



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102576003 B

(45) 授权公告日 2015. 11. 25

(21) 申请号 201080043742. 2

(22) 申请日 2010. 08. 24

(30) 优先权数据

61/236, 293 2009. 08. 24 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 03. 30

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2010/046510 2010. 08. 24

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/028535 EN 2011. 03. 10

(73) 专利权人 生命技术公司

地址 美国加利福尼亚

(72) 发明人 T·尤普蒂克 J·米勒

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 李程达

(51) Int. Cl.

G01N 27/447(2006. 01)

G01N 33/561(2006. 01)

(56) 对比文件

US 2005167269 A1, 2005. 08. 04,

US 5275708 A, 1994. 01. 04,

US 5464516 A, 1995. 11. 07,

US 6726821 B1, 2004. 04. 27,

WO 2009027983 A1, 2009. 03. 05,

审查员 刘迎鸣

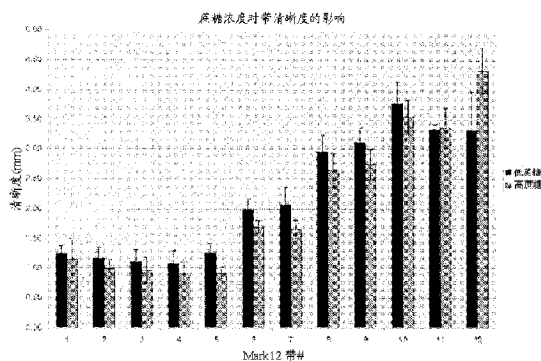
权利要求书3页 说明书20页 附图8页

(54) 发明名称

用于快速高分辨率凝胶电泳的系统

(57) 摘要

描述了电泳系统、配制品和方法,其使使用者能在高电压和减少的运行时间的条件下进行电泳实验。可以使电泳系统、配制品或方法在比本领域已经使用的可比较的系统高 50%的场强下运行。可以使目前描述的系统 and 配制品在大于 225V、大于 250V、大于 275V、大于 300V、大于 325V 或者大于 350V 的电压下运行。可以将进行电泳实验需要的时间减少到不到约 30 分钟、不到约 20 分钟、不到约 15 分钟或者不到约 12 分钟。



1. 一种不连续缓冲电泳系统,包括电泳分离凝胶和含水电泳缓冲液,其中所述电泳分离凝胶包括凝胶缓冲系统,所述缓冲系统包含:
凝胶胺缓冲剂,其中所述凝胶胺缓冲剂选自 Bis-Tris、Bis-Tris 丙烷、Tris、三乙醇胺、或者其盐,其中所述凝胶胺缓冲剂的浓度在 175mM 至 300mM 之间;和
凝胶两性电解质,其中所述凝胶两性电解质选自 tricine, bicine, PIPES, MOPSO, ACES, BES, 其中所述凝胶两性电解质的浓度在 25mM 至 125mM 的范围内;
其中所述含水电泳缓冲液包含缓冲两性电解质;
其中所述凝胶两性电解质与所述缓冲两性电解质不同。
2. 根据权利要求 1 所述的不连续缓冲电泳系统,其中所述分离凝胶包含丙烯酰胺、琼脂糖、或者丙烯酰胺和琼脂糖。
3. 根据权利要求 1 所述的不连续缓冲电泳系统,其中所述分离凝胶包含丙烯酰胺。
4. 根据权利要求 1 所述的不连续缓冲电泳系统,其中所述分离凝胶包含在 6 重量%至 25 重量%之间的丙烯酰胺。
5. 根据权利要求 1 所述的不连续缓冲电泳系统,其中所述分离凝胶包含在 8 重量%至 20 重量%之间的丙烯酰胺。
6. 根据权利要求 1 所述的不连续缓冲电泳系统,其中所述分离凝胶包含在 8 重量%至 15 重量%之间的丙烯酰胺。
7. 根据权利要求 1 所述的不连续缓冲电泳系统,其中所述电泳分离凝胶进一步包括连接到其一端的成层胶。
8. 根据权利要求 7 所述的不连续缓冲电泳系统,其中所述成层胶包含 4 重量%的丙烯酰胺。
9. 根据权利要求 1 所述的不连续缓冲电泳系统,其中所述凝胶胺缓冲剂的 pK 在 5.5 至 7.5 的范围内。
10. 根据权利要求 1 所述的不连续缓冲电泳系统,其中所述凝胶胺缓冲剂为 Bis-Tris。
11. 根据权利要求 9 或权利要求 10 所述的不连续缓冲电泳系统,其中所述凝胶胺缓冲剂的浓度在 190mM 至 295mM 的范围内。
12. 根据权利要求 1 所述的不连续缓冲电泳系统,其中所述凝胶两性电解质的 pK 比所述凝胶胺的 pK 高 1.5 个 pK 单位。
13. 根据权利要求 1 所述的不连续缓冲电泳系统,其中所述凝胶两性电解质的 pK 在 7 至 9 之间。
14. 根据权利要求 1 所述的不连续缓冲电泳系统,其中所述凝胶两性电解质的 pK 在 8 至 8.5 之间。
15. 根据权利要求 1 所述的不连续缓冲电泳系统,其中所述凝胶两性电解质的 pK 在 8.1 至 8.3 之间。
16. 根据权利要求 1 所述的不连续缓冲电泳系统,其中所述凝胶两性电解质为 Tricine、Bicine、甘氨酸或乙酰氨基甘氨酸。
17. 根据权利要求 1 所述的不连续缓冲电泳系统,其中所述凝胶两性电解质为 Tricine 或 Bicine。
18. 根据权利要求 16 或 17 任一项所述的不连续缓冲电泳系统,其中所述凝胶两性电

质的浓度在 50mM 至 100mM 的范围内。

19. 根据权利要求 16 或 17 任一项所述的不连续缓冲电泳系统,其中所述凝胶两性电解质的浓度为 50mM。

20. 根据权利要求 1 所述的不连续缓冲电泳系统,其中所述凝胶缓冲系统的 pH 在 6 至 8 的范围内。

21. 根据权利要求 1 所述的不连续缓冲电泳系统,其中所述凝胶缓冲系统的 pH 在 6.0 至 7.5 的范围内。

22. 根据权利要求 1 所述的不连续缓冲电泳系统,其中所述凝胶缓冲系统的 pH 为 6.5。

23. 根据权利要求 20 至 22 中任一项所述的不连续缓冲电泳系统,其中通过添加酸而调节所述 pH。

24. 根据权利要求 23 所述的不连续缓冲电泳系统,其中所述酸为 HCl。

25. 根据权利要求 1 所述的不连续缓冲电泳系统,其中所述凝胶缓冲系统进一步包括 Cl⁻ 离子源。

26. 根据权利要求 1 所述的不连续缓冲电泳系统,其中所述凝胶缓冲系统进一步包括 95mM 至 170mM 的 Cl⁻ 离子。

27. 根据权利要求 1 所述的不连续缓冲电泳系统,其中所述凝胶缓冲系统进一步包括 135mM 至 145mM 的 Cl⁻ 离子。

28. 根据权利要求 1 所述的不连续缓冲电泳系统,其中所述缓冲两性电解质在所述电泳缓冲液中的 pK 小于所述凝胶两性电解质的 pK。

29. 根据权利要求 1 所述的不连续缓冲电泳系统,其中所述缓冲两性电解质包括 MES、ADA、PIPES、ACES、BES、TES、HEPES、MOPS、CAPSO、DIPSO、POPSO、HEPPS、HEPPSO、其盐、或其任意组合。

