

有效分离 1kDa 小肽的 Tricine-SDS PAGE 方法^{*}

曹佐武^{**}

(暨南大学生殖免疫研究中心 广州 510632)

摘要 为了建立能有效分离 1kDa 的特小分子肽的 Tricine-SDS PAGE 方法,调整分离胶中聚丙烯酰胺凝胶的分子组成,使致密胶中丙烯酰胺和双丙烯酰胺的交联度为 5%,并加入 36.5% 的尿素,用于分离小至 1kDa 的小分子肽,并与常规的 SDS PAGE 和先前报道的 Tricine-SDS PAGE 相比较。结果改进的致密胶可以有效分离分子量小至 1kDa 的小肽,明显优于常规的 SDS PAGE 和现有的 Tricine-SDS PAGE 方法。

关键词 聚丙烯酰胺凝胶电泳 小分子肽

在机体的生理调节过程中,许多调节因子不仅含量少,而且分子也很小。在蛋白质的生化分析和基因表达产物的分离纯化中,难免会需要分离某种或某些小分子蛋白质成分。

聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)是分离蛋白质的常用生化方法,样品的蛋白质分子热变性解聚后与 SDS 结合形成带负电的蛋白质-SDS 复合物,复合物在电泳中的迁移率取决于蛋白质的分子大小,使用均匀浓度的 SDS-PAGE 来分析分子量在 15~200kDa 的蛋白质时,电泳迁移率与分子量的对数成线性关系。但常规的 Tris-甘氨酸-盐酸系统中电泳分离分子量小于 10kDa 的多肽效果差。

国外曾经报道了分离小分子肽的三羟甲基氨基甘氨酸(Tricine)-SDS-PAGE 方法^[1],该方法可分离分子量在 1~100kDa 的蛋白质。十多年来,一直利用这种较简便的不连续梯度胶分离小分子肽,国内也有一些利用该方法的报道。但作者在用该系统分离小分子肽的实验中发现,该方法分离大于 2kDa 的蛋白质效果尚可^[2],但分离小至 1kDa 的小分子时效果并不理想,表现为带型弥散。通过改进,作者发展了一种效果理想的分离小至 1kDa 的小肽的方法。

1 材料和方法

1.1 器材

尿素 (promega), 巯基乙醇 (E. Merck, Darmstadt), 过硫酸铵 (AP) (Sigma, USA), TEMED (Sigma, USA), 丙烯酰胺 (Sigma), 甲叉双丙烯酰胺 (Sigma), 三羟甲基氨基甘氨酸 (Tricine) (Serva), Tris 碱 (Serva), SDS (Amresco)。

低分子量蛋白质标准品(上海生物化学研究所), 特低分子量蛋白质标准品 C6210 (Sigma), 胰岛素 (Sigma)。

蛋白质微量电泳仪 (Bio-Rad Lab, USA), Mini protein II 垂直电泳槽 (Bio-Rad Lab, USA), 凝胶成像仪 (Bio-Rad)。

1.2 溶液配制

1.2.1 Tricine-SDS PAGE 蛋白质电泳溶液准备

(1) 正极缓冲液 (10×) 121.14g Tris 溶于 400ml 重蒸水, 用 1.0mol/L HCl 调至 pH8.9, 定容至 500ml。

(2) 负极缓冲液 (10×) 将 60.55g Tris, 89.58g Tricine 及 5g SDS 溶于 400ml 重蒸水中, 加水至终体积为 500ml。

(3) 凝胶缓冲液 (3×) 将 181.5g Tris, 1.5g SDS 溶于 400ml 重蒸水中, 用 1mol/L HCl 滴定至 pH8.45, 再加水稀释至 500ml。

1.2.2 丙烯酰胺储存液配制

(1) 3C 丙烯酰胺储存液 将 48g 丙烯酰胺和 1.5g 甲叉双丙烯酰胺溶于重蒸水中至 100ml。

收稿日期: 2003-05-16 修回日期: 2003-11-13

^{*} 国家自然科学基金资助项目 (No. 30271370)

广东省自然科学基金资助项目 (No. 010398)

^{**} 电子信箱: caozuowu@yahoo.com.cn

(2) 5C 丙烯酰胺储存液 用重蒸水溶解 47g 丙烯酰胺和 2.5g 甲叉双丙烯酰胺成 100ml 溶液。

(3) 6C 丙烯酰胺储存液 用重蒸水溶解 46.5g 丙烯酰胺和 3.0g 甲叉双丙烯酰胺成 100ml 溶液。

1.2.3 样品与样品缓冲液 样品缓冲液由 4% SDS、12% 甘油、50mmol/L Tris、2% 巯基乙醇(√v), 及少许溴酚蓝组成, pH6.8。

低分子量蛋白质标准品含有 97.4kDa、66.2kDa、43.0kDa、31.0kDa、20.1kDa、14.4kDa 等 6 种成分,再补加 3.5kDa 的胰岛素肽,与样品等体积混合,上样前沸水浴 5min,每次点样量 10μl。

