

超薄平板微型聚丙烯酰胺凝胶的 等电聚焦电泳方法 ——介绍一种高效、快速的生物同工酶分析方法^{*}

黄宏文

(中国科学院武汉植物研究所 武汉 430074)

提 要 介绍了一种简易、高效、快速的生物同工酶分析方法——超薄平板微型聚丙烯酰胺凝胶的等电聚焦电泳方法。该方法与目前国内外市场销售的同种用途等电聚焦的产品(如BD-RAD公司的model 111Mini IEF Cell)相比,具有以下优点:实验操作灵活,用途更广;谱带清晰;每次可实验的样本量大;电泳所需时间短;实验费用低;适用于多种酶系统的同工酶和等位酶分析;凝胶干燥不需任何设备且能长期保存;样本用量少。

关键词 凝胶电泳, 等电聚焦, 同工酶

中图分类号:O 657. 15; Q 55 文献标识码:A 文章编号: 1000-470X (2000)-03-0224-05

ULTRA-THIN SLAB IEF-PAGE METHOD ——A EFFECTIVE BD-ANALYTIC METHOD FOR ISOZYME ANALYSIS

Huang Hongwen

(Wuhan Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences Wuhan 430074)

Abstract The paper introduces a simple, efficient and fast bio-analytic method for isozyme analysis: ultra-thin slab IEF-PAGE system. In comparison with other commercial products (such as BD-RAD model 111Mini IEF cell, etc.), the system has many advantages: (1) more flexibility in applications; (2) wider range of applications; (3) higher resolution separations; (4) larger capacity of running samples; (5) shorter time for electrophoresis; (6) lower cost; (7) suitable for various enzyme systems; and (8) no need for gel-drying.

Key words Gel electrophoresis, Isoelectric focusing, Isozymes

同工酶电泳自1957年Hunter和Market采用酶的催化特异性并以组织化学染色在电泳凝胶上显示酶带以来,已经成为非常有效的实验方法,广泛地应用于生物学研究的各个领域。尤其近30年来,应用同工酶电泳技术在评价居群的遗传多样性、估测基因流、分析杂交频率、确立物种界线、研究系统发育关系等诸多方面的研究进展,使我们对生物微观和宏观进化的过程有了进一步的认识^[1]。虽然,最近各种分子生物学技术及研究方法有了长足发展,但同工酶电泳方法随着自身技术改进和应用方法的创新,仍然是目前生物学研究各领域的重要实验工具之一。这里介绍一种自制简易的聚丙烯酰胺凝胶的等电聚焦

^{*} 收稿日: 1999-04-20, 修回日: 1999-06-22。第一作者: 男, 1957年生, 博士, 研究员, 从事植物遗传育种方面研究。

电泳方法, 特别适用于大批量样本的居群遗传多样性等群体生物学领域的研究。

1 方法的来源及特点

该方法最初来自 Mulcahy 等^[2]在研究南瓜属花粉中酸性磷酸酶时描述的基本实验方法, 经过多年试验改进而来。该方法与目前国内外市场销售的同种用途等电聚焦的产品(如 B D-RAD 公司的 model 111M ini IEF Cell)相比, 具有以下优点: 实验操作灵活, 用途更广; 谱带清晰^[3,4]; 每次可实验的样本量大(每次至少 80~ 100 个样本); 电泳所需时间短(1.25 h); 实验费用低(每个样本费用仅为 B D-RAD 公司的 model 111M ini IEF Cell 方法的 1/20 或更低); 适用于多种酶系统的同工酶和等位酶分析; 凝胶干燥不需任何设备且能长期保存; 样本用量少。

2 超薄平板微型聚丙烯酰胺凝胶的等电聚焦电泳方法

电极模块可按图 1 所示用有机玻璃块自制, 安上铂金丝和与电泳仪相接的导线插口。塑料间隔片规格约为 0.4 mm × 5 mm × 95 mm (可用文具小尺片裁剪而成)。垫片为 GelBond 胶片或任何光滑胶片。玻片为 1 mm × 50 mm × 75 mm 的显微镜用载玻片(或其他自切玻片), 需做亲水处理以使凝胶与玻片粘牢, 其程序为: 将蒸馏水用 10% 柠檬酸调至 pH