30. 根据权利要求 1 所述的不连续缓冲电泳系统,其中所述缓冲两性电解质包括 MES、MOPS 或 DIPSO。

31. 根据权利要求 1 所述的不连续缓冲电泳系统,其中所述缓冲两性电解质包括 MES。

32. 根据权利要求 1 所述的不连续缓冲电泳系统,其中所述缓冲两性电解质包括 MOPS。

33. 根据权利要求 1 所述的不连续缓冲电泳系统,其中所述缓冲两性电解质包括 DIPSO。

34. 根据权利要求 1 所述的不连续缓冲电泳系统,其中所述电泳分离凝胶进一步包含蔗糖。

35. 根据权利要求 34 所述的不连续缓冲电泳系统,其中蔗糖的浓度小于 5 重量%。

36. 根据权利要求 34 所述的不连续缓冲电泳系统,其中蔗糖的浓度小于 3 重量%。

37. 根据权利要求 34 所述的不连续缓冲电泳系统,其中蔗糖的浓度小于 2 重量%。

38. 根据权利要求 34 所述的不连续缓冲电泳系统,其中蔗糖的浓度小于 1.5 重量%。

39. 根据权利要求 1 所述的不连续缓冲电泳系统,进一步包括在至少所述分离凝胶中的 SDS。

40. 根据权利要求 1 所述的不连续缓冲电泳系统,进一步包括在所述分离凝胶和所述电泳缓冲液中的 SDS。

41. 根据权利要求 1 所述的不连续缓冲电泳系统,其中所述分离凝胶为平板凝胶。

42. 根据权利要求 41 所述的不连续缓冲电泳系统,其中所述平板凝胶在两个玻璃或塑料板之间。

43. 一种套件,在至少第一适当的容器中包括:

一个或多个凝胶盒,所述凝胶盒中的每个包括根据权利要求 1 至 42 中任一项所述的电泳分离凝胶;和

根据权利要求 1 至 42 中任一项所述的含水电泳缓冲液。

用于快速高分辨率凝胶电泳的系统

背景技术

[0001] 发明背景

[0002] 本发明涉及用于凝胶电泳的技术和配制品。更具体地,本发明涉及用于在大体中性的 pH 下快速、高分辨率凝胶电泳的新系统和配制品。

[0003] 相关技术的描述

[0004] 凝胶电泳是用于分离生物分子的常用程序,生物分子例如脱氧核糖核酸 (DNA)、核糖核酸 (RNA)、多肽类和蛋白质类。在凝胶电泳时,根据施加的电场使它们通过过滤凝胶迁移的速率,将所述分子分成带。

[0005] 在这种技术中使用的基本装置由封入玻璃管中或者作为薄片夹在玻璃板或塑料板之间的凝胶组成。所述凝胶具有开放的分子网络结构,限定充满盐的导电缓冲溶液的孔。通过所述凝胶的这些孔是足够大的,以允许迁移大分子通过。

[0006] 将所述凝胶放在与缓冲溶液接触的室,所述缓冲溶液使所述凝胶与电源的阴极或阳极之间电接触。将含有所述大分子和示踪染料的样品放在所述凝胶之上。将电势施加到所述凝胶上,使所述样品大分子和示踪染料向所述凝胶的底部迁移。恰好在所述示踪染料到达所述凝胶的末端之前停止电泳。然后,确定分离的大分子的带的位置。通过与具有已知尺寸的示踪染料和大分子相比比较特殊带移动的距离,可以确定其它大分子的尺寸。

[0007] 大分子通过所述凝胶的迁移速率取决于四个要素:所述凝胶的孔隙率;所述大分子的尺寸和形状;所述大分子的电荷密度以及施加的场强。电泳系统通常试图控制这些因素,以便从凝胶到凝胶以及从样品到样品可重复。然而,在凝胶之间保持一致性是困难的,因为这些因素中的每个对所述凝胶系统的化学中的许多变量敏感。

[0008] 聚丙烯酰胺凝胶一般用于电泳。聚丙烯酰胺凝胶电泳或 PAGE 是流行的,因为所述凝胶是光学透明的、电中性的且可以制有一系列孔径。当与十二烷基硫酸钠 (SDS),即,作为 SDS-PAGE,一起使用时,通过将十二烷基硫酸钠 (SDS) 加入所述系统而控制所述大分子的电荷密度。SDS 分子与所述大分子结合且给予它们均匀的电荷密度,基本上使任何固有的分子电荷的作用无效。

[0009] 历史上,SDS-PAGE 凝胶通常在碱性 pH 下倾倒和运行。为了分离蛋白质使用的最常用的 PAGE 缓冲系统是由 Ornstein 和 Davis (Ornstein, L. (1964) Ann. NY Acad. Sci., 121: 321 和 Davis, B. J. (1964) Ann. NY Acad. Sci.: 121: 404) 开发的,且由 Laemmli (Laemmli, 1970, Nature 227, 680-686) 为了与 SDS 一起使用而改性的。Laemmli 缓冲系统由 0.375M 三(羟甲基)氨基甲烷 (Tris) 组成,将三(羟甲基)氨基甲烷 (Tris) 在所述分离胶中用 HCl 滴定到 pH 8.8。所述成层胶由 0.125M Tris 组成,将 Tris 滴定到 pH 6.8。阳极和阴极电泳缓冲液含有 0.024M Tris、0.192M 甘氨酸、0.1% SDS。可选的缓冲系统由 Schaeffer 和 von Jagow (Schaeffer, H. 和 von Jagow, G., Anal. Biochem. 1987, 166, 368-379) 公开。

[0010] Updyke 等的美国专利 No. 7, 422, 670 ; 6, 783, 651 ; 6, 143, 154 ; 6, 059, 948 ; 6, 096, 182 ; 6, 162, 338 ; 5, 922, 185 ; 和 5, 578, 180 描述了凝胶和不连续缓冲系统,其中分离在中性 pH 下发生,且其中所述蛋白质保持在基本上还原态。所述凝胶系统包括具有在 5.5

