



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109824821 A

(43)申请公布日 2019.05.31

(21)申请号 201910108324.X

(22)申请日 2019.01.18

(71)申请人 中国科学院生物物理研究所
地址 100101 北京市朝阳区大屯路15号

(72)发明人 黄晓星 宋凯 郁聪 朱平

(74)专利代理机构 北京中强智尚知识产权代理
有限公司 11448

代理人 黄耀威

(51)Int.Cl.

C08F 220/56(2006.01)

C08F 222/38(2006.01)

C08F 2/44(2006.01)

C08K 3/38(2006.01)

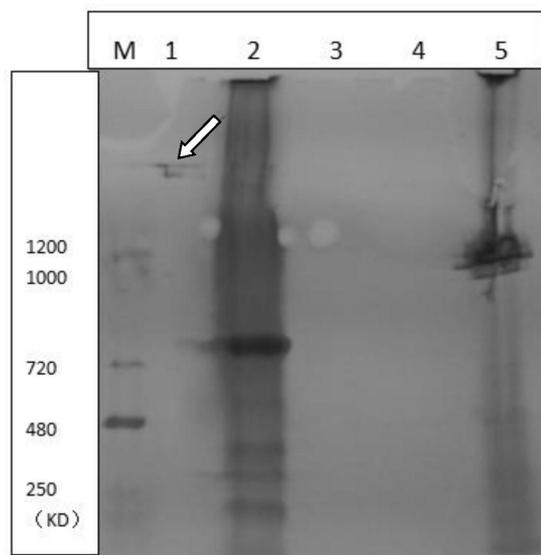
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

一种非变性聚丙烯酰胺凝胶的制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种非变性聚丙烯酰胺凝胶的制备方法,包括:将丙烯酰胺、亚甲基双丙烯酰胺、凝胶缓冲液、聚乙烯醇、硼砂、纯净水混合,得到丙烯酰胺的质量浓度低于3%的混合溶液;将引发剂和加速剂添加到所述混合溶液中,并将其混合均匀,获得凝胶制备液;将所述凝胶制备液灌入到梯度混合仪的灌胶槽内并进行混合配胶,获得液体梯度胶;将所述液体梯度胶室温放置30-50min,即可得到凝固的非变性聚丙烯酰胺梯度凝胶。通过本发明制备的非变性聚丙烯酰胺凝胶浓度低于3%,所能分离的蛋白复合物或病毒分子量最大可达到几十万KD。



1. 一种非变性聚丙烯酰胺凝胶的制备方法,其特征在于,包括:

将丙烯酸胺、亚甲基双丙烯酸胺、凝胶缓冲液、聚乙烯醇、硼砂、纯净水混合,得到丙烯酸胺的质量浓度低于3%的混合溶液;

将引发剂和加速剂添加到所述混合溶液中,并将其混合均匀,获得凝胶制备液;

将所述凝胶制备液灌入到梯度混合仪的灌胶槽内并进行混合配胶,获得液体梯度胶;

将所述液体梯度胶室温放置30-50min,即可得到凝固的非变性聚丙烯酰胺凝胶。

2. 根据权利要求1所述的一种非变性聚丙烯酰胺凝胶的制备方法,其特征在于,在配制所述混合溶液前,还包括:配制含丙烯酸胺和亚甲基双丙烯酸胺质量浓度为30%的丙烯酸胺水溶液,其中,丙烯酸胺水溶液中的丙烯酸胺与亚甲基双丙烯酸胺的质量比为28-30:1。

3. 根据权利要求2所述的一种非变性聚丙烯酰胺凝胶的制备方法,其特征在于,所述凝胶缓冲液由25mM咪唑、500mM甘氨酸的水溶液组成,所述凝胶缓冲液的pH值为7.0。