= 3.5, 按每 100 mL 水加入 600 μ L Silane A 174 (Fisher 公司)配成溶液, 充分搅匀(搅 30 min); 将玻片浸泡其中 30 min, 蒸馏水中过一次后, 风干, 避光保存(可成批处理玻片)。

2.1 电泳装置(见图 1)

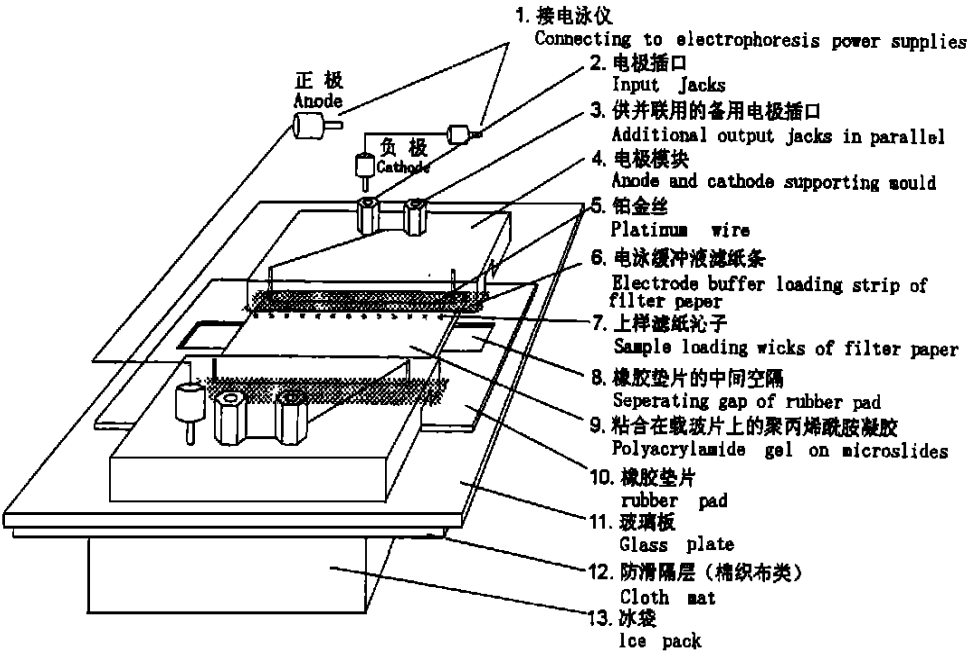


图 1 电泳装置示意图

Fig. 1 Diagram of apparatus of electrophoresis

2 2 凝胶配方(见表 1)

表 1 等电聚焦聚丙烯酰胺凝胶的配方

Table 1 IEF polyacrylamide gel formula

凝胶组分储备液 Gel stock solution	溶液浓度 Concentration	凝胶配方(所需容量) Gel formula (vol)			
		1 块胶 1 gel	2 块胶 2 gels	3 块胶 3 gels	4 块胶 4 gels
丙烯酰胺及双丙烯酰胺储备液 Acryl + BIS stock	4.75 g 丙烯酰胺加 0.25 g 甲叉双丙烯酰胺溶于 10 mL 水	275 μ L	550 μ L	825 μ L	1 100 μ L
四甲基乙二胺 TEMED	0.20 mL 原液溶于 10 mL 水	50 μ L	100 μ L	150 μ L	200 μ L
过硫酸铵 Ammonium persulfate	0.025 g 溶于 10 mL 水	275 μ L	550 μ L	825 μ L	1 100 μ L
两性电解质 Ampholytes	pH4~9 原液或其它 pH 范围配比液	150 μ L	300 μ L	450 μ L	600 μ L
蒸馏水 Water		1.25 mL	2.5 mL	3.75 mL	5.0 mL

2 3 形成凝胶(见图 2)