特低分子量蛋白质标准品(Sigma C6210),每次点样 10μl。

2 实验方法

2.1 不同组成的丙烯酰胺溶液的配制

Tricine SDS-PAGE 的凝胶由不同分子组成的丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺混合液聚合而成。其中浓缩胶由 3C 丙烯酰胺储存液配成 4% 的丙烯酰胺溶液聚合而成,夹层胶由 3C 丙烯酰胺储存液配成 10% 的丙烯酰胺溶液聚合而成,致密胶由 5C 丙烯酰胺储存液或 6C 丙烯酰胺储存液配成 16.5% 的丙烯酰胺溶液(添加或不添加 36.5% 尿素)聚合而成。凝胶配方见表 1。

表 1 不同的丙烯酰胺溶液的组成

组分	浓缩胶	夹层胶	致密胶		
			6C+ U	5C+ U	5C
凝胶缓冲液(3X)	0.6ml	0.5ml	1ml	1ml	1ml
3C 凝胶储存液	0.125ml	0.5ml	/	/	/
6C 凝胶储存液	/	/	1ml	/	/
5C 凝胶储存液	/	/	/	1ml	1ml
尿素	/	/	1.08g	1.08ml	/
加水至	1.8ml	1.5ml	3ml	3ml	3ml

2.2 灌 胶

凝胶制作采用三层不连续胶的结构,由致密胶+夹层胶+浓缩胶构成。灌胶前,各种丙烯酰胺溶液分别加入 10μl 的过硫酸氨和 1μl 的TEMED,随即灌胶,先灌下层的致密胶,再覆盖以中间的夹层胶,然后铺浓缩胶。静置以聚合形成三明治式的不连续梯度凝胶。

2.3 点 样

取 10μl 的蛋白质标准品,煮沸 5min 使蛋白质与 SDS 结合变性,小心点入凝胶的点样孔中。

2.4 电 泳

内槽加入负极电泳缓冲液,外槽加入正极电泳缓冲液,形成 Tricine SDS-PAGE 电泳系统,用 20mA 恒流电泳 3h。考马斯亮兰染色后,用甘油溶液孵育,并用凝胶成像仪成像。

3 实验结果

3 种分离胶用于分离低分子量蛋白质标准品和特低分子量蛋白质标准品的电泳结果见图 1。其中图 1A 为由“6C+ U”致密胶和夹层胶组成的分离胶的电泳结果:图 1B 为“5C+ U”致密胶和夹层胶组成的分离胶的电泳结果:图 1C 为由“5C”致密胶和夹层胶组成的分离胶的电泳结果。

图 1A 显示用“6C+ 尿素”凝胶电泳可清晰地分离低分子量蛋白质标准品中的 7 条带,也基本可分离出特低分子量蛋白质标准品中的 6 条带,但 1kDa 小分子的带型弥散,而第 3 条带自身显示红色,且与第 2 条带的分子量接近,因而带型效果差。

图 1B 能很清晰地显示低分子量蛋白质标准品中的 7 条带和特低分子量蛋白质标准品中的 6 条带,特别是 1kDa 小分子的带型也很清晰。

图 1C 能显示低分子量蛋白质标准品中的 7 条带,但是只分离出特低分子量蛋白质标准品中的 5 条带,1kDa 小分子未见明显的带型。

可见,“5C+ 尿素”凝胶分离小分子蛋白的电泳效果最好,尤其是 1kDa 带很清晰。

4 讨 论

常规聚丙烯酰胺电泳方法分离 10kDa 以下的小肽效果差。传统上分离小分子肽用连续梯度胶,制作较麻烦,而且需要专门的灌胶设备。

Schagger 等^[1]改用 Tricine SDS-PAGE 系统后,对小分子肽的分辨率明显提高。利用 16.5% 凝胶浓度、11% 甘油,按“小孔胶+夹层胶+浓缩胶”模式制作不连续的梯度胶,分析昆虫细胞的表达产物,可见小于 14kDa 的几个小分子成分,并呈现清晰的 3~4 条带,而且还能分离 2~3kDa 的肽段^[2]。

利用“6C+ U”配方配制的凝胶能分离小至 1kDa 的肽段^[1],多年来国内分离小分子肽一直沿用这种方法,没有实质的改进。但是,作者发现,利用这种凝胶在 Tricine SDS-PAGE 系统中虽能分离小至 1kDa 的肽段,但效果不理想,主要表现为小分子成分形成的带型弥散,如图 1A 的泳道 2 所示。