至 7.5 的范围内的 pK 的凝胶胺,且所述凝胶缓冲剂的 pH 在中性范围 (pH 6-8) 内。所述凝胶系统显示出凝胶基质和储备溶液的改善的稳定性。可以将所述凝胶在制冷下贮藏超过一年,而不实质损失性能。所述凝胶系统允许高分辨率蛋白质,其可以覆盖 2 至 200kDa 的分离范围。然而,当场强增加 50% 时,可以提高所述凝胶系统的拆分速度而这些凝胶配制品的分辨率恶化。

[0011] 存在对电泳凝胶配制品的需要,所述电泳凝胶配制品可以在 SDS-PAGE 凝胶上以显著减少的运行时间使蛋白质样品运行,在用 pH 中性的不连续缓冲系统保持或增加蛋白质分辨率时,所述 pH 中性的不连续缓冲系统在保持足够的缓冲能力以使用比现在的电泳凝胶配制品多约 50% 的场强实现这样的结果时产生较低的电导。

[0012] 发明概述

[0013] 在目前描述的实施方案中,描述了电泳系统、配制品、套件和方法,其使使用者在高电压和减少的运行时间的条件下进行电泳实验。所述系统配制品和方法对本领域已知的进行改进,且使使用者以高度的分辨率和比现在可买到的系统和配制品减少量的时间产生电泳拆分的蛋白质样品。可以使根据目前公开的实施方案实施的电泳系统、配制品或方法,例如在比本领域已经使用的可比较的系统高 50% 的场强下,运行。在一些实施方案中,可以使根据在此描述的系统、方法和配制品制备的电泳凝胶在大于 225V、大于 250V、大于 275V、大于 300V、大于 325V 或者大于 350V 的电压下运行。在一些实施方案中,根据在此描述的系统、方法和配制品制备的电泳凝胶可以使用在约 12v/cm 至约 20v/cm 的范围内、或者至少 12.0-13.0V/cm、至少 13.5-14V/cm、至少 15.0-15.5V/cm、至少 16.0-17.0V/cm、或者至少 17.5-18.5V/cm 的场强。

[0014] 在一些实施方案中,可以将进行电泳实验需要的时间减少到不到约 30 分钟、不到约 20 分钟、不到约 15 分钟或者不到约 12 分钟。

[0015] 在一些实施方案中,可以使用凝胶配制品进行电泳,所述凝胶配制品使用恒定电流形成本发明的基础。

[0016] 在一些实施方案中,可以使用凝胶配制品进行电泳,所述凝胶配制品使用恒定功率形成本发明的基础。

[0017] 根据目前描述的实施方案的电泳系统和方法可以是不连续缓冲系统的一部分。

[0018] 电泳系统可以包括聚丙烯酰胺电泳分离凝胶。在一些实施方案中,分离凝胶可以包括分离胶部分和浇注在所述分离胶部分上的任选的成层胶部分。在一个实施方案中,在所述成层部分中存在的聚丙烯酰胺、交联剂、或者聚丙烯酰胺和交联剂的百分率可以与在所述分离部分中存在的聚丙烯酰胺和 / 或交联剂的百分率不同。

[0019] 在一个实施方案中,所述分离部分可以包括与约 1% 至约 6% 的适当的交联剂例如双丙烯酰胺结合的约 3% 至约 25% 的聚丙烯酰胺。在一个实施方案中,可以使用约 2% 至约 5% 的交联剂使所述分离胶部分聚合。在一个实施方案中,分离胶可以包括多达约 25% 的聚丙烯酰胺、多达约 20% 的聚丙烯酰胺、多达约 15% 的聚丙烯酰胺、多达约 12% 的聚丙烯酰胺、多达约 10% 的聚丙烯酰胺、多达约 8% 的聚丙烯酰胺、多达约 6% 的聚丙烯酰胺、或者多达约 5% 的聚丙烯酰胺。

[0020] 在一个实施方案中,任选地,电泳分离凝胶可以包括,在所述成层部分、所述分离部分、或者所述成层部分和所述分离部分中,密度剂,例如蔗糖、甘油、或类似的非离子的密

度剂。在所述配制品中包括的密度剂的量可以在约 0 至约 10 体积%、约 0.5 至约 5 体积%、约 1.0 体积%至约 3.5 体积%、或者约 1.5 体积%至约 2 体积%的范围内。在一个实施方案中,在凝胶配制品中存在的密度的浓度可以是多达约 10 体积%、多达约 8.5 体积%、多达约 5 体积%、多达约 4.5 体积%、多达约 4 体积%、多达约 3.5 体积%、多达约 3 体积%、多达约 2.5 体积%、多达约 2 体积%、多达约 1.5 体积%、或者多达约 1.0 体积%。

[0021] 在一个实施方案中,至少所述分离胶部分可以包括缓冲系统,所述缓冲系统具有与凝胶两性电解质结合的凝胶胺缓冲剂。在替代实施方案中,所述成层胶部分和所述分离胶部分均可以包括与凝胶两性电解质结合的凝胶胺缓冲剂。

[0022] 多种凝胶胺缓冲剂可以用于制备在此描述的凝胶组合物。特别适合与主题电泳分离凝胶和系统一起使用的凝胶胺缓冲剂可以包括伯有机胺类或取代的胺类。所述凝胶胺缓冲剂的 pK_a 范围可以接近中性,典型地在约 5 至约 8 的范围内,在约 5.5 至约 7.5 的范围内,在约 6 至约 7 的范围内,在约 6.2 至约 6.8 的范围内,或者约 6.5。适合与在此描述的电泳系统和方法一起使用的示例性但非限制的凝胶胺缓冲剂可以包括双(2-羟乙基)-亚氨基-三(羟甲基)甲烷(以下称“Bis-Tris”)、1,3-双(三(羟甲基)甲氨基)丙烷(以下称“Bis-Tris 丙烷”)、三(羟甲基)氨基甲烷(以下称“Tris”)、三乙醇胺、或者其具有在约 5.5 至约 7.5 的范围内的 pK_a 值的任何衍生物或盐。在一些实施方案中,在所述凝胶中存在的凝胶胺缓冲剂的浓度可以在约 150mM 至约 350mM 的范围内,或者在约 165mM 至约 325mM 的范围内。典型地,在所述凝胶中存在的凝胶胺缓冲剂的浓度可以小于约 300mM。在某些非限制的实施方案中,在凝胶中存在的凝胶胺缓冲剂的浓度可以在约 175mM 至约 300mM 的范围内,或者在约 190mM 至约 295mM 的范围内。在一些实施方案中,可以在丙烯酰胺组分聚合以形成聚丙烯酰胺基质之后将所选择的凝胶胺缓冲剂固定在所述凝胶基质中。