4. 根据权利要求3所述的一种非变性聚丙烯酰胺凝胶的制备方法,其特征在于,在配制所述混合溶液时,所述凝胶缓冲液与所述丙烯酸胺水溶液的体积比为9-11:1。

5. 根据权利要求4所述的一种非变性聚丙烯酰胺凝胶的制备方法,其特征在于,在配制所述混合溶液前,还包括:配制含聚乙烯醇的质量浓度为5%的聚乙烯醇水溶液。

6. 根据权利要求5所述的一种非变性聚丙烯酰胺凝胶的制备方法,其特征在于,在配制所述混合溶液时,所述聚乙烯醇水溶液与所述丙烯酸胺水溶液的体积比为1-2:1。

7. 根据权利要求2所述的一种非变性聚丙烯酰胺凝胶的制备方法,其特征在于,在配制所述混合溶液前,还包括:配制含硼砂的质量浓度为1%的硼砂水溶液,并在配制所述混合溶液时,所述硼砂水溶液与所述丙烯酸胺水溶液的体积比为1:8-15。

8. 根据权利要求2所述的一种非变性聚丙烯酰胺凝胶的制备方法,其特征在于,所述引发剂为过硫酸铵的质量浓度为10%的过硫酸铵水溶液。

9. 根据权利要求1所述的一种非变性聚丙烯酰胺凝胶的制备方法,其特征在于,所述加速剂为四甲基乙二胺。

10. 根据权利要求1至9任一项所述的一种非变性聚丙烯酰胺凝胶的制备方法,其特征在于,在将引发剂和加速剂添加到所述混合溶液中,并将其混合均匀,获得凝胶制备液后,还包括:

将所述凝胶制备液置于冰浴10-20min,并使所述凝胶制备液保持液体状态。

一种非变性聚丙烯酰胺凝胶的制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于凝胶制备技术领域,具体涉及一种非变性聚丙烯酰胺凝胶的制备方法。

背景技术

[0002] 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳是用于分离和鉴定天然状态大分子蛋白或蛋白复合物的常用手段,其中,在进行非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳过程中,所配制的聚丙烯酰胺凝胶的浓度是大分子蛋白或蛋白复合物的分离和鉴定的重要影响因素,即聚丙烯酰胺凝胶的浓度越低,聚丙烯酰胺凝胶的孔径越大,可以分离和鉴定的蛋白分子量越大。

[0003] 由于低于3%浓度的丙烯酰胺几乎无法凝固成胶,因此,市面上买不到低于3%浓度的聚丙烯酰胺凝胶,而目前可以买到的能分离最大分子量蛋白的聚丙烯酰胺凝胶浓度是3-12%,其能分离的蛋白分子量范围是15-10000KD。虽然3-12%非变性聚丙烯酰胺凝胶可以分离高达10000KD的蛋白或蛋白复合物,但是对于几十万KD的病毒和几千KD超大蛋白复合物,此浓度胶的分离效果并不好,大病毒甚至受凝胶孔径限制而不能进胶。因此,制备一种浓度低于3%的非变性聚丙烯酰胺凝胶的方法亟需研究。

发明内容

[0004] 针对以上现有技术存在的不足之处,本发明提供了一种非变性聚丙烯酰胺凝胶的制备方法。

[0005] 为实现上述技术目的,本发明通过以下技术方案实现:

[0006] 一种非变性聚丙烯酰胺凝胶的制备方法,包括:

[0007] 将丙烯酰胺、亚甲基双丙烯酰胺、凝胶缓冲液、聚乙烯醇、硼砂、纯净水混合,得到丙烯酰胺的质量浓度低于3%的混合溶液;

[0008] 将引发剂和加速剂添加到所述混合溶液中,并将其混合均匀,获得凝胶制备液;

[0009] 将所述凝胶制备液灌入到梯度混合仪的灌胶槽内并进行混合配胶,获得液体梯度胶;

[0010] 将所述液体梯度胶室温放置30-50min,即可得到凝固的非变性聚丙烯酰胺凝胶。

[0011] 进一步的,在配制所述混合溶液前,还包括:配制含丙烯酰胺和亚甲基双丙烯酰胺质量浓度为30%的丙烯酰胺水溶液,其中,丙烯酰胺水溶液中的丙烯酰胺与亚甲基双丙烯酰胺的质量比为28-30:1。