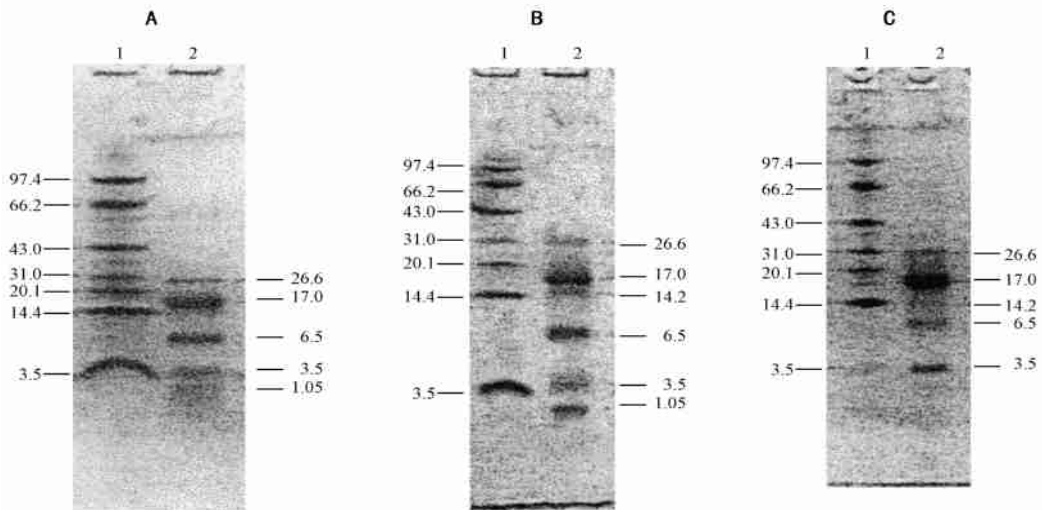


图 1 用不同分离胶电泳分离蛋白质标准品的 PAGE 图谱

图 1A: “6C+ U”致密胶的 SDS- PAGE 电泳图;图 1B:“5C+ U”致密胶的 SDS- PAGE 电泳图;图 1C:“5C”致密胶的 SDS- PAGE 电泳图。Lane 1: 低分子量蛋白质标准品的电泳条带;Lane 2: 超低分子量蛋白质标准品(C6210)的电泳条带

经过几年的摸索, 作者发现, 调整聚丙烯酰胺凝胶的分子组成后, 可以改善分离小分子肽的效果。本文采用“5C+ U”丙烯酰胺溶液配成的聚丙烯酰胺凝胶, 使丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺的交联度为 5.05%, 分离特小分子量的蛋白标准品 C6210, 可见清晰的 6 条带, 而且 1kDa 的小肽的带型也非常清晰(如图 1B 的泳道 2 所示), 明显优于“6C+ U”凝胶的分离效果。可见, 调整凝胶中丙烯酰胺和双丙烯酰胺的分子比例可直接影响凝胶的分离效果, 这可能是由于二者的比例影响凝胶的分子间隙。有报道认为, 当凝胶中丙烯酰胺和双丙烯酰胺的分子比例为 20/1 时, 分子间隙最小^[3]。本文调整分子比例后, 胶中丙烯酰胺和双丙烯酰胺的分子比例接近 20/1, 使凝胶分子结构更致密, 更有利于小分子肽的分离。

但是, 即使凝胶中丙烯酰胺和双丙烯酰胺的分

子的交联度接近 1/ 20, 单凭这 2 种分子本身组成的凝胶还不能分离小至 1kDa 的肽段, 该凝胶分离特小分子量的蛋白质标准品, 仅分辨出 5 条带, 没有显示出 1kDa 的肽段(如图 1C) 所示。加入尿素后的凝胶能清晰地显示 1kDa 的带型。可见, 尿素能增强分离效果。

参考文献

- [1] Schagger H, von Jagow G. Tricine sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100kDa. Analytical Biochemistry, 1987, 166: 368~ 379
- [2] 曹佐武. 小分子肽的 TricineSDS PAGE 分离方法. 生物学通报, 2003, 38(3): 55~ 56
- [3] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning. 2nd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 1847~ 1848

An Effective Method of Tricine SDS PAGE for Separating the 1kDa Peptide

CAO Zuowu

(Center for Reproductive Immunology Research Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract Current TricineSDS-PAGE system is not so effective to resolve the peptide less than 1kDa. Using a different compact gel, which has approximate 5% cross-link of bisacrylamide with acrylamide, to construct modified resolving gel with spacer gel, the peptide with ultrar-low molecular mass of 1kDa was resolved effectively.

Key words SDS-PAGE Small peptide