

两种新型聚丙烯酰胺电泳胶电泳特性及保质期研究*

李戈辉^{1,2}, 吴 玮^{1,2}, 邸铭洋^{1,2}, 王长城³, 杨桂朋^{1,2}, 丁海兵^{1,2**}

(1. 中国海洋大学海洋化学理论与工程技术教育部重点实验室, 山东 青岛 266100;
2. 中国海洋大学化学化工学院, 山东 青岛 266100; 3. 迪申生物技术(上海有限公司), 上海 201201)

摘 要: 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)是分离、纯化蛋白质的常用技术。传统的基于 Laemmli 方法(Laemmli 胶)制备的十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺电泳胶(SDS-PAGE)能够基于蛋白质分子量的不同分离蛋白质,蛋白质分离性能良好,但存在电泳时间长、保质期短等缺点,其应用有一定的局限性。本研究用三异丙醇胺、三乙醇胺等成分代替 Laemmli 胶中的三羟甲基氨基甲烷的盐酸盐(Tris-HCl)作为缓冲物质,获得 I 型和 II 型两种新型电泳胶。电泳实验的结果表明这两种新型电泳胶保持了 Laemmli 电泳胶优良的蛋白质分离性能,并能够耐受更高的电压,具有更快的电泳速度。加速寿命实验的结果表明这两种新型电泳胶具有比 Laemmli 胶和现在流行的商业预制胶更长的保质期。新型 I 电泳胶比新型 II 电泳胶分离性能更好,保质期更长,在 37 °C 可储存 15 天,相当于在 4 °C 的保质期 15 个月。

关键词: 聚丙烯酰胺凝胶电泳; 蛋白质分离; 三异丙醇胺; 三乙醇胺; 电泳胶保质期

中图分类号: Q-331; Q503

文献标志码: A

文章编号: 1672-5174(2021)01-076-10

DOI: 10.16441/j.cnki.hdxh.20200056

引用格式: 李戈辉, 吴玮, 邸铭洋, 等. 两种新型聚丙烯酰胺电泳胶电泳特性及保质期研究[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2021, 51(1): 76-85.

LI Ge-Hui, WU Wei, DI Ming-Yang, et al. Study on electrophoresis characteristics and shelf life of two new polyacrylamide electrophoresis gels[J]. Periodical of Ocean University of China, 2021, 51(1): 76-85.

电泳^[1]是带电粒子在电场作用下向电性相反的电极移动的过程。电泳过程中,粒子所带电荷数、分子大小、形状等各不相同,从而在电场中有不同的移动速度而分离。聚丙烯酰胺电泳胶简称 PAGE(Polyacrylamide gel electrophoresis),以聚丙烯酰胺凝胶作为支持介质,利用分子筛效应分离蛋白质和寡核苷酸。电泳过程中的蛋白质迁移率与分子量、形状、电荷量均相关^[2]。Shapiro 于 1967 年提出 SDS-PAGE(Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis)法,可仅凭分子量不同分离蛋白质^[3]。1970 年,Laemmli 完善了不连续电泳技术,用于分离大分子蛋白。不连续缓冲体系由电泳缓冲液、堆积胶、分离胶组成。蛋白质样品在堆积胶中经过大孔径凝胶的堆积效应被浓缩在一个狭窄的区带,形成相同的分离起点;蛋白质进入分离胶后,较小孔径凝胶的分子筛效应将它们分离开^[4]。经过多年发展,SDS-PAGE 具备了分辨率高、重复性较好、灵敏度高、上样量少等特点,成为广泛应用的蛋白质分离方法^[2]。

目前实验室常用的 Laemmli 法配制的 SDS-PAGE 胶虽然优点突出,但存在保质期短、耐受电压较低、电泳时间长等问题。一些生命科学公司研发了预制胶产品,在保持 Laemmli 胶良好分离性能的基础上,缩短了电泳时间,延长了电泳胶的保质期。例如 Bio-Rad 公司的一种蛋白质凝胶适用电压为 200~300 V,电泳时间在 30 min 左右,在 2~8 °C 时保质期为 12 个月;EZBio-lab 的预制胶适用电压为 150 V,电泳时间在 40~50 min,4 °C 时可保存 18 个月。但目前市场上流行的预制胶价格较高,电泳时间仍然较长,且使用时受限于与之相匹配的电泳系统。制备一种兼备 Laemmli 胶分离性能和易制备特性,且拥有商业预制胶较长保质期优点的电泳胶十分必要。到目前为止,这方面的主要进展是邸铭洋等用三异丙醇胺代替 Laemmli 胶中的三羟甲基氨基甲烷-盐酸盐(Tris-HCl)作为缓冲物质,制备了聚丙烯酰胺浓度为 7.5% 的电泳胶^[5]。初步研究表明,这种电泳胶对蛋白质标准有良好的分离效果并具有较长的保质期。

* 基金项目:山东省重点研究发展计划项目(2018GSF117044);中国海洋大学横向课题项目(20110688)资助

Supported by the Key Research and Development Project of Shandong Province(2018GSF117044);the Scientific Research Project of Ocean University of China Supported by Enterprise(20110688)

收稿日期:2020-02-28;修订日期:2020-05-19

作者简介:李戈辉(1994-),女,硕士生。E-mail:lxcl23lxcl2@163.com

** 通讯作者:E-mail: dinghb@ouc.edu.cn

本研究在探究影响电泳胶的保质期关键因素的基础上,以三异丙醇胺和三乙醇胺代替 Tris-HCl 作为缓冲物质,制备了含有不同浓度聚丙烯酰胺的两种新型电泳胶。对它们性能的全面研究表明,这两种新型电泳胶均保持了 Laemmli 胶良好的蛋白质分离性能,适用电压和耐受的最高电压均高于目前市场上流行的商业电泳胶,电泳速度更快,保质期更长,具备良好的应用前景。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