[0023] 在一些实施方案中,特别适合与主题电泳分离凝胶和系统一起使用的凝胶两性电解质可以包括具有氨基且能够在水溶液中形成两性离子的任何生物缓冲剂。在一些实施方案中,非常适合与主题凝胶配制品一起使用的凝胶两性电解质会具有比所述凝胶胺的 pK_a 值高约 1.5pH 单位的 pK 值。作为非限制的例子,为了与目前描述的实施方案一起使用包括以下示例性的凝胶两性电解质:N-(三(羟甲基)甲基)甘氨酸(以下称“tricine”)、N,N-双(2-羟乙基)甘氨酸;N,N-二羟乙基甘氨酸(以下称“bicine”)、哌嗪-N,N'-双(2-乙磺酸)(以下称“PIPES”)、3-(N-吗啉代)-2-羟基丙磺酸(以下称“MOPSO”)、N-(2-乙酰氨基)-2-氨基乙磺酸(以下称“ACES”)、N,N-双(2-羟乙基)-2-氨基乙磺酸(以下称“BES”)、N-三(羟甲基)甲基-2-氨基乙磺酸(以下称“TES”)、-(2-羟甲基)-1-哌嗪乙磺酸(以下称“HEPES”)、2-氨基-甲基-1,3-丙二醇 3-[4-(2-羟乙基)-1-哌嗪基]丙磺酸(以下称“HEPPS”)、和 N-三(羟甲基)甲基-3-氨基丙磺酸(以下称“TAPS”)。当然,本领域技术人员容易明白的是具有至少一个胺或取代的胺且进一步具有比为了用于所述凝胶选择的凝胶胺高约 1.5pH 单位的 pK_a 的任何凝胶两性电解质可以用于实施目前描述的实施方案,在不偏离其精神和范围的情况下。两性电解质可以在约 25mM 至约 175mM、约 45mM 至约 100mM、约 50mM 至约 75mM 或者约 50mM 至约 60mM 的范围内的浓度在凝胶配制品中存在。

[0024] 在一些实施方案中,可以用适当的酸滴定所述主题电泳分离凝胶和系统,这样达到所述电泳凝胶的所需的 pH。在一个实施方案中,可以使用足够量的酸,这样所述电泳凝胶

的 pH 是大体中性的（即，在约 pH 5.5 至约 pH 7.5 的范围内）。在一个实施方案中，可以使用足够量的酸，这样所述电泳凝胶的 pH 在约 pH 5.5 至约 pH 7.5 的范围内，在约 pH 6 至约 pH 7 的范围内，或者在约 pH 6.2 至约 pH 6.8 的范围内。在一个实施方案中，可以使用足够量的酸，以将所述电泳凝胶的 pH 调节到大体中性，例如，约 6.2、约 6.3、约 6.4、约 6.5、约 6.6、约 6.7、约 6.8、约 6.9、约 7.0、约 7.1、或约 7.2 的 pH。典型地，但非排他地，选择的酸可以包括阴离子源，例如氯离子、磷酸盐离子、硫酸盐离子或乙酸盐离子。在所述凝胶配制品中存在的阴离子可以一部分作为用于不连续凝胶系统的前导离子源起作用。适合用于滴定本实施例的凝胶缓冲系统的示例性但非限制的酸是盐酸 (HCl)。在一个实施方案中，可以用所述伯胺和 / 或所述两性电解质的大约一半的 HCl（在摩尔基础上）滴定电泳凝胶，以便所述缓冲剂的 pH 是大约中性的。在一些实施方案中，用于滴定电泳凝胶的氯离子的最终浓度可以在约 95mM 至约 170mM、约 120mM 至约 160mM、约 135mM 至约 145mM 的范围内，或者约 140mM。

[0025] 在一个实施方案中，电泳系统可以另外包括含水电泳缓冲液。所述含水电泳缓冲液可以包括电泳缓冲液两性电解质。在一个实施方案中，所述电泳缓冲液可以包括与所述凝胶两性电解质不同的两性电解质。在一个实施方案中，电泳缓冲液两性电解质可以包括具有至少一个胺基的至少一种有机缓冲液两性电解质。在一个实施方案中，特别适合与目前描述的系统和方法一起使用的电泳缓冲液两性电解质的 pKa 会低于所述凝胶缓冲两性电解质的 pKa。

[0026] 在一些实施方案中，为了与所述主题电泳系统一起使用而选择的含水电泳缓冲液两性电解质可以形成不连续缓冲系统的基础。在这样的系统中，所述缓冲液两性电解质可以一部分作为用于不连续缓冲系统的尾随离子源起作用。

[0027] 适合与目前描述的系统和方法一起使用的含水电泳缓冲液两性电解质的非限制的例子包括 3-(N-吗啉代)丙磺酸 (“MOPS”)、2-(N-吗啉代)乙磺酸 (MES)、3-[N, N-双(2-羟乙基)氨基]-2-羟基丙磺酸 (以下称“DIPSO”)、N'-双(2-羟基丙磺酸) (“POPSO”)、HEPPS、N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-2-羟基丙磺酸 (“HEPPSO”)、或 3-[N-三(羟甲基)甲氨基]-2-羟基丙磺酸 (“TAPSO”)、或其任何适当的盐。典型地，在含水电泳缓冲液中存在的两性电解质的量会在约 10mM 至约 100mM、约 15mM 至约 75mM、约 25mM 至约 50mM 或者约 40mM 至约 45mM 的范围内。任选地，所述电泳缓冲液可以包括附加的缓冲剂，例如 Tris，除 SDS 和 / 或 EDTA 之外。非常适合与目前公开的实施方案一起使用的电泳缓冲液的示例性但非限制的例子可以包括 25-100mM MES、25-100mM Tris、约 0.05 至约 0.5% SDS 以及 0.5mM 至约 2mM EDTA。

[0028] 在一些实施方案中，根据目前描述的系统和方法制备的不连续缓冲电泳系统可以在超过 250V 的电压下运行且在不到 30 分钟内实现所述样品的完全拆分。在一些实施方案中，可以使根据目前描述的系统 and 配制品制备的电泳凝胶在大于 225V、大于 250V、大于 275V、大于 300V、大于 325V 或者大于 350V 的电压下运行。在一些实施方案中，可以将使用描述的系统和方法 and 凝胶进行电泳实验需要的时间减少到不到约 30 分钟、不到约 20 分钟、不到约 15 分钟或者不到约 12 分钟。

[0029] 在一些实施方案中，可以使用凝胶配制品进行电泳，所述凝胶配制品使用恒定电流形成本发明的基础。例如，在一些实施方案中，可以使用多达约 200mA、多达约 175mA、多

