质	5	6.5	8	10
胃蛋白酶	0.671	0.588	0.553	0.417
卵白蛋白	0.570	0.524	0.471	0.372
乳酸脱氢酶	0.627	0.545	0.470	0.311
牛血清白蛋白				
单体	0.564	0.523	0.446	0.293
二聚体	0.504	0.415	0.317	0.185
三聚体	0.425	0.329	0.215	0.130
$\gamma$ -球蛋白	0.820	0.517	0.442	0.289

质分子量的对数作图(见图1)。8%/5%相对迁移率比值与所用的几种蛋白质的分子量对数作图的线性关系最好,所有点几乎都在直线上(见图1a),其次是10%/5%的相对迁移率比值(见图1b)。其它任意两凝胶浓度的相对迁移率比值为8%/6.5%;6.5%/5%;10%/8%等作图,均有个别蛋白质不在直线上,而 $\gamma$ -球蛋白只有适用8%/5%和10%/5%相对迁移率比值作图外,其它任何两种凝胶浓度的相对迁移率比值作图都不合用。从这里可以看出,对某些蛋白质不是任意两种凝胶浓度的相对迁移率比值都可作图,究竟哪种蛋白质适用哪种凝胶浓度有待于进一步摸索。从金斯伯里(Kingsbury, N.)和我们的结果看来,选用8%,5%两种凝胶浓度来计算相对迁移率比值能适用大多数蛋白质。因此我们用8%/5%的相对迁移率比值与分子量对数图1a作为测定蛋白质的标准曲线。在探讨凝胶聚合的催化剂浓度和电泳的pH关系中,曾用0.625%的催化剂浓度和pH 9.2为标准条件,由于没有找到分子量大于300,000

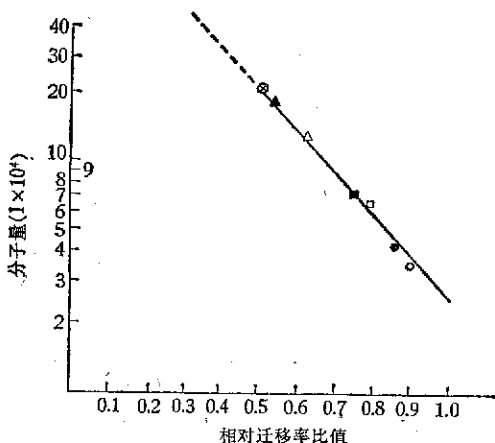


图1a 蛋白质分子量对数与8%/5%凝胶浓度相对迁移率之间的关系

- 胃蛋白酶 ● 鸡卵白蛋白 □ 牛血清白蛋白单体
- 乳酸脱氢酶 △ 牛血清白蛋白二聚体 ▲  $\gamma$ -球蛋白
- ⊗ 牛血清白蛋白三聚体

的蛋白质,只对分子量 30,000—200,000 的蛋白质作了测定,观察到在这类蛋白质分子量范围内成直线关系,这和金斯伯里 (Kingsbury, N.) 等人的试验资料基本相符。

为了进一步分析我们的数据,我们又采用赫德里克 (Hedrick) 与史密斯 (Smith)<sup>1)</sup> 的斜率方法。以每种蛋白质的相对迁移率的对数对凝胶浓度作图,得出每种蛋白质的  $\log R_m$  凝胶浓度直线的负斜率。作图的方法有两种:一种是按文献方法,用一般坐标纸,先算出每种凝胶浓度  $100 \log R_m \times 100$  的数值为纵坐标,相应凝胶浓度为横坐标,求出单位凝胶浓度改变  $R_m$  随之变化的负斜率。另一种是将相对迁移率( $R_m$ )直接在半对数纸上作凝胶浓度与  $R_m$  对数图,直线交在纵、横坐标的实际长度比值为相对负斜率,这种作图比较简单,不需要一系列的计算,但不能说明数学上的意义,所以我们称为相对负斜率,量长度误差比较大。这里以牛血清白蛋白为例作图(见图 2a、b),其它几种蛋白质分子量与负斜率的关系见图 3a、b。不论用何种作图方法,蛋白质分子量与负斜率都是线性关系。图 3a、b 均可作为测定未知样品的标准曲线。为了简便起见,还是采用图 2b 的作图方法较好。此外,相对迁移率  $R_m$  随甲又双丙烯酰胺与丙烯酰胺的比例不同而不同。Hedrick 等是采用