仪器 pH 计(PB-10,赛多利斯科学仪器有限公司);电泳仪(BG-Power 600K,北京百晶生物技术有限公司);垂直槽制胶支架、垂直电泳槽(VE-180,上海天能科技有限公司);分析天平(CP214,奥豪斯仪器(上海)有限公司);电子天平(TD20002A,余姚市金诺天平仪器有限公司);光照培养箱(GXZ-250A,宁波江南仪器厂);真空封口机(DZ-280/2SE,东莞市金桥科技电器制造有限公司);超声波清洗机(SB-5200,宁波新芝生物科技股份有限公司)。

试剂 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl,99.9%)、十二烷基硫酸钠(SDS,99.9%)、盐酸(优级纯)、冰醋酸(分析纯)、甲醇(分析纯)(国药集团化学试剂有限公司);N,N-亚甲基二丙烯酰胺单体(Bis,99%)、过硫酸

铵(APS,98%)、牛磺酸(99%)、三乙醇胺(97%)、三异丙醇胺(99.5%)、乙醇酸(99%)、甘氨酸(98.5%)(Sigma-Aldrich 有限公司);丙烯酰胺单体(Acr,99.9%)、N,N,N',N'-(四甲基乙二胺(TEMED,98%),考马斯亮蓝 R250(Decentbio 公司);预染色蛋白质标准和未染色蛋白质标准(BBI 生命科学有限公司);预制电泳胶(Bio-Rad 公司,分离胶浓度分别为 7.5%、10%、12%、15%)。

1.2 实验方法

1.2.1 电泳胶的制备 制备分离胶浓度为 7.5%、10%、12%、15%的 Laemmli 胶、新型 I、新型 II 电泳胶若干块,用于检验其最大耐受电压和保质期。电泳胶配方如表 1、2 所示。通常浓度为 3%~5%的堆积胶对蛋白质有明显的浓缩作用^[6],本研究配制堆积胶浓度为 4%。制备电泳胶时,APS 和 TEMED 最后加入,其他溶液需要先充分混合均匀并排气,否则影响电泳胶凝固速度。灌入分离胶后用 Milli-Q 水液封,以减少空气对 APS 产生自由基反应的不利影响,加速凝固过程。待分离胶凝固完全,冲洗残留试剂,灌入堆积胶,插入梳子。堆积胶凝固后,若当天进行电泳,则将梳子取出并冲洗加样孔,备用。在检验电泳胶保质期实验中,电泳胶梳子保留,放入塑料封口袋中,填充适量电泳缓冲液,用真空封口机抽气并密封,置于恒温培养箱中。

表 1 4%堆积胶配方(总体积 10 mL)
Table 1 Formulation of 4% stacking gel(Total volume 10 mL)

试剂 Reagent	Laemmli 胶 Laemmli gel	新型 I 电泳胶 New electrophoresis gel I	新型 II 电泳胶 New electrophoresis gel II
30%丙烯酰胺单体/N,N'-亚甲基二丙烯酰胺 30% Acrylamide/Bis-acrylamide	1.32 mL	1.32 mL	1.32 mL
100 mmol/L 甘氨酸 100 mmol/L Glycine	—	1.00 mL	1.00 mL
0.5 mol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸盐,pH=6.8 0.5 mol/L Tris-HCl,pH=6.8	2.52 mL	—	—
1.5 mol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸盐,pH=8.8 1.5 mol/L Tris-HCl,pH=8.8	—	—	—
0.1 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸盐 0.1 mmol/L Tris-HCl	—	1.00 mL	1.00 mL
50 mmol/L 三异丙醇胺 50 mmol/L Tri-isopropanolamine	—	1.00 mL	—
50 mmol/L 三乙醇胺 50 mmol/L Triethanolamine	—	—	1.00 mL

续表 1

试剂 Reagent	Laemmli 胶 Laemmli gel	新型 I 电泳胶 New electrophoresis gel I	新型 II 电泳胶 New electrophoresis gel II
150 mmol/L 牛磺酸 150 mmol/L Taurine	—	2.00 mL	2.00 mL
50 mmol/L 乙醇酸 50 mmol/L Glycolic acid	—	1.00 mL	1.00 mL
10% 十二烷基硫酸钠 10% SDS	100 μ L	100 μ L	100 μ L
Milli-Q 水 Milli-Q Water	6.00 mL	2.52 mL	2.52 mL
四甲基乙二胺 TEMED	10 μ L	10 μ L	10 μ L
10% 过硫酸铵 10% APS	50 μ L	50 μ L	50 μ L

注:30%丙烯酰胺单体/N,N'-亚甲基二丙烯酰胺是指由丙烯酰胺与 N,N'-亚甲基二丙烯酰胺按照 37.5 : 1 的质量比配置成的水溶液,过滤除去不溶物,在棕色瓶中避光保存;Tris-HCl 溶液使用 HCl 调节 pH 值;10%APS 溶液需新鲜配置; $x\%$ 为分离胶浓度,如需制作 10% 的分离胶,则 $x=10$ 。(30% Acr/Bis is the solution of acrylamide and N,N-methylenebisacrylamide with a mass ratio of 37.5 : 1. The solution was filtered to remove insoluble substance, and stored in a brown bottle in dark. The pH value of Tris-HCl solution was adjusted by HCl. Fresh 10% APS solution was prepared to make the gel. $x\%$ is the concentration of different separating gel. For example, if 10% separation gel was produced, then, $x=10$.)