达约 150mA、多达约 125mA、或者多达约 115mA 的恒定电流使所述主题凝胶配制品经受电泳。

[0030] 在这样的条件下使用所述主题电泳分离系统和配制品经受电泳的样品可以达到基本上可与现在使用的凝胶配制品比较的分辨率。

[0031] 附图简述

[0032] 当与附图结合时,将通过参考根据本发明的目前优选但说明性的实施方案的以下详述而更充分地理解本发明的方法和装置的以上简述以及进一步的目的、特征和优点,其中:

[0033] 图 1 示出了根据一个实施方案的代表性的试验凝胶,其中将具有 357mM Bis-Tris、210mM Cl、pH 6.5 的 4%成层胶浇注在具有 100mM Bis-Tris、75mM Tricine、4 重量%的蔗糖以及 20mM BES 的 8%分离胶(S : R = 1 : 4)上,将 5 μ l 的 Mark12™蛋白质标记物在 300V 下在 MES SDS 电泳缓冲液中拆分 15min,且将所述凝胶用 SimplyBlue™ SafeStain 染色;

[0034] 图 2 示出了根据一个实施方案的代表性的试验凝胶,其中将具有 357mM Bis-Tris、210mM Cl、pH 6.5 的 4%成层胶浇注在具有 100mM Bis-Tris、75mM Tricine、4 重量%的蔗糖以及 20mM BES 的 8%分离胶(S : R = 41 : 59)上,将 5 μ l 的 Mark12™蛋白质标记物在 300V 下在 MES SDS 电泳缓冲液中拆分 16min,且将所述凝胶用 SimplyBlue™ SafeStain 染色;

[0035] 图 3 示出了根据一个实施方案的代表性的试验凝胶,其中将具有 357mM Bis-Tris、150mM H₂SO₄、pH 6.1 的 4%成层胶浇注在具有 100mM Bis-Tris、100mM Tricine、以及 4 重量%的蔗糖的 8%分离胶(S : R = 41 : 59)上,将 5 μ l 的 Mark12™蛋白质标记物在 300V 下在 MES 缓冲液中拆分 18min,且将所述凝胶用 SimplyBlue™ SafeStain 染色;

[0036] 图 4A 示出了根据一个实施方案的代表性的试验凝胶,其中将具有 178mM Bis-Tris、105mM Cl、pH 6.5 的 4%成层胶浇注在具有 178mM Bis-Tris、105mM Cl、没有 Tricine、以及 4 重量%的蔗糖的 8%分离胶(S : R = 1 : 3)上,将 5 μ l Mark12™蛋白质标记物装载在泳道 1-3、5、7、9 和 10,将 5 μ l SeeBlue Plus2®预染的蛋白质标准装载在泳道 4,将 10 μ g 大肠杆菌裂解物装载在泳道 6,且将 5 μ l Novex® Sharp 预染的蛋白质标准装载在泳道 8,且将所述凝胶在 MES SDS 电泳缓冲液中在 300V 下运行 13 分钟且用 SimplyBlue™ SafeStain 染色;

[0037] 图 4B 示出了根据一个实施方案的代表性的试验凝胶,其中将具有 178mM Bis-Tris、105mM Cl、pH 6.5 的 4%成层胶浇注在具有 178mM Bis-Tris、105mM Cl、没有 Tricine、以及 4 重量%的蔗糖的 8%分离胶(S : R = 1 : 3)上,将 5 μ l Mark12™蛋白质标记物装载在泳道 1-3、5、7、9 和 10,将 5 μ l SeeBlue Plus2®预染的蛋白质标准装载在泳道 4,将 10 μ g 大肠杆菌裂解物装载在泳道 6,且将 5 μ l Novex® Sharp 预染的蛋白质标准装载在泳道 8,且将所述凝胶在 MES SDS 电泳缓冲液中在 350V 下运行 10 分钟且用 SimplyBlue™ SafeStain 染色;

[0038] 图 5 示出了根据一个实施方案的代表性的试验凝胶,其中将具有 228mM Bis-Tris、210mM Cl、50mM Tricine、0%蔗糖、pH 6.5 的 4%成层胶浇注在具有 228mM Bis-Tris、140mM Cl、50mM Tricine、以及 4 重量%的蔗糖且没有 BES 的 8%分离胶(S : R = 1 : 4)上,将 5 μ l Mark12™蛋白质标记物装载在泳道 1、2、5-7、9 和 10,将 5 μ l

SeeBlue Plus2[®]预染的蛋白质标准装载在泳道 3,将 10 μg 大肠杆菌裂解物装载在泳道 4,且将 5 μl Novex[®] Sharp 预染的蛋白质标准装载在泳道 8,将所述凝胶在 MES SDS 电泳缓冲液中在 300V 下运行 13min 且用 SimplyBlue[™] SafeStain 染色;

[0039] 图 6A 示出了代表性的 NuPAGE[®] Novex 8% Bis-Tris 凝胶,其中将 5 μl Mark12[™] 蛋白质标记物装载在泳道 1、2、5-6、9 和 10,将 5 μl SeeBlue Plus2[®] 预染的蛋白质标准装载在泳道 3,将 10 μg 大肠杆菌裂解物装载在泳道 4,将 10 μl Mark12[™] 蛋白质标记物装载在泳道 7,且将 5 μl Novex[®] Sharp 预染的蛋白质标准装载在泳道 8,将所述凝胶在 MES SDS 电泳缓冲液中在 200V 下运行 32 分钟且用 SimplyBlue[™] SafeStain 染色;

[0040] 图 6B 示出了根据一个实施方案的代表性的试验凝胶,其中将具有 228mM Bis-Tris、140mM Cl、50mM Tricine、0% 蔗糖、pH 6.5 的 4% 成层胶浇注在具有 228mM Bis-Tris、140mM Cl、50mM Tricine、4% 的蔗糖、且没有 BES 的 8% 分离胶 (S : R = 1 : 4) 上,其中将 5 μl Mark12[™] 蛋白质标记物装载在泳道 1、2、5-6、9 和 10,将 5 μl SeeBlue Plus2[®] 预染的蛋白质标准装载在泳道 3,将 10 μg 大肠杆菌裂解物装载在泳道 4,将 10 μl Mark12[™] 蛋白质标记物装载在泳道 7,且将 5 μl Novex[®] Sharp 预染的蛋白质标准装载在泳道 8,且将所述凝胶在 MES SDS 电泳缓冲液中在 200V 下运行 29 分钟且用 SimplyBlue[™] SafeStain 染色;