[0012] 进一步的,所述凝胶缓冲液由25mM咪唑、500mM甘氨酸的水溶液组成,所述凝胶缓冲液的pH值为7.0。

[0013] 进一步的,在配制所述混合溶液时,所述凝胶缓冲液与所述丙烯酰胺水溶液的体积比为9-11:1。

[0014] 进一步的,在配制所述混合溶液前,还包括:配制含聚乙烯醇的质量浓度为5%的聚乙烯醇水溶液。

[0015] 进一步的,在配制所述混合溶液时,所述聚乙烯醇水溶液与所述丙烯酰胺水溶液的体积比为1-2:1。

[0016] 进一步的,在配制所述混合溶液前,还包括:配制含硼砂的质量浓度为1%的硼砂水溶液,并在配制所述混合溶液时,所述硼砂水溶液与所述丙烯酰胺水溶液的体积比为1:8-15。

[0017] 进一步的,所述引发剂为过硫酸铵的质量浓度为10%的过硫酸铵水溶液。

[0018] 进一步的,所述加速剂为四甲基乙二胺。

[0019] 进一步的,在将引发剂和加速剂添加到所述混合溶液中,并将其混合均匀,获得凝胶制备液后,还包括:

[0020] 将所述凝胶制备液置于冰浴10-20min,并使所述凝胶制备液保持液体状态。

[0021] 本发明提供了一种非变性聚丙烯酰胺凝胶的制备方法,通过向含有低浓度的丙烯酰胺的凝胶制备液中加入聚乙烯醇和硼砂,通过利用硼砂中硼原子通过硼氧键与聚乙烯醇分子能够进行交联的特点,支撑起质量浓度低于3%的聚丙烯酰胺凝胶,甚至使得质量浓度小于1%丙烯酰胺也可以成胶。因此,通过本发明制备的非变性聚丙烯酰胺凝胶浓度低于3%,所能分离的蛋白复合物或病毒最多可达到几十万KD。总之,本发明制备的非变性聚丙烯酰胺凝胶是一种新型的适用于分离病毒和超大蛋白复合物的凝胶,并且这种凝胶能够成为分离病毒和超大分子量蛋白复合物的有力工具。

附图说明

[0022] 图1为通过本发明示例性实施例1的制备出的浓度为1%的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质分子量Marker的电泳图;

[0023] 图2为本发明示例性实施例2的制备出的浓度为1.5%的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质分子量Marker的电泳图;

[0024] 图3为本发明示例性实施例3的制备出的浓度为0.5%的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质分子量Marker的电泳图。

具体实施方式

[0025] 下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述,但是本领域技术人员将会理解,下列实施例仅用于说明本发明,而不应视为限制本发明的范围。实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市售购买获得的常规产品。

[0026] 一种非变性聚丙烯酰胺凝胶的制备方法,包括:

[0027] (1) 将丙烯酰胺、亚甲基双丙烯酰胺、凝胶缓冲液、聚乙烯醇、硼砂、纯净水混合,得到丙烯酰胺的质量浓度低于3%的混合溶液;

[0028] (2) 将引发剂和加速剂添加到混合溶液中,并将其混合均匀,获得凝胶制备液;

[0029] (3) 将凝胶制备液灌入到梯度混合仪的灌胶槽内并进行混合配胶,获得液体梯度胶;

[0030] (4) 将液体梯度胶室温放置30-50min,即可得到凝固的非变性聚丙烯酰胺凝胶。

[0031] 作为一优选实施方式,在配制混合溶液前,还包括:配制含丙烯酰胺和亚甲基双丙

烯酰胺质量浓度为30%的丙烯酰胺水溶液,其中,丙烯酰胺水溶液中的丙烯酰胺与亚甲基双丙烯酰胺的质量比为28-30:1。

[0032] 进一步的,凝胶缓冲液由25mM咪唑、500mM甘氨酸的水溶液组成,凝胶缓冲液的pH值为7.0;在配制所述混合溶液时,凝胶缓冲液与丙烯酰胺水溶液的体积比为9-11:1。

[0033] 进一步的,在配制混合溶液前,还包括:配制含聚乙烯醇的质量浓度为5%的聚乙烯醇水溶液,并在配制混合溶液时,聚乙烯醇水溶液与丙烯酰胺水溶液的体积比为1-2:1。

[0034] 进一步的,在配制混合溶液前,还包括:配制含硼砂的质量浓度为1%的硼砂水溶液,并在配制所述混合溶液时,硼砂水溶液与丙烯酰胺水溶液的体积比为1:8-15。