1.2.2 电泳胶最大耐受电压测定 电泳缓冲液含有 25 mmol/L Tris, 192 mmol/L 甘氨酸, 0.1% SDS。将电泳胶安装在电泳槽内,电泳槽注入缓冲液,使电泳胶的上端和下端浸入其中,取 5 μ L 预染色蛋白质标准或未染色蛋白质标准注入上样孔。电泳开始时,采用较低电压使蛋白质在堆积胶中浓缩成狭窄的区带。增大电压使蛋白质进入分离胶。当蛋白质标准的指示剂前沿接近电泳胶底部时,电泳结束。测量蛋白质条带到指示剂的长度,以及两胶界面到指示剂的长度,由二者比值计算相对迁移率 m 。

未染色蛋白质标准经 15~20 min 染色,4~6 h 脱色后测量计算 m (染色液为 0.25% 的考马斯亮蓝 R250 溶液,溶剂为水、甲醇、冰醋酸按照约 5 : 5 : 1 体积比混合;脱色液成分为水、甲醇、冰醋酸按照约 6 : 3 : 1 体积比混合)^[7]。

当蛋白质分子量在 15~200 kD 时,蛋白质的分子量的对数与相对迁移率的关系符合下式:

$$\lg MW = km + b.$$

式中:MW 为蛋白质相对分子量,在 15~200 kD 之间时,MW 与相对迁移率 m 呈线性关系; k 为斜率; b 为截距,该方法测定蛋白质分子量的相对误差为 $\pm 10\%$ ^[8]。根据蛋白质分子量对迁移率曲线拟合度 R^2 的数值,结合电泳条带图像,以判断蛋白质的分离效

果。测试不同浓度 Laemmli 胶、新型 I 和新型 II 电泳胶以及预制胶的最大耐受电压(即能维持 m vs. $\lg MW$ 曲线拟合度不低于 0.990 0 的电压),并在最大电压下对比各电泳胶对蛋白质的分离情况。

1.2.3 电泳胶的加速寿命实验 加速寿命实验用以检验的 Laemmli 胶、新型 I、新型 II 电泳胶以及预制胶的保质期。将 Laemmli 胶、新型 I、新型 II 电泳胶和 Bio-Rad 预制胶置于恒温培养箱中(分离胶浓度均为 10%),调节至 37 $^{\circ}$ C 恒温保存。在第 6、9、12、15 天分别将胶取出进行电泳,检验其对蛋白质的分离效果。若电泳胶出现气泡、漏胶或变形,则不进行电泳,视作该电泳胶已经达到最长保质期。

1.2.4 电泳胶变质过程中表观活化能的估算 电泳胶变质是复杂的反应。依据阿伦尼乌斯公式,结合不同保存温度条件下电泳胶的保质期,可计算几种电泳胶变质过程中的表观活化能。活化能反映化学反应速度,在本研究中可作为比较几种电泳胶的变质速度的一种依据。重复 1.2.3 中步骤,但将电泳胶保存温度设置为 45 $^{\circ}$ C,检验它们在该温度下的保质期。根据电泳胶在 37 和 45 $^{\circ}$ C 的保质期,计算电泳胶的表观活化能,从而能够从理论上计算电泳胶在一般储存条件(4 $^{\circ}$ C)下的变质时间。

表 2 x%分离胶配方(总体积 10 mL)
Table 2 Formulation of x% separation gel(Total volume 10 mL)

试剂 Reagent	Leammli 胶 Laemmli gel	新型 I 电泳胶 New electrophoresis gel I	新型 II 电泳胶 New electrophoresis gel II
30%丙烯酰胺单体/N,N'-亚甲基二丙烯酰胺 30% Acrylamide/Bis-acrylamide	(0.33x)mL	(0.33x)mL	(0.33x)mL
100 mmol/L 甘氨酸 100 mmol/L Glycine	—	1.00 mL	1.00 mL
0.5 mol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸, pH=6.8 0.5 mol/L Tris-HCl, pH=6.8	—	—	—
1.5 mol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸, pH=8.8 1.5 mol/L Tris-HCl, pH=8.8	2.50 mL	—	—
0.1 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸 0.1 mmol/L Tris-HCl	—	1.00 mL	1.00 mL
50 mmol/L 三异丙醇胺 50 mmol/L Tri-isopropanolamine	—	1.00 mL	—
50 mmol/L 三乙醇胺 50 mmol/L Triethanolamine	—	—	1.00 mL
150 mmol/L 牛磺酸 150 mmol/L Taurine	—	2.00 mL	2.00 mL
50 mmol/L 乙醇酸 50 mmol/L Glycolic acid	—	1.00 mL	1.00 mL
10%十二烷基硫酸钠 10% SDS	100.00 μ L	100.00 μ L	100.00 μ L
Milli-Q 水 Milli-Q Water	(7.34-0.33x)mL	(3.84-0.33x)mL	(3.84-0.33x)mL
四甲基乙二胺 TEMED	10.00 μ L	10.00 μ L	10.00 μ L
10%过硫酸铵 10% APS	50.00 μ L	50.00 μ L	50.00 μ L

注:对于 Leammli 胶, x 取值范围为 4~15;对于新型 I 和 II 电泳胶, x 取值范围为 4~11。配制大于 11%浓度的新型分离胶时,配方中 Milli-Q 水体积(3.84-0.33x)mL 出现负值,需进行适当调节。例如 15%的分离胶配方,可配制 30%丙烯酰胺单体/N,N'-亚甲基二丙烯酰胺体积为 4.70 mL, Milli-Q 水体积为 0,总体积为 9.4 mL 的电泳胶溶液。

(For Leammli gel, the value of x ranges between 4~15; for new kind I and new kind II electrophoresis gel, the value of x ranges between 4~11. When preparing new separation gel with concentration higher than 11%, the Milli-Q water volume (3.84-0.33x) mL appears negative in the formula and needs to be adjusted appropriately. For example, when making 15% separation gel, the Milli-Q water volume (3.84-0.33x) mL in Table 2 and 3 has negative value, so it need to be appropriately adjusted to total volume of 9.4 mL of solution with 4.70 mL 30% Acrylamide/Bis-acrylamide and 0 mL Milli-Q water.)