[0041] 图 6C 示出了代表性的 NuPAGE[®] Novex 8% Bis-Tris 凝胶,其中将 5 μl Mark12[™] 蛋白质标记物装载在泳道 1、2、5-6、9 和 10,将 5 μl SeeBlue Plus2[®] 预染的蛋白质标准装载在泳道 3,将 10 μg 大肠杆菌裂解物装载在泳道 4,将 10 μl Mark12[™] 蛋白质标记物装载在泳道 7,且将 5 μl Novex[®] Sharp 预染的蛋白质标准装载在泳道 8,将所述凝胶在 MES SDS 电泳缓冲液中在 250V 下运行 20 分钟且用 SimplyBlue[™] SafeStain 染色;

[0042] 图 6D 示出了根据一个实施方案的代表性的试验凝胶,其中将具有 228mM Bis-Tris、140mM Cl、50mM Tricine、0% 蔗糖、pH 6.5 的 4% 成层胶浇注在具有 228mM Bis-Tris、140mM Cl、50mM Tricine、4% 的蔗糖、且没有 BES 的 8% 分离胶 (S : R = 1 : 4) 上,其中将 5 μl Mark12[™] 蛋白质标记物装载在泳道 1、2、5-6、9 和 10,将 5 μl SeeBlue Plus2[®] 预染的蛋白质标准装载在泳道 3,将 10 μg 大肠杆菌裂解物装载在泳道 4,将 10 μl Mark12[™] 蛋白质标记物装载在泳道 7,且将 5 μl Novex[®] Sharp 预染的蛋白质标准装载在泳道 8,且将所述凝胶在 MES SDS 电泳缓冲液中在 250V 下运行 19 分钟且用 SimplyBlue[™] SafeStain 染色;

[0043] 图 6E 示出了代表性的 NuPAGE[®] Novex 8% Bis-Tris 凝胶,其中将 5 μl Mark12[™] 蛋白质标记物装载在泳道 1、2、5-6、9 和 10,将 5 μl SeeBlue Plus2[®] 预染的蛋白质标准装载在泳道 3,将 10 μg 大肠杆菌裂解物装载在泳道 4,将 10 μl Mark12[™] 蛋白质标记物装载在泳道 7,且将 5 μl Novex[®] Sharp 预染的蛋白质标准装载在泳道 8,将所述凝胶在 MES SDS 电泳缓冲液中在 300V 下运行 16 分钟且用 SimplyBlue[™] SafeStain 染色;

[0044] 图 6F 示出了根据一个实施方案的代表性的试验凝胶,其中将具有 228mM Bis-Tris、140mM Cl、50mM Tricine、0% 蔗糖、pH 6.5 的 4% 成层胶浇注在具有 228mM Bis-Tris、140mM Cl、50mM Tricine、4% 的蔗糖、且没有 BES 的 8% 分离胶 (S : R = 1 : 4) 上,其中将 5 μl Mark12[™] 蛋白质标记物装载在泳道 1、2、5-6、9 和 10,将

5 μ l SeeBlue Plus2[®] 预染的蛋白质标准装载在泳道 3, 将 10 μ g 大肠杆菌裂解物装载在泳道 4, 将 10 μ l Mark12[™] 蛋白质标记物装载在泳道 7, 且将 5 μ l Novex[®] Sharp 预染的蛋白质标准装载在泳道 8, 且将所述凝胶在 MES SDS 电泳缓冲液中在 300V 下运行 16 分钟且用 SimplyBlue[™] SafeStain 染色;

[0045] 图 7A 示出了根据一个实施方案的代表性的试验凝胶, 其中将具有 228mM Bis-Tris、140mM Cl⁻、50mM Tricine、0% 蔗糖、pH 6.5 的 4% 成层胶浇注在具有 228mM Bis-Tris、140mM Cl⁻、50mM Tricine、1.5% 的蔗糖、且没有 BES 的 8% 分离胶 (S : R = 1 : 4) 上, 其中将 5 μ l Mark12[™] 蛋白质标记物装载在泳道 1、2、4-7、9 和 10, 将 10 μ g 大肠杆菌裂解物装载在泳道 3, 且将 5 μ l Novex[®] Sharp 预染的蛋白质标准装载在泳道 8, 将所述凝胶在 300V 下在 MES SDS 电泳缓冲液中运行 14min 且将所述凝胶用 SimplyBlue[™] SafeStain 染色;

[0046] 图 7B 示出了 20 孔 NuPAGE[®] Novex 8% Bis-Tris 凝胶的代表性的图像, 其中泳道 1、3、8、10、11、13、18 和 19 装载有 5 μ l Mark12[™] 蛋白质标记物, 泳道 5 装载有 10 μ g 大肠杆菌裂解物, 且泳道 16 装载有 10 μ l Novex[®] Sharp 预染的蛋白质标准, 将所述凝胶在 200V 下在 MES 缓冲液中运行 35min 且用 SimplyBlue[™] SafeStain 染色;

[0047] 图 7C 示出了 20 孔 NuPAGE[®] Novex 8% Bis-Tris 凝胶的代表性的图像, 其中泳道 1、3、8、10、11、13、18 和 19 装载有 5 μ l Mark12[™] 蛋白质标记物, 泳道 5 装载有 10 μ g 大肠杆菌裂解物, 且泳道 16 装载有 10 μ l Novex[®] Sharp 预染的蛋白质标准, 将所述凝胶在 250V 下在 MES 缓冲液中运行 22min 且用 SimplyBlue[™] SafeStain 染色;

[0048] 图 7D 是表示 Mark12[™] 蛋白质标记物组的每个单独带的相对清晰度 (通过像素面积测量) 的条形图, 其对使用在图 7A (灰条)、图 7B (黑条) 和图 7C (白条) 中描述的凝胶配制品的 7 次单独实验进行平均, X- 轴表示带数, 其中带数 1 是 200kDa Mark12[™] 带且带 12 是 2.5kDa 带;

[0049] 图 7E 是描述平均 R_f 值的图, 平均 R_f 值对于在图 7A、图 7B 和图 7C 中描述的每种凝胶配制品使用如指出的非线性动力学 TOTALLAB[™] v2003.02 软件或 QC 软件而得到;

[0050] 图 8A 示出了根据一个实施方案的代表性的试验凝胶, 其中将具有 228mM Bis-Tris、140mM Cl⁻、50mM Tricine、0% 蔗糖、pH 6.5 的 4% 成层胶浇注在具有 228mM Bis-Tris、140mM Cl⁻、50mM Tricine、1.75% 的蔗糖、且没有 BES 的 10% 分离胶 (S : R = 1 : 4) 上, 其中将 5 μ l Mark12[™] 蛋白质标记物装载在泳道 1、2、4-7、9 和 10, 将 10 μ g 大肠杆菌裂解物装载在泳道 3, 且将 5 μ l Novex[®] Sharp 预染的蛋白质标准装载在泳道 8, 将所述凝胶在 300V 下在 MES SDS 电泳缓冲液中运行 16min 且将所述凝胶用 SimplyBlue[™] SafeStain 染色;