[0035] 进一步的,引发剂为过硫酸铵的质量浓度为10%的过硫酸铵水溶液,过硫酸铵可以产生自由基催化丙烯酰胺聚合成聚丙烯酰胺,是丙烯酰胺聚合的引发剂。

[0036] 作为一优选实施方式,加速剂为四甲基乙二胺。

[0037] 作为一优选实施方式,在将引发剂和加速剂添加到混合溶液中,并将其混合均匀,获得凝胶制备液后,还包括:将凝胶制备液置于冰浴10-20min,并使凝胶制备液保持液体状态,因为环境温度越低胶凝结的速度越慢,将凝胶制备液放置于冰上,可以充分延长凝胶的时间,使梯度胶的制备成为可能。

[0038] 本实施例是通过四甲基乙二胺催化过硫酸铵产生自由基而引发丙烯酰胺单体聚合,同时,亚甲基双丙烯酰胺与丙烯酰胺链间产生甲叉键交联,从而形成三维网状结构制备成凝胶;而浓度低于3%的丙烯酰胺由于丙烯酰胺单体含量过低而很难连成网状而成胶,此时利用硼砂通过硼氧键与聚乙烯醇分子交联也可成胶的特点,将硼砂和聚乙烯醇引入聚丙烯酰胺凝胶的低浓度组分,即可帮助支持低浓度的丙烯酰胺聚合成凝胶。

[0039] 实施例1

[0040] 一种非变性聚丙烯酰胺凝胶的制备方法,包括:

[0041] (1) 分别配制丙烯酰胺水溶液、凝胶缓冲液、含聚乙烯醇的质量浓度为5%的聚乙烯醇水溶液、含硼砂的质量浓度为1%的硼砂水溶液、含过硫酸铵的质量浓度为10%的过硫酸铵水溶液;其中,丙烯酰胺水溶液为含丙烯酰胺和亚甲基双丙烯酰胺质量浓度为30%的丙烯酰胺水溶液,且丙烯酰胺水溶液中的丙烯酰胺与亚甲基双丙烯酰胺的质量比为29:1;凝胶缓冲液由25mM咪唑、500mM甘氨酸的水溶液组成,凝胶缓冲液的pH值为7.0;

[0042] (2) 将0.6ml丙烯酰胺水溶液、6ml凝胶缓冲液、1ml聚乙烯醇水溶液、0.05ml硼砂水溶液、10.35ml纯净水混合,得到丙烯酰胺的质量浓度为1%的混合溶液;

[0043] (3) 将50 μ l过硫酸铵水溶液和5 μ l四甲基乙二胺添加到混合溶液中,并将其混合均匀,获得凝胶制备液后,将凝胶制备液置于冰浴20min,并使凝胶制备液保持液体状态;

[0044] (4) 将凝胶制备液灌入到梯度混合仪的灌胶槽内并进行混合配胶,获得梯度胶,其中,梯度混合仪的转速设为40转/分钟;

[0045] (5) 将梯度胶室温放置30min,即可得到浓度为1%的非变性聚丙烯酰胺凝胶。由图1可以看出本实施例制备出的是浓度为1%的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质分子量可达到 1.06×10^5 KD。

[0046] 实施例2

[0047] 一种非变性聚丙烯酰胺凝胶的制备方法,包括:

[0048] (1) 分别配制丙烯酰胺水溶液、凝胶缓冲液、含聚乙烯醇的质量浓度为5%的聚乙

烯醇水溶液、含硼砂的质量浓度为1%的硼砂水溶液、含过硫酸铵的质量浓度为10%的过硫酸铵水溶液；其中，丙烯酰胺水溶液为含丙烯酰胺和亚甲基双丙烯酰胺质量浓度为30%的丙烯酰胺水溶液，且丙烯酰胺水溶液中的丙烯酰胺与亚甲基双丙烯酰胺的质量比为29:1；凝胶缓冲液由25mM咪唑、500mM甘氨酸的水溶液组成，凝胶缓冲液的pH值为7.0；

[0049] (2) 将0.9ml丙烯酰胺水溶液、6ml凝胶缓冲液、0.6ml聚乙烯醇水溶液、0.03ml硼砂水溶液、10.47ml纯净水混合，得到丙烯酰胺的质量浓度为1.5%的混合溶液；