表观活化能计算方法如下:

$$k = A e^{-\frac{E_a}{RT}}$$

式中: k 是温度为 T 时的反应速率常数; R 是气体摩尔常数; A 是指前因子; E_a 为表观活化能。

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT}$$

A 是与 T 无关的常数,两边求微分:

$$\frac{d \ln k}{dT} = \frac{E_a}{RT^2}$$

$$\text{再求不定积分,得: } \ln k = \frac{-E_a}{RT} + C$$

当温度分别为 T_1 和 T_2 时,反应速率常数分别为 k_1 和 k_2 , 则:

$$\ln k_1 = \frac{-E_a}{RT_1} + C, \ln k_2 = \frac{-E_a}{RT_2} + C$$

两式相减得：

$$\ln \frac{k_2}{k_1} = -\frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1} \right) = -\frac{E_a}{R} \frac{T_1 - T_2}{T_1 T_2} \quad (1)$$

设温度为 T_1 时的反应速率为 k_1 ，反应时间为 t_1 ；温度 T_2 的反应速率为 k_2 ，反应时间为 t_2 。假设几种电泳胶变质的反应程度基本相同，则

$$t_1 k_1 = t_2 k_2 \quad (2)$$

将实验温度、相应的保质期代入(a) (b)式，联立得到表观活化能 E_a 的估算值。

2 结果与讨论

2.1 电泳胶凝固时间

在室温下(25 ℃)，制备的各类电泳胶凝固时间如表 3 所示。新型 I 电泳胶所需的凝固时间最短，Laemmli 胶所需时间最长。新型 I、新型 II 电泳胶相对于 Laemmli 胶凝固速度更快，主要与牛磺酸的加入量有关。在一定范围内，牛磺酸浓度越高，电泳胶凝固速度越快^[5]。此外，经实验验证，未排气的新型电泳胶混合液难以凝固。

表 3 电泳胶凝固时间(体积 10 mL，浓度 10%)

Table 3 Gelation time of electrophoresis gel (volume 10 mL, 10%) /min

	Laemmli 胶 Laemmli gel	新型 I 电泳胶 New electrophoresis gel I	新型 II 电泳胶 New electrophoresis gel II
分离胶 Separation gel	25	17	20
堆积胶 Stacking gel	30	23	25

2.2 电泳胶的最大耐受电压和分离性能

实验结果表明，不同浓度的 Bio-Rad 预制胶、新型 I、新型 II 电泳胶的最大耐受电压均在 350 V 左右，各类电泳胶在一般工作电压和最大耐受电压下的电泳耗时如表 4 所示。Laemmli 胶最大耐受电压约为 240 V，不宜在 350 V 电压条件下电泳。

在最大耐受电压 350 V 下的各类电泳胶的电泳时间如表 5 所示，电泳图像如图 1 所示。表 5 中拟合度 R^2 为 2~3 次电泳结果的平均值。图 1 中，各条带分子量(kDa)从上到下依次为：130, 100, 70(橙色), 50, 35, 25, 20, 15。

表 4 不同电压下电泳耗时(10%分离胶)

Table 4 Time-consuming at different voltages (10% separation gel) /min

	Bio-Rad 预制胶 Bio-Rad Gel	新型 I 电泳胶 New electrophoresis gel I	新型 II 电泳胶 New electrophoresis gel II	Laemmli 胶 Laemmli gel
220 V 电泳耗时 220 V Electrophoresis time-consuming	28	23	30	45
350 V 电泳耗时 350 V Electrophoresis time-consuming	18	14	20	—