[0051] 图 8B 示出了 10 孔 NuPAGE[®] Novex 10% Bis-Tris 凝胶的代表性的图像, 其中将 5 μ l Mark12[™] 蛋白质标记物装载在泳道 1、2、4-7、9 和 10, 将 10 μ g 大肠杆菌裂解物装载在泳道 3, 且将 5 μ l Novex[®] Sharp 预染的蛋白质标准装载在泳道 8, 将所述凝胶在 200V 下在 MES 缓冲液中运行 36 分钟且用 SimplyBlue[™] SafeStain 染色;

[0052] 图 8C 示出了 10 孔 NuPAGE[®] Novex 10% Bis-Tris 凝胶的代表性的图像, 其中将 5 μ l Mark12[™] 蛋白质标记物装载在泳道 1、2、4-7、9 和 10, 将 10 μ g 大肠杆菌裂解物装载在

泳道 3, 且将 5 μ l Novex[®] Sharp 预染的蛋白质标准装载在泳道 8, 将所述凝胶在 250V 下在 MES 缓冲液中运行 24 分钟且用 SimplyBlue[™] SafeStain 染色;

[0053] 图 8D 是表示 Mark12[™]蛋白质标记物组的每个单独带的相对清晰度(通过像素面积测量)的条形图, 其对使用在图 8A(灰条)、图 8B(黑条)和图 7C(白条)中描述的凝胶配制品的 7 次单独实验进行平均, X-轴表示带数, 其中带数 1 是 200kDa Mark12[™]带且带 12 是 2.5kDa 带;

[0054] 图 8E 是描述在图 8A、图 8B 和图 7C 中描述的每种凝胶配制品的平均 R_f 值的图, 平均 R_f 值使用如指出的 TOTALLAB[™] 软件或 QC 软件而得到;

[0055] 图 9A 示出了根据一个实施方案的代表性的试验凝胶, 其中将具有 228mM Bis-Tris、140mM Cl、50mM Tricine、0% 蔗糖、pH 6.5 的 4% 成层胶浇注在具有 228mM Bis-Tris、140mM Cl、50mM Tricine、1.5-2% 的蔗糖、且没有 BES 的 4-12% 梯度胶上, 其中将 5 μ l Mark12[™]蛋白质标记物装载在泳道 1、2、4-7、9 和 10, 将 10 μ g 大肠杆菌裂解物装载在泳道 3, 且将 5 μ l Novex[®] Sharp 预染的蛋白质标准装载在泳道 8, 将所述凝胶在 300V 下在 MES SDS 电泳缓冲液中运行 17min 且将所述凝胶用 SimplyBlue[™] SafeStain 染色;

[0056] 图 9B 示出了 10 孔 NuPAGE[®] Novex 4-12% Bis-Tris 凝胶的代表性的图像, 其中将 5 μ l Mark12[™]蛋白质标记物装载在泳道 1、2、4-7、9 和 10, 将 10 μ g 大肠杆菌裂解物装载在泳道 3, 且将 5 μ l Novex[®] Sharp 预染的蛋白质标准装载在泳道 8, 将所述凝胶在 200V 下在 MES 缓冲液中运行 37 分钟且用 SimplyBlue[™] SafeStain 染色;

[0057] 图 9C 示出了 10 孔 NuPAGE[®] Novex 4-12% Bis-Tris 凝胶的代表性的图像, 其中将 5 μ l Mark12[™]蛋白质标记物装载在泳道 1、2、4-7、9 和 10, 将 10 μ g 大肠杆菌裂解物装载在泳道 3, 且将 5 μ l Novex[®] Sharp 预染的蛋白质标准装载在泳道 8, 将所述凝胶在 250V 下在 MES 缓冲液中运行 25 分钟且用 SimplyBlue[™] SafeStain 染色;

[0058] 图 9D 是表示 Mark12[™]蛋白质标记物组的每个单独带的相对清晰度(通过像素面积测量)的条形图, 其对使用在图 9A(灰条)、图 9B(黑条)和图 9C(白条)中描述的凝胶配制品的 7 次单独实验进行平均, X-轴表示带数, 其中带数 1 是 200kDa Mark12[™]带且带 12 是 2.5kDa 带;

[0059] 图 9E 是描述在图 9A、图 9B 和图 7C 中描述的每种凝胶配制品的平均 R_f 值的图, 平均 R_f 值使用如示的 TOTALLAB[™] 软件或 QC 软件而得到;

[0060] 图 10A 示出了根据一个实施方案的代表性的试验凝胶, 其中将具有 357mM Bis-Tris、210mM Cl、pH 6.5 的 4% 成层胶浇注在具有 228mM Bis-Tris、140mM Cl、50mM Tricine、2 重量% 的蔗糖、且没有 BES 的 12% 分离胶(S : R = 1 : 4) 上, 其中将 5 μ l 的 Mark12[™]蛋白质标记物装载在泳道 1-10, 将所述凝胶在 300V 下在 MES SDS 电泳缓冲液中运行 15min, 且将所述凝胶用 SimplyBlue[™] SafeStain 染色;

[0061] 图 10B 示出了根据一个实施方案的代表性的试验凝胶, 其中将具有 228mM Bis-Tris、140mM Cl、50mM Tricine、0% 的蔗糖、pH 6.5 的 4% 成层胶浇注在具有 228mM Bis-Tris、140mM Cl、50mM Tricine、4 重量% 的蔗糖、且没有 BES 的 12% 分离胶(S : R = 1 : 4) 上, 其中将 5 μ l 的 Mark12[™]蛋白质标记物装载在泳道 1-10, 将所述凝胶在 300V 下在 MES SDS 电泳缓冲液中运行 26min, 且将所述凝胶用 SimplyBlue[™] SafeStain 染色;

[0062] 图 10C 是表示 Mark12[™]蛋白质标记物组的每个单独带的相对清晰度(通过像素

面积测量)的条形图,其对使用在图 10A(黑条)和图 10B(阴影线条)中描述的凝胶配制品的四次单独实验进行平均,X-轴表示带数,其中带数 1 是 200kDa Mark12™带且带 12 是 2.5kDa 带。

[0063] 虽然本发明易受到各种修改和替代形式,其特定实施方案在附图中通过举例示出且将在此详细描述。附图可能不是按比例。应该理解的是附图及其详细描述不打算将本发明限制到公开的具体形式,但是相反,本发明将包括落在由所附的权利要求限定的本发明的精神和范围内的所有修改、等同物和替代物。