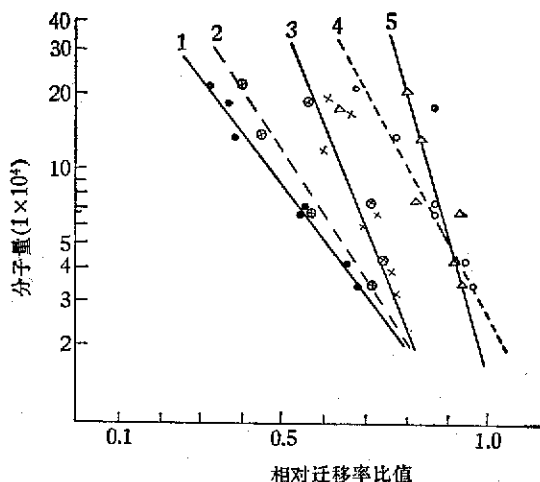
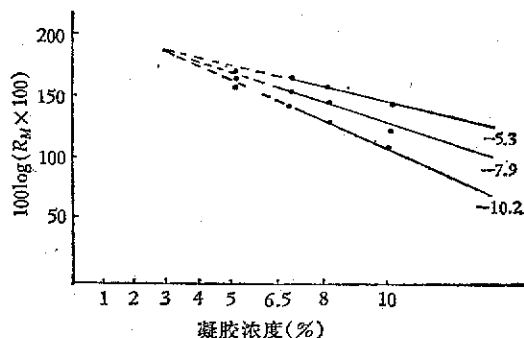
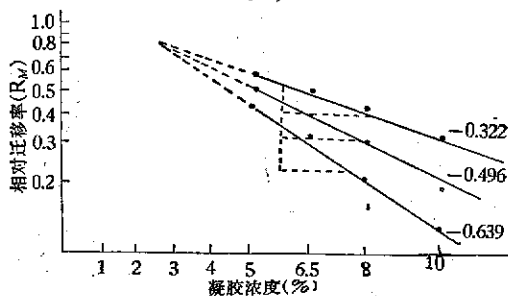


图1b (1,2,3,4,5)几种蛋白质分子量对数与任何两种凝胶浓度的相对迁移率比值之间的关系

1. 10%/5% 凝胶浓度迁移率比值;
2. 10%/6.5% 凝胶浓度迁移率比值;
3. 10%/8% 凝胶浓度迁移率比值;
4. 8%/6.5% 凝胶浓度迁移率比值;
5. 6.5%/5% 凝胶浓度迁移率比值。



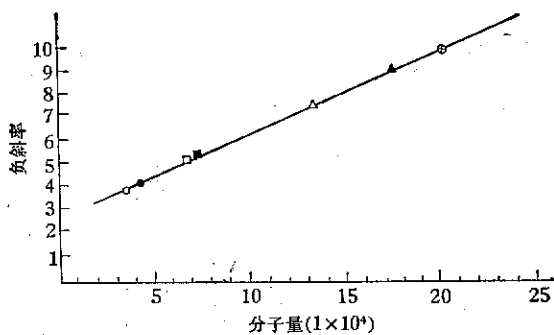
(a)