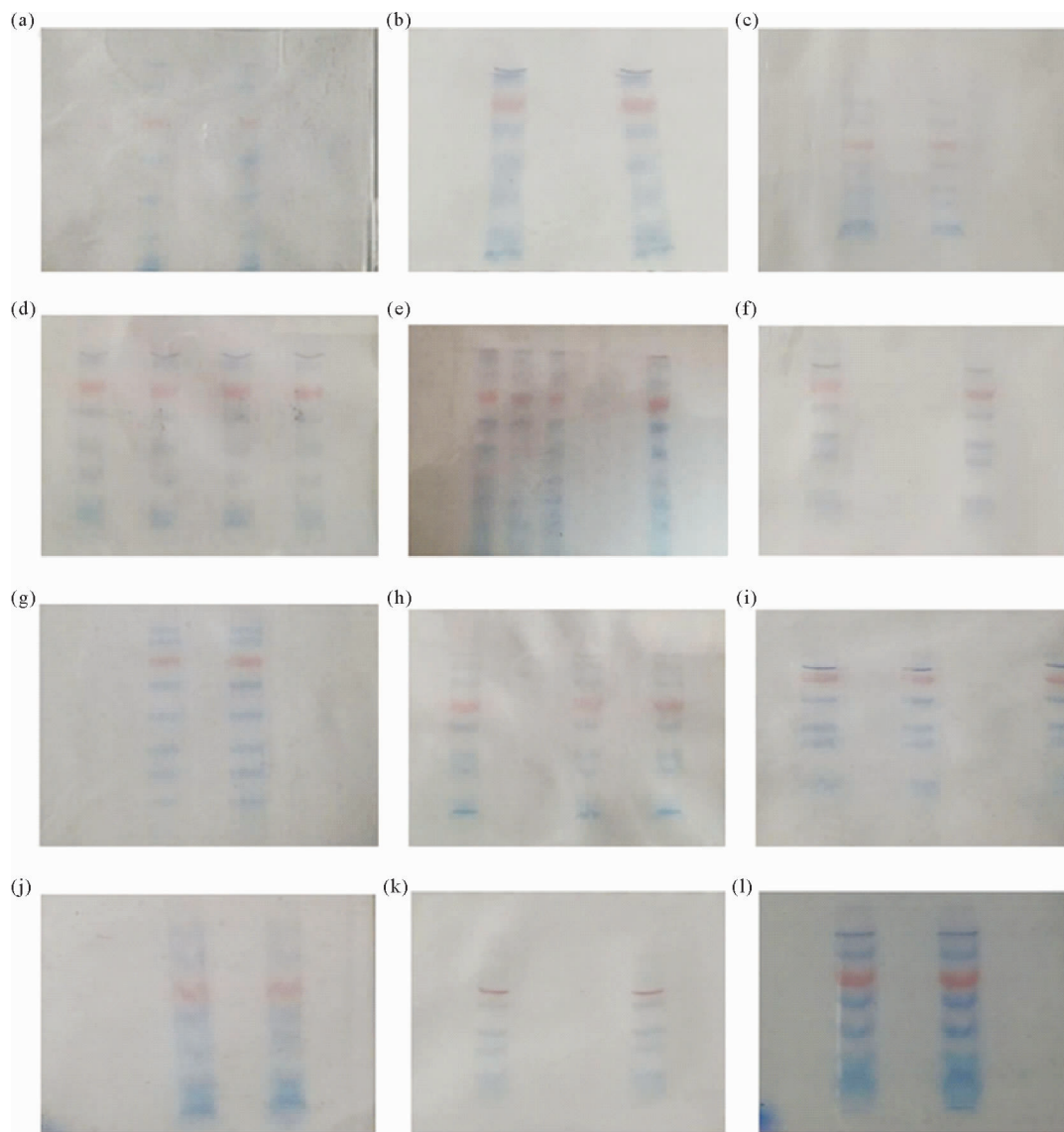
表 5 标准曲线拟合度及电泳用时

Table 5 Standard curve fit and electrophoresis time

分离胶浓度 Separation gel concentration /%	Bio-Rad 预制胶 Bio-Rad Gel		新型 I 电泳胶 New electrophoresis gel I		新型 II 电泳胶 New electrophoresis gel II	
	R^2	时间 Time/min	R^2	时间 Time/min	R^2	时间 Time/min
7.5	0.992 1	15	0.990 5	12	0.990 0	17
10	0.991 0	18	0.990 9	14	0.983 3	20
12	0.984 6	22	0.990 0	20	0.988 2	23
15	0.963 3	32	0.988 5	28	0.986 0	35

在 350 V 电压下, 预染色标准蛋白的电泳时间随分离胶浓度升高而增加。在同等浓度分离胶中, 标准蛋白在新型 I 电泳胶中电泳速度最快, 在预制胶中次之, 在新型 II 电泳胶中电泳速度最慢。电泳过程中蛋

白质的迁移速度与缓冲体系、支持介质性质等密切相关, 由于新型 I、II 新型电泳胶中分别以三异丙醇胺和三乙醇胺作为缓冲组分, 相同条件下两种电泳胶的电泳时间差异显著。



((a), (d), (g), (j) 为 7.5%、10%、12%、15% 的 Bio-Rad 预制胶; (b), (e), (h), (k) 为 7.5%、10%、12%、15% 的新型 I 电泳胶; (c), (f), (i), (l) 为 7.5%、10%、12%、15% 的新型 II 电泳胶。(a), (d), (g), (j): 7.5%, 10%, 12%, 15% Bio-Rad Gel; (b), (e), (h), (k): 7.5%, 10%, 12%, 15% New electrophoresis gel I; (c), (f), (i), (l): 7.5%, 10%, 12%, 15% New electrophoresis gel II.)

图 1 350 V 电压实验电泳图

Fig.1 Electrophoresis images at 350 V

表 5、图 1 结果表明, 350 V 电压条件下, 不同浓度新型 I 和新型 II 电泳胶均能获得清晰的分离条带, 标准曲线拟合度良好, 其中新型 I 电泳胶 R^2 波动范围最小, Bio-Rad 预制胶的拟合度波动范围最大。比较几种电泳胶的 R^2 平均值, 新型 I 电泳胶的平均分离性能最佳。分离胶浓度较高时 (15%), Bio-Rad 预制胶、新型 II 电泳胶的部分蛋白质条带出现模糊、扩散的现象, 可能是电泳耗时较长, 产生热量较多, 电泳系统温度升高