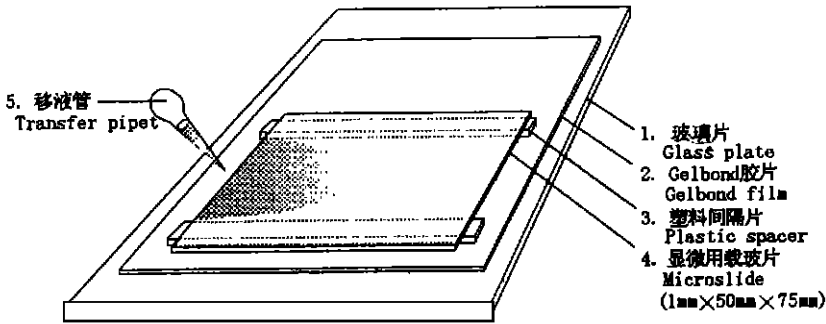


图 2 形成凝胶示意图

Fig. 2 Diagram of casting gel

将 GeBond 胶片疏水面朝上平放在实验台,按玻片宽度放好塑料间隔片,盖上玻片。将组成凝胶的凝胶试剂按配方充分混合均匀,用移液管将混合液缓慢滴入玻片与 GeBond 胶片之间,液体的表面张力和间隙的毛细管作用会使液体扩散至整个玻片;滴入时应注意避免气泡的产生;如有气泡时,可用塑料隔片将气泡导出。形成凝胶因温度不同约需 20 min 至 1 h。可以观察玻片四周是否有折射光线显出的凝胶轮廓,一旦显现时表明凝胶聚合已形成并粘合固定在玻片上,将玻片与 GeBond 胶片分开即可。

2 4 制样及上样

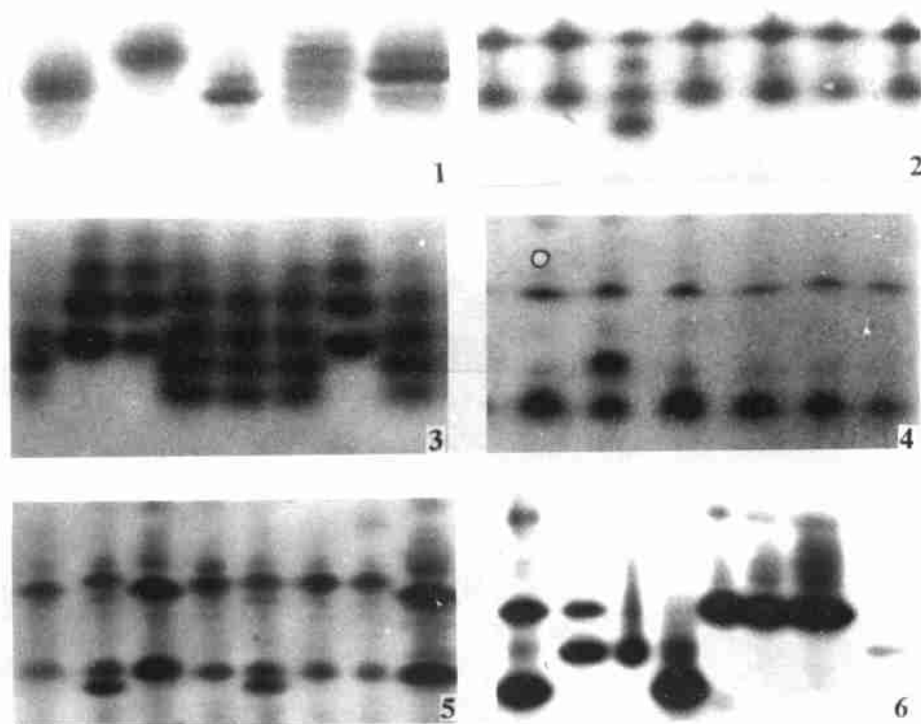
由于是超薄凝胶样品需要量很少,一般只需 50~ 100 mg 鲜样加 200~ 300 μ L 提取缓冲液^[5]研磨至匀浆,用吸管转到 Eppendorf 1.5 mL 离心管,以 5 000 r/min 离心 5 min,上清液即为上样电泳样品液。