[0050] (3) 将49 μ l过硫酸铵水溶液和4.9 μ l四甲基乙二胺添加到混合溶液中，并将其混合均匀，获得凝胶制备液后，将凝胶制备液置于冰浴10min，并使凝胶制备液保持液体状态；

[0051] (4) 将凝胶制备液灌入到梯度混合仪的灌胶槽内并进行混合配胶，获得梯度胶，其中，梯度混合仪的转速设为40转/分钟；

[0052] (5) 将梯度胶室温放置40min，即可得到浓度为1.5%的非变性聚丙烯酰胺凝胶。由图2可以看出本实施例制备出的是浓度为1.5%的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质分子量可达到 5×10^3 KD。

[0053] 实施例3

[0054] 一种非变性聚丙烯酰胺凝胶的制备方法，包括：

[0055] (1) 分别配制丙烯酰胺水溶液、凝胶缓冲液、含聚乙烯醇的质量浓度为5%的聚乙烯醇水溶液、含硼砂的质量浓度为1%的硼砂水溶液、含过硫酸铵的质量浓度为10%的过硫酸铵水溶液；其中，丙烯酰胺水溶液为含丙烯酰胺和亚甲基双丙烯酰胺质量浓度为30%的丙烯酰胺水溶液，且丙烯酰胺水溶液中的丙烯酰胺与亚甲基双丙烯酰胺的质量比为29:1；凝胶缓冲液由25mM咪唑、500mM甘氨酸的水溶液组成，凝胶缓冲液的pH值为7.0；

[0056] (2) 将0.3ml丙烯酰胺水溶液、6ml凝胶缓冲液、1.2ml聚乙烯醇水溶液、0.06ml硼砂水溶液、10.44ml纯净水混合，得到丙烯酰胺的质量浓度为0.5%的混合溶液；

[0057] (3) 将51 μ l过硫酸铵水溶液和5.1 μ l四甲基乙二胺添加到混合溶液中，并将其混合均匀，获得凝胶制备液后，将凝胶制备液置于冰浴15min，并使凝胶制备液保持液体状态；

[0058] (4) 将凝胶制备液灌入到梯度混合仪的灌胶槽内并进行混合配胶，获得梯度胶，其中，梯度混合仪的转速设为40转/分钟；

[0059] (5) 将梯度胶室温放置50min，即可得到浓度为0.5%的非变性聚丙烯酰胺凝胶。由图3可以看出本实施例制备出的是浓度为0.5%的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质分子量可达到 1.27×10^5 KD。

[0060] 对比实施例1

[0061] (1) 分别配制丙烯酰胺水溶液、凝胶缓冲液、含过硫酸铵的质量浓度为10%的过硫酸铵水溶液；其中，丙烯酰胺水溶液为含丙烯酰胺和亚甲基双丙烯酰胺质量浓度为30%的丙烯酰胺水溶液，且丙烯酰胺水溶液中的丙烯酰胺与亚甲基双丙烯酰胺的质量比为29:1；凝胶缓冲液由25mM咪唑、500mM甘氨酸的水溶液组成，凝胶缓冲液的pH值为7.0；

[0062] (2) 将9ml丙烯酰胺水溶液、5ml凝胶缓冲液、1ml乙二醇混合，得到丙烯酰胺的质量浓度为18%的混合溶液；

[0063] (3) 将37.5 μ l过硫酸铵水溶液和3.75 μ l四甲基乙二胺添加到混合溶液中，并将其混合均匀，获得凝胶制备液后，将凝胶制备液置于冰浴15min，并使凝胶制备液保持液体状态；

[0064] (4) 将凝胶制备液灌入到梯度混合仪的灌胶槽内并进行混合配胶,获得梯度胶,其中,梯度混合仪的转速设为40转/分钟;

[0065] (5) 将梯度胶室温放置50min,即可得到浓度为18%的非变性聚丙烯酰胺凝胶。

[0066] 在对比实施例1中,加入乙二醇可以有效提高胶的分辨率,减小小分子量蛋白电泳条带弥散的情况而使电泳条带变得清晰,因而乙二醇只需要加在高浓度胶中。

[0067] 由对比实施例1可以看出,通过四甲基乙二胺催化过硫酸铵产生自由基而引发丙烯酸酰胺单体聚合,在丙烯酸酰胺的浓度较大时,亚甲基双丙烯酸酰胺与丙烯酸酰胺链间产生的甲叉键交联可以使形成三维网状结构制备成凝胶;而在含丙烯酸酰胺浓度较低时,由于丙烯酸酰胺单体含量过低而很难连成网状而成胶,如果没有如实施例1至3中的利用硼砂通过硼氧键与聚乙烯醇分子交联,将无法使低浓度的丙烯酸酰胺聚合成凝胶。