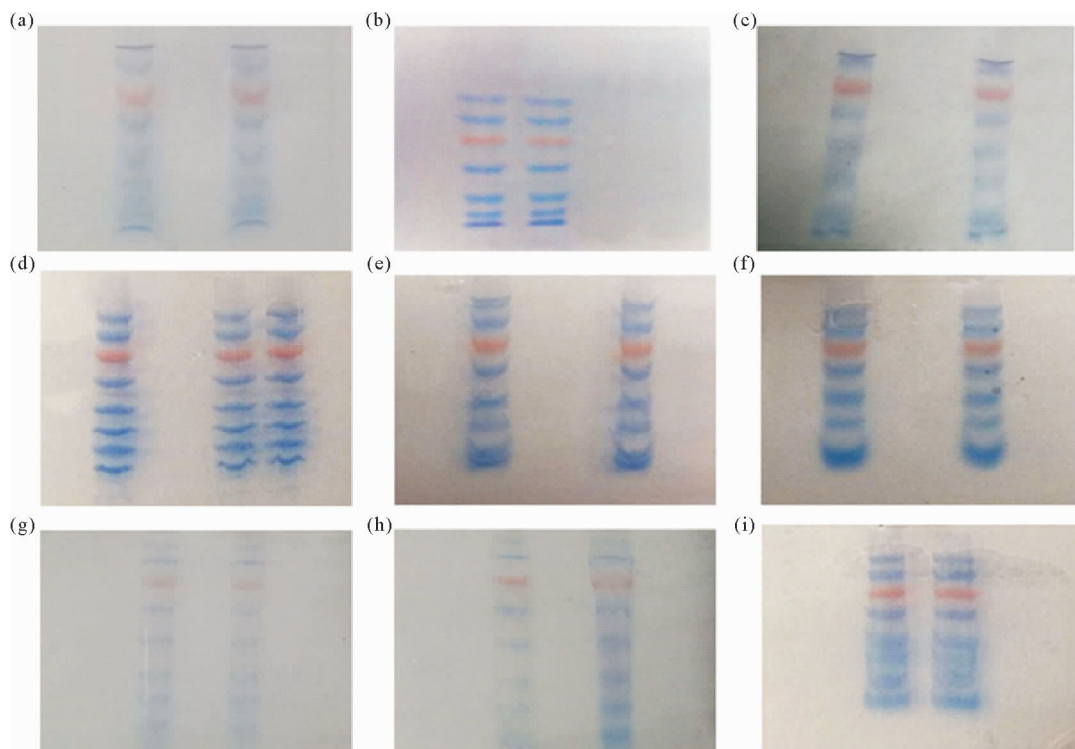
导致电泳胶分离能力下降。根据 m vs. $\lg MW$ 曲线方程, 计算出的蛋白质分子量, 与已知的标准分子量对比的结果表明, 实验测得的分子量在 Bio-Rad 预制胶、新型 I 电泳胶、新型 II 电泳胶中的相对误差分别为 0.45%、0.26%、0.36%, 新型 I 电泳胶测定蛋白质分子量时的相对误差最小。新型 I、新型 II 电泳胶和 Bio-Rad 预制胶中的未染色蛋白质标准的迁移率曲线与上述结果相近, 两种新型电泳胶染色、脱色效果良好, 条

带清晰。

2.3 电泳胶保质期的确定

将在 37 °C 恒温保存的 Laemmli 胶、新型 I、新型 II 电泳胶和 Bio-Rad 预制胶在第 6、9、12 天取出进行电泳,电泳图片如图 2 所示。各类电泳胶保质期如表

6 所示。在 37 °C 条件下加速寿命实验结果表明,第 6 天 Laemmli 胶对蛋白质的分离能力明显下降,蛋白质条带出现模糊、扩散和变形,并且存在拖尾现象。6 天之后的 Laemmli 胶出现气泡和漏胶现象,不宜进行电泳。



((a),(b),(c)分别为新型 I 电泳胶保存 6、9 和 12 天;(d),(e),(f)分别为新型 II 电泳胶保存 6、9 和 12 天;(g),(h)为 Bio-Rad Gel 预制胶保存 6 和 9 天;(i)为 Laemmli 胶保存 6 天。(a),(b),(c):New electrophoresis gel I stored 6, 9, and 12 days; (d),(e),(f): New electrophoresis gel II stored 6, 9, and 12 days; (g),(h): Bio-Rad Gel I stored 6, 9 days; (i):Laemmli gel stored 6 days.)

图 2 加速寿命实验电泳图(37 °C)

Fig.2 Elecphoresis image of accelerated life test (37 °C)

表 6 电泳胶加速寿命实验保质期与表观活化能

Table 6 Shelf life and apparent activation energy of electrophoresis gel

	Laemmli 胶 Laemmli gel	Bio-Rad 预制胶 Bio-Rad Gel	新型 I 电泳胶 New electrophoresis gel I	新型 II 电泳胶 New electrophoresis gel II
4 °C 保质期 Shelf life for 4 °C/day	487	893	1 218	1 137
37 °C 保质期 Shelf life for 37 °C/day	6	9	15	14
45 °C 保质期 Shelf life for 45 °C/day	3	4	6	6
表观活化能 $E_a/\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ Apparent activation energy	71.08	83.16	93.96	86.89

第 6 天时两种新型电泳胶分离蛋白质的条带均比较清晰,且标准曲线拟合度均优于 Laemmli 胶,新型 I

电泳胶的线性关系最好。Bio-Rad 预制胶标准曲线拟合度较好,但蛋白质条带出现扩散现象。第 9 天新型

I、新型 II 电泳胶的标准曲线拟合度仍在 0.980 0 以上,所得蛋白质条带较清晰;而 Bio-Rad 预制胶中所得的蛋白质条带出现明显的模糊扩散现象,对蛋白质分离效果明显降低。第 12 天新型 I、新型 II 电泳胶中所得的蛋白质条带出现轻微扩散和拖尾,标准曲线拟合度略有下降,分离能力仍然较好。新型 I 电泳胶标准曲线的拟合度更高。两种新型电泳胶均未出现变形、气泡,表明它们性质稳定,能在较长时间内保持蛋白质分离性能,保质期显著优于 Bio-Rad 公司的预制胶。Bio-Rad 预制胶在保存第 9 天后出现变形和气泡,而新型 I、新型 II 电泳胶分别在第 15、14 天出现气泡。