将 Whatman 3 号滤纸剪成 1 mm \times 2 mm 大小用作上样沁子。用尖头镊子将沁子靠近提出液吸透酶提取的上清液后,平放在距凝胶一端约 5 mm 处即可(+ 极或- 极端,因研究的酶的等电点而不同);电泳开始后(50 V),沁中的酶蛋白及其它带电的大分子会进入凝胶内的电场。一般每块胶可上样 20 至 25 个,上样时应注意沁子之间距离适当、排列整

齐, 这样可使最终染色后的谱带整齐。

2.5 电泳

在凝胶的两端各放上一条 $8\text{ mm} \times 95\text{ mm}$ 滤纸条, 滤纸条的边紧挨凝胶的端边(但滤纸条不能叠摺在胶上)。用移液管在正极端滤纸滴透 $\text{pH} = 4$ 的 Tris 缓冲液, 负极端滴透 $\text{pH} = 9$ 的 Tris 缓冲液(两极的缓冲液因凝胶设定的 pH 范围而定)。将电极模块放在滤纸条上, 使铂金丝紧贴滤纸并使滤纸中的缓冲液饱和和铂金丝(必要时可沿模块两端滴加缓冲液)。电泳程序为: 电压 50、100、200、300 和 400 V 各 15 min。电泳完成后就可以根据不同的研究目的进行各种同工酶的染色^[5], 由于是超薄微型凝胶, 可大大节省染色试剂用量, 且电泳结果所得谱带清晰(见图 3)。



1. 栗属植物苹果酸酶; 2. 栗属植物莽草酸脱氢酶; 3. 美洲泡泡果属磷酸葡萄糖异构酶;
4. 美洲泡泡果属还原型辅酶 I 心肌黄酶; 5. 猕猴桃属过氧化物酶; 6. 猕猴桃属酯酶
1. Malic enzyme in genus *Castanea*; 2. Shikimate dehydrogenase in genus *Castanea*;
3. Phosphoglucose isomerase in genus *Asimina*; 4. NADH-diaphorase in genus *Asimina*;
5. Peroxidase in genus *Actinidia*; 6. Esterase in genus *Actinidia*

图3 超薄平板聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳方法的几种植物的同工酶谱带

Fig. 3 Isozyme banding patterns of several plant species by ultra-thin slab IEF-PAGE method

该方法除了电泳仪外, 其他部件均自己制做, 运用非常灵活; 而且如通过并联的方式与电泳仪相接, 实际上一次可以分析 100 个以上的样品, 所以很适用于群体生物学方面的大批量样本的分析。

致谢 美国麻省大学Mulcahy 教授对本人在方法的改进研究中曾提供大量的帮助; 美国奥本大学FennyDane 博士在同工酶电泳方面曾提供过许多有益的建议; 本所雷一东帮助绘图; 在此一并致谢。

参 考 文 献

- 1 Murphy R W , Site J W , Buth Jr D G *et al* Proteins: isozyme electrophoresis In: Hillis D M , Moritz C , Mable B K eds Molecular Systematics Sunderland MA: Sinauer Associates, Inc , 1996
- 2 Mulcahy D L , Robinson R W , Ihara M *et al* Gametophytic transcription for acid phosphatase in pollen of *Cucurbita* species hybrids *J Hered*, 1981, **72**: 353~ 354
- 3 Huang H (黄宏文), Dane F, Norton J D. Genetic analysis of 11 polymorphic isozyme loci in chestnut species and characterization of chestnut cultivars by multi-locus allozyme genotypes *J Amer Soc, Hort Sci*, 1994, **119**: 840~ 849
- 4 Huang H (黄宏文), Dane F, Wang Z *et al* Isozyme inheritance and variation in *Actinidia*. *Heredity*, 1997, **78**: 328~ 336
- 5 Soltis D E, Soltis P S. Isozymes in plant biology. Portland, OR: Dioscorides Press, 1989. 5~ 33