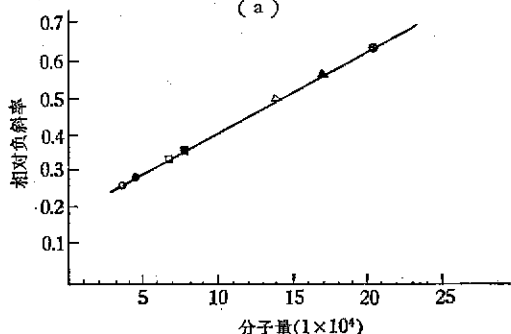
(b)

图2 牛血清白蛋白的相对迁移率对数与凝胶浓度之间的关系(上图以普通坐标纸作图,下图以半对数纸作图)

1) Hedrick, J. L. & Smith, A. J. 1968. Size and Charge Isomer separation and Estimation and Estimation of Molecular Weights of proteins by Disc Gel Electrophoresis. Arch. Biochem. Biophys. 126, 155.



(a)



(b)

图3  $\log R_m$ -凝胶浓度直线斜率与蛋白质分子量之间的关系:

上图是根据  $100 \log R_m \times 100$  对凝胶浓度作图所计算出的直线斜率与蛋白质分子量之间的关系。

下图是根据半对数纸作图所求出的相对负斜率与蛋白质分子量之间的关系(图标见图1a)

1:30 对 17 种蛋白质分子量从 45,000 到 500,000 范围内成线性关系。我们是按 Kingsbury, N. 的系统, 采用 1:19, 其相对迁移率数值偏低, 对  $R_m$  小于 0.2 的蛋白质及分子量较大的蛋白质误差可能较大, 我们所用系统对测定分子量 30 万以上的蛋白质可能就有困难。

这里还值得提出的是有的文献报道说斜率方法还可以识别同功酶的带电异构体 (Charge Isomer) 即电荷相同, 分子量不同。这在我们对牛血清白蛋白的单体, 二聚体, 三聚体的测定中

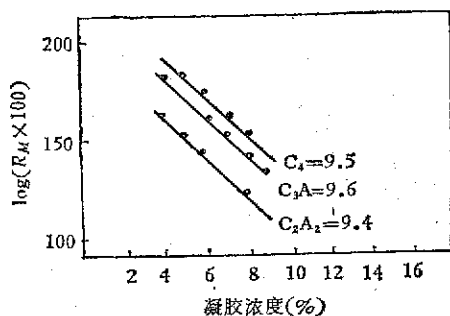


图4 凝胶浓度对醛缩酶的相对迁移率影响

(图2) 看到三者的  $\log R_m$ -凝胶浓度直线交于接近凝胶浓度 2%, 似乎也表明此种蛋白是具有电荷相等和分子量不同的聚合状态的。又如醛缩酶, 它是具有分子大小相同的同功酶(图4),  $\log R_m$ -凝胶浓度直线是平行的。关于这方面的讨论可以参阅有关的报道。

与本法有关的是文献中也有大量利用 SDS——聚丙烯酰胺凝胶电泳测定蛋白质分子量的报道<sup>1)</sup>。虽然这个方法也具有分辨力好、所需样品少、操作简便和短时间内就得到结果等优点, 但在测定中 SDS 将欲测的蛋白质解离成亚单位, 因而得到的只是亚单位的分子量。此外, 对酶蛋白原来的分子量及其聚合状态是无法知道的, 因而在应用上有一定的局限性。

不过, 也应该指出聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定蛋白质分子量尽管有许多优点, 但这种方法对何种蛋白质适用, 对何种蛋白质不适用, 从我们目前的实验中还不能预先作出有效的判断。因此在测定时, 最好结合其它方法进行比较, 这样对正确评定某个蛋白质的分子量可能会更妥当些。

1) 野村武男等 1973 アクリレアミド電気泳動法の応用化学と生物 11, 391。

## 更正

本刊 1979 年第 1 期 26 页藏雪鸡巢的直径应改为 360 (280—330) 毫米, 其雏鸡体长应改为 111.2 (110—115) 毫米。第 39 页脚注 1) 的 0.4% 应改为 94%。第 40 页表 3 中 GNHCl 均应改为 6NHCl。