理论上,Laemmli 胶中的 Tris-HCl,以及两种新型电泳胶中的三乙醇胺和三异丙醇胺都属于胺类。胺类是典型的亲核试剂,能够亲核攻击酰胺基团带正电的碳原子,进行胺交换反应。因此,这三种胺都有破坏聚丙烯酰胺三维网状结构的可能性。这三种亲核试剂中,Tris-HCl 是伯胺,发生胺交换反应相对更容易,但反应条件也比较苛刻(在酸性或碱性条件使酰胺键的稳定性受到破坏);经过较长的时间,其 $-NH_2$ 基团与聚丙烯酰胺会逐渐发生反应,如图 3(a)所示,反应使交联结构的酰胺键断开,三维网状结构遭到破坏,电泳胶逐渐失去了分子筛效应,分离能力下降^[5]。三乙醇胺和三异丙醇胺都是叔胺,对酰胺进行亲核攻击非常困难,甚至无法进行。同时,两种新型电泳胶中的甘氨酸成分有利于保持它们的空间网状结构,并减轻蛋白质条带的拖尾情况。两种新型电泳胶配方中 Tris 的含量远低于 Laemmli 胶,并采用牛磺酸、乙醇酸作为缓冲成分,通过调节 pH 减少聚丙烯酰胺的中酰胺键在酸性条件下被破坏的程度,从而延长了电泳胶的保质期^[5]。从图 3(b,c)可以看出,三异丙醇胺与三乙醇胺虽然性质相似,但三异丙醇胺立体空间结构相对于三乙醇胺具有更强的支撑、分散性能,且与酰胺键发生反应时的空间位阻更大,变质过程更加缓慢。以上分析表明,新型 I 电泳的保质期应该长于新型 II 电泳胶并远远长于 Laemmli 胶,与我们的实验结果相符。电泳胶稳定性的增强也有助于其耐受更高的电压,使两种新型电泳胶能够承受 350 V 的电压,耐压性能显著高于 Laemmli 胶。

Rowell 等人的研究表明,SDS-PAGE 在 37 °C 下恒温保存 1 天约等于 4 °C 下恒温保存 1 个月^[9]。由于 Bio-Rad 预制胶使用时,距离生产日期约 2 个月,通过换算后该预制胶保质期为 11~12 个月,与产品说明基本相符。根据 Rowell 的结果推断,在 4 °C 冷藏条件下,新型 I、新型 II 电泳胶可以分别保存约 15、14 个

月,保质期较 Bio-Rad 预制胶更长,明显长于 Laemmli 胶。

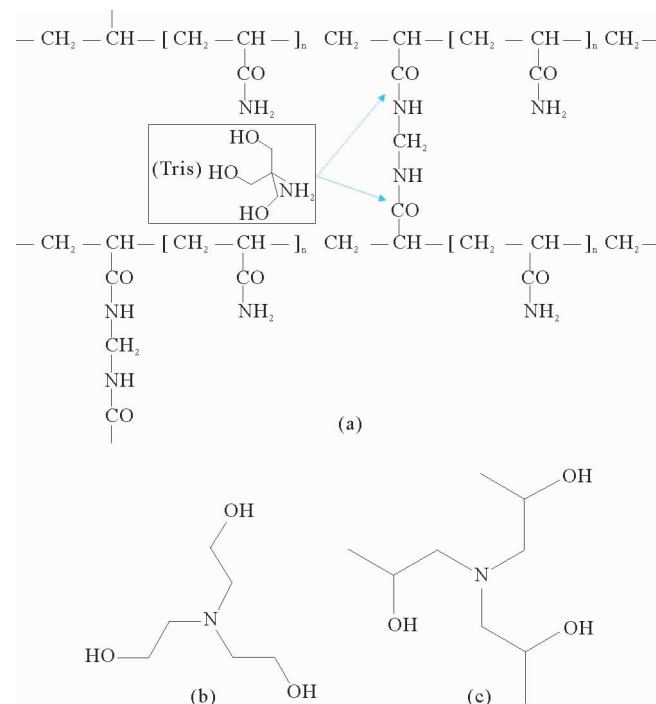


图 3 (a) 酸性条件下 Tris 与酰胺键反应;

(b) 三乙醇胺结构和(c)三异丙醇胺结构

Fig.3 (a) Tris reacts with amide bonds under acidic conditions; (b) triethanolamine structure and (c) triisopropanolamine structure

2.4 电泳胶变质过程的表现活化能

两种新型电泳胶和 Laemmli 胶保质期的结果都是根据较高温度下加速实验的结果推定的。通过计算电泳胶变质过程中的表现活化能,能够推算电泳胶在理论上的保质期。四种电泳胶变质过程的表现活化能如表 6 所示。几种电泳胶表现活化能由大到小排序为:新型 I 电泳胶、新型 II 电泳胶、Bio-Rad 预制胶、Laemmli 胶。表现活化能数值越高,反应进行越慢,这进一步说明了新型 I 电泳胶具有更加稳定的化学性质,从而具有较长的保质期。根据表现活化能推算电泳胶在 4 °C 储存条件下的理论保质期列于表 6,其中新型 I 电泳胶保质期最长,可达 3 年以上。根据表现活化能计算的四种电泳胶的保质期比根据 Rowell 研究结果推算的保质期明显偏长,因此需要进一步通过实验验证这四种电泳胶在 4 °C 下的确切的保质期。

