

聚丙烯酰胺凝胶电泳中样品的处理

蛋白质是通过分子内和分子间的氢键，疏水相互作用以及半胱氨酸之间的二硫键来维系它们的天然结构的（三级和四级结构）。在蛋白溶液中加入过量的 SDS 后，可以引起以下的反应：①蛋白质本身的电荷变化被屏蔽；②氢键被断裂；③疏水相互作用被取消；④多肽被去折叠（二级结构破坏），并形成椭球形。

在每克蛋白质结合 1.4g SDS 单体后，所有的 SDS-多肽胶束都带负电，且有恒定的荷-质比。胶束的 Stokes 直径和分子量成正比。通常在样品溶液中加入 1%到 2%（w/v）SDS。在凝胶中加入 0.1 %SDS。

样品处理的方法对分离的质量和它的重复性是很重要的。根据分离的目的可以分为三种处理的方法^[1]：

1. 还原 SDS 处理

当加入还原剂二硫苏糖醇（DTT）或β-巯基乙醇后，蛋白质被完全去折叠，只根据分子量分离，见图 1。DTT 贮液应在使用前配制。终浓度通常为 2%~3%。β-巯基乙醇的终浓度通常为 4%~5%。使用 DTT 的优点一是没有臭味，另一是当在同一块凝胶上需要同时分离还原和非还原样品时不会因扩散而影响非还原蛋白的分离。由于在加热时还原剂可能被氧化，冷却后有时需要再加还原剂以防止蛋白的重新折叠和亚基的缔合。忘记这一步可能在高分子重量范围产生“鬼带（ghost band）”，在加样处产生沉淀。EDTA 可以阻止 DTT 的氧化，所以当系统中有 EDTA 时，可免去这一步。

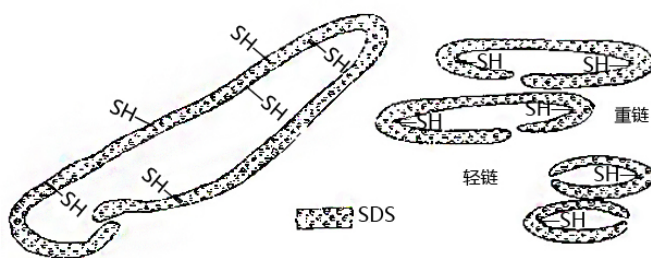


图 1. SDS 和还原处理的蛋白^[1]

2. 带有烷基化作用（alkylation）的还原 SDS 处理

碘乙酰胺（iodoacetamide）的烷基化作用可以很好地并且经久牢固地保护 SH 基团，而得到窄的谱带（见图 2）。但对含有很多带 SH 基团的蛋白，被测得的分子量会略有增加。另外，碘乙酰胺可以捕集过量的 DTT 而防止在银染时的纹理现象。碘乙酰胺的烷基化作用最佳条件是 pH8.0，离子强度较高，0.4mol/L。在样品加热并冷却后，在 100μl 样品缓冲液中加入 10μl 20%（w/v）的碘乙酰胺，并在室温保温 30 分钟。

碘乙酸 (iodoacetic) 和乙酰吡啶 (vinylpyridine) 也可用作烷基化作用的试剂^[2]。

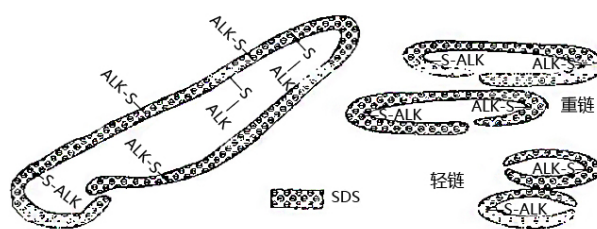


图 2. 用 SDS 还原处理和烷基化的蛋白^[1]

3. 非还原的 SDS 处理

许多样品，如生理体液、血清或尿素，一般只需用 1% SDS 在 100°C 煮 3 分钟，并不需要加还原试剂，此时二硫键不能被断裂，蛋白并没有完全被去折叠（见图 3）。因为在这样的实验中并不希望破坏免疫球蛋白的四级结构而得到分离，所以不能用此方法来测定分子量。

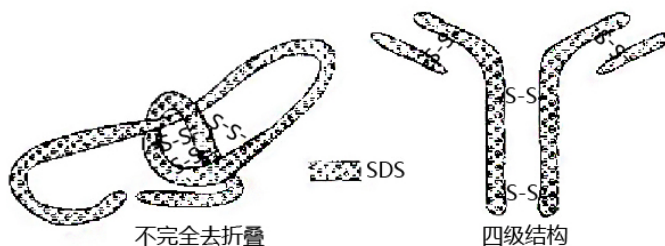


图 3. SDS 和非还原处理的蛋白^[1]

参考文献

[1] Westermeier R. Electrophoresis in Practice. VCH. press. Weinheim 1993. P. 167-171.

[2] Lane L. C. .Anal. Bichem, 1978. (86): 655.

本文来源

《蛋白质电泳实验技术》(郭尧君 编著) 第 5.3.5 节 样品的处理