[0068] 尽管已经示出和描述了本发明的实施例,对于本领域的普通技术人员而言,可以理解在不脱离本发明的原理和精神的情况下可以对这些实施例进行多种变化、修改、替换和变型,本发明的范围由所附权利要求及其等同物限定。

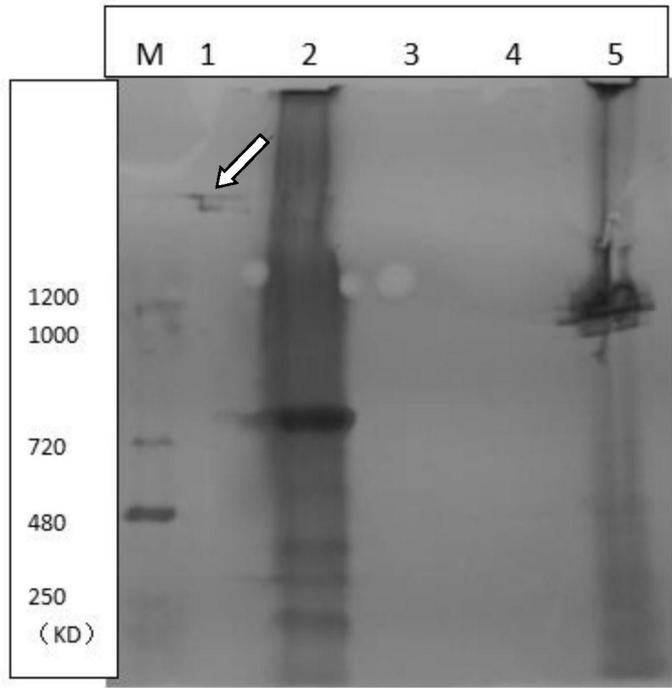


图1

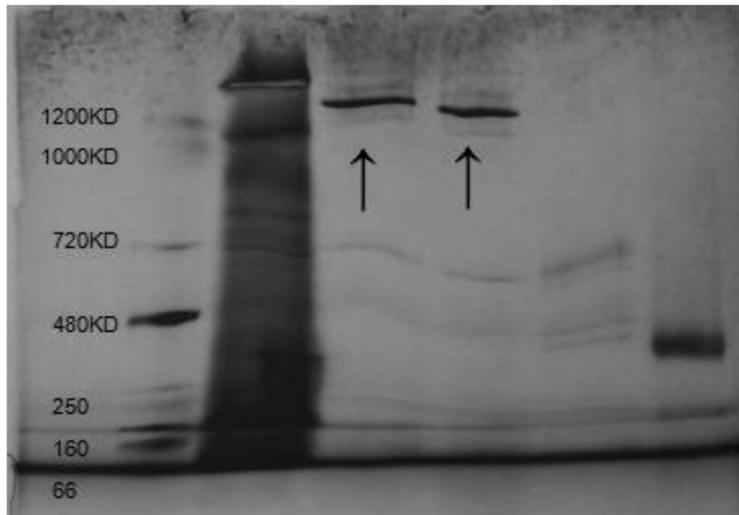


图2

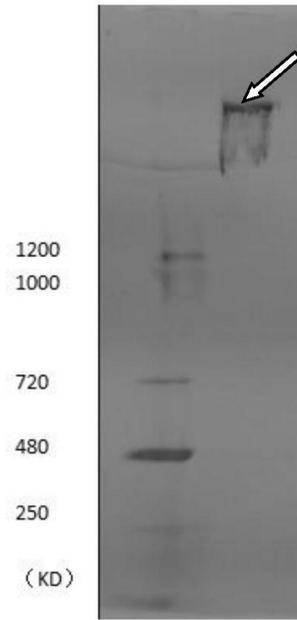


图3