2.5 Laemmli 胶和两种新型电泳胶的理化参数

Laemmli 胶和两种新型电泳胶的部分理化参数如表 7 所示。

表 7 三种电泳胶部分理化参数(10%分离胶)
Table 7 Physical and chemical parameters of the three electrophoresis gel (10% separation gel)

	Laemmli 胶 Laemmli gel	新型 I 电泳胶 electrophoresis gel I	新型 II 电泳胶 electrophoresis gel II
电泳胶颜色 Electrophoresis gel color	无色透明 Colorless andtransparent	无色透明 Colorless and transparent	无色透明 Colorless and transparent
初固化时间/min Initial curing time	7	5	5
总固化时间/min Total curing time	30	23	25
最高耐受电压/V Maximum withstand voltage	240	350	320
最高耐受电压下总电泳耗时/min Total electrophoresis time-consuming at the highest withstand voltage	45	20	25
保质期(37 ℃)/月 Shelf life	6	15	14
理论保质期(4 ℃)/d Theoretical shelf life	487	1 218	1 137

3 结语

最大电压耐受实验和加速寿命实验结果表明,新型 I 和新型 II 电泳胶具备了 Laemmli 胶对蛋白质良好的分离性能,并且制胶时凝固速度更快;耐受工作电压高达 350 V,完成电泳时间更短;新型 I 和新型 II 电泳胶配方中的缓冲物质三异丙醇胺和三乙醇胺能有效保护聚丙烯酰胺的三维网状结构,保质期超过现有的商业预制胶,具有良好的应用前景。

参考文献:

[1] 颜真,张英起.蛋白质研究技术[D].西安:第四军医大学出版社,2007:58.
Yan Z, Zhang Y Q. Protein Technology[D]. Xi'an: Fourth Military Medical University Press, 2007: 58.

[2] 沃兴德.蛋白质电泳与分析[D].北京:军事医学科学出版社,2009:11-12,37,43.
Wo X D. Protein Electrophoresis and Analysis[D]. Beijing: Military Medical Science Press, 2009: 11-12, 37, 43.

[3] Shapiro A L, Vinuela E, Maizel Jr. J. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1967, 28(5): 815-820.

[4] 武金霞.生物化学实验教程[D].北京:科学出版社,2012:126-129.
Wu J X. Experimental Course of Biochemistry[D]. Beijing: Science Press, 2012: 126-129.

[5] 邸铭洋,王艺飞,张梦洁,等.一种用于蛋白质分析的新型聚丙烯酰胺电泳胶[J].中国海洋大学学报(自然科学版),2017,47(7):89-96.
Di M Y, Wang Y F, Zhang M J, et al. A new SDS-Polyacrylamide gel for protein analysis[J]. Periodical of Ocean University of China, 2017, 47(7): 89-96.

[6] Olsen I, Wiker H G. Diffusion blotting for rapid production of multiple identical imprints from sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis on a solid support[J]. Journal of Immunological Methods, 1998, 220(1-2): 77-84.

[7] 何金环.生物化学实验技术(第2版)[D].北京:中国轻工业出版社,2014:77-79.
He J H. Biochemical Experiment Technology[D]. Beijing: China Light Industry Press, 2014: 77-79.

[8] 张龙翔,张庭芳,李令媛.生化实验方法和技术[D].北京:高等教育出版社,1981:112.
Zhang L X, Zhang T F, Li L Y. Biochemical Experimental Methods and Techniques[D]. Beijing: Higher Education Press, 1981: 112.

[9] Rowell C, Panattoni C, Berkelman T R, et al. Hydrolysis-Resistant Polyacrylamide Gels[P]. US, US0051462. 2010-03-04.

Study on Electrophoresis Characteristics and Shelf Life of Two New Polyacrylamide Electrophoresis Gels

LI Ge-Hui^{1,2}, WU Wei^{1,2}, DI Ming-Yang^{1,2}, WANG Chang-Cheng³, YANG Gui-Peng^{1,2}, DING Hai-Bing^{1,2}

(1. Key Laboratory of Marine Chemistry Theory and Technology, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266100, China; 2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266100, China; 3. Dycent Biotech(Shanghai) Co., Ltd, Shanghai 201201, China)

Abstract: Polycarylamide gel electrophoresis (PAGE) is a common technique for protein separation and purification. Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gelelectrophoresis(SDS-PAGE)based on traditional Laemmli method (Laemmli gel)can separate proteins according to their molecular weight. SDS-PAGE has good efficiency for separating proteins. However, due to the disadvantages of its long electrophoresis time and short shelf life, the application of SDS-PAGE is limited. In this study, triisopropanolamine and triethanolamine were applied to replace Tris(hydroxymethyl)aminomethane(Tris-HCl) in Laemmli gel as buffer reagent, and two new kinds of electrophoresis gels I and II were obtained. The electrophoresis experiments showed that the two new kinds of electrophoresis gel maintained excellent separation performance as Laemmli gel. They can also withstand higher voltage (350 V) with faster electrophoresis speed. Among them, the new I electrophoresis gel has the best performance on standard protein separation at 350 V, and the average fitting degree of the standard curve is not less than 0.990 0. The results of accelerated life test indicated that the two new kinds of gel has longer shelf life than Laemmli gel and popular prefabricated commercial gel. The new kind gel I has longer shelf life than the new kind gel II. At 37 °C, its shelf life is 15 days, equivalent to 15 months at 4 °C.

Key words: polyacrylamide gel electrophoresis; protein separation; triisopropanol amine; triethanolamine; shelf life of electrophoresis gel

责任编辑 徐 环