[0064] 实施方案详述

[0065] 定义

[0066] 遍及本说明书使用的术语通常具有它们在本领域中的普通含义,在本发明的上下文内,且在每个术语使用的特定上下文中。以下或者在说明书的别处讨论某些术语,以在描述本发明的装置和方法且怎样制造和使用方面为从业者提供附加的指导。可以理解的是可以超过一种的方式描述相同的事物。因此,替代的语言和同义词可以用于在此描述的术语的任何一种或多种,而不是放在是否在此详细说明或者更详细地讨论术语上的任何特殊重要性。提供某些术语的同义词。详述一个或多个同义词不排除使用其它同义词。在本说明书中任何地方的例子(包括在此讨论的任何术语的例子)的使用仅仅是说明性的,且决不限在此陈述的实施方案中的任何一个或者任何例证的术语的范围和含义。

[0067] 如在此所使用的,术语“不连续缓冲剂”、“不连续系统”和“不连续缓冲系统”通常是指用于聚丙烯酰胺凝胶电泳系统的两种含水缓冲系统中的一种。不连续缓冲系统功能地和化学上区别于连续缓冲系统。典型地,连续系统仅仅具有单个分离凝胶且在所述槽和所述凝胶中使用相同的缓冲剂。在不连续系统中,将非限制性的大孔凝胶,被称为成层胶,层叠在分离胶(有时被称为“分离胶”)之上。每种凝胶均可以用相同或不同缓冲剂制成,且槽缓冲剂与凝胶缓冲剂不同。不连续性由较快移动的前导离子(例如,氯根离子)和较慢移动的尾随离子(MES、MOPS、甘氨酸或 Tricine)的离子迁移率的差异产生。对于含有被分析物的稀溶液的样品,在不连续系统中得到的分辨率比连续系统得到的分辨率大得多,由于不连续系统的浓缩效应以产生分析物分子的尖锐起始区。连续缓冲系统与不连续缓冲系统的差异对于本发明所属领域的技术人员是公知的。

[0068] 术语“带清晰度”是用于比较当它们在各种凝胶配制品上出现时迁移的带的清晰度的相对术语。特别是当比较在各种凝胶配制品中的两种或更多种之间的相对带清晰度时,使用所述术语。多种方法可以用于确定带清晰度。例如,根据得到的拆分程度,可以通过目测确定带清晰度或者带清晰度改善到的程度。为了得到带清晰度的更定量的估计,使用者可以使用凝胶成像软件。本领域典型地使用的示例性但非限制的凝胶分析软件是,例如, TOTALLAB™软件(Nonlinear Dynamics Ltd, Durham, NC)、GEL-PRO™ Analyzer(Media Cybernetics, Bethesda, MD)或者LABIMAGE® 1D L300Gel Analysis 软件(LabImage, Leipzig, Germany)。可以通过测量凝胶中的每个拆分的带的面积,且通过每个孔的宽度(其通常是恒定的)划分所述面积而确定带清晰度。确定带清晰度的另一种方法可以是直接测量通过凝胶分析算法检测的各个峰的宽度。

[0069] 在此描述了电泳系统、配制品和方法,其使使用者在高电压和减少的运行时间的条件下进行电泳实验。所述系统配制品和方法对本领域已知的进行改进,且使使用者以高

度的分辨率和比现在可买到的系统和配制品减少量的运行时间产生电泳拆分的蛋白质。可以使根据目前公开的实施方案实施的电泳系统、配制品或方法在比本领域已经使用的可比较的系统高 50% 的场强下运行。作为例子,可以使根据目前描述的系统 and 配制品制备的电泳凝胶在大于 225V、大于 250V、大于 275V、大于 300V、大于 325V 或者大于 350V 的电压下运行。可以将进行电泳需要的时间减少到不到约 30 分钟、不到约 20 分钟、不到约 15 分钟或者不到约 12 分钟。在一些实施方案中,可以使用凝胶配制品进行电泳,所述凝胶配制品使用恒定电流形成本发明的基础。例如,在一些实施方案中,可以使用多达约 200mA、多达约 175mA、多达约 150mA、多达约 125mA、或者多达约 115mA 的恒定电流使所述主题凝胶配制品经受电泳。

[0070] 在一个实施方案中,电泳系统可以包括凝胶和缓冲剂系统,其中分离在大体中性的 pH 下发生。不受任何特殊理论或机理约束,据认为使用中性 pH 的电泳系统保证在经受电泳的样品内的生物分子(例如,蛋白质类、核酸类、碳水化合物等等)仍然是完全或基本上还原和不水解的。有利地,在中性 pH 下,蛋白质的伯氨基不易与未聚合的丙烯酰胺反应,由此允许较大的分辨率和改善的带清晰度。另外,在中性 pH 下,巯基比在碱性较强的条件下更不易氧化,传统上在碱性较强的条件下进行 SDS-PAGE。在一些实施方案中,当用作不连续缓冲系统的一部分时,形成本发明的基础的凝胶配制品可以最佳地起作用。不连续缓冲系统是在阳极室、阴极室、或者阳极室和阴极室中使用与在所述凝胶中存在的缓冲剂不同的含水缓冲剂的一种。含水电泳缓冲液的浓度可以与所述电泳凝胶的缓冲剂浓度不同。在一些实施方案中,根据本发明的凝胶配制品可以包括成层胶和分离胶。

[0071] 产生的凝胶电泳系统显示出在高电压下改善的所述凝胶基质和缓冲溶液的改善的稳定性,由此使凝胶电泳在比传统电泳系统高的电压下进行,而不危害带清晰度。可以将根据目前描述的配制品和方法制备的凝胶贮藏在制冷下至少多达约十六个月,而不损失性能。另外,可以将没有聚合引发剂的储备缓冲剂和储备凝胶溶液在室温下贮藏几个星期或更长时间,而不损失性能。使用在此描述的系统和方法,8% 聚丙烯酰胺凝胶,例如,可以在不到 15 分钟内拆分在约 2 至 250kDa 的分离范围内的蛋白质样品。

[0072] 在一些实施方案中,凝胶配制品可以包括成层胶和分离胶。成层胶与分离胶的比(也被表示为 S : R)可以是约 0.5 : 9.5、约 1 : 9、约 1.5 : 8.5、约 2 : 8、约 2.5 : 7.5、约 3 : 7、约 3.5 : 6.5、约 4 : 6、约 4.5 : 5.5、或者约 1 : 1。当用于不连续凝胶电泳系统的上下文时,术语成层胶和分离胶的含义,对于具有本领域的普通技术的从业者来说是公知的。典型地,在成层胶中存在的聚丙烯酰胺和 / 或交联剂(例如,双丙烯酰胺)的百分率可以小于在分离胶中存在的聚丙烯酰胺和 / 或交联剂的百分率。在一些实施方案中,在成层胶中存在的聚丙烯酰胺的百分率会小于约 6%、小于约 5%、小于约 4%、小于约 3%。

[0073] 在电泳系统和配制品的一个实施方案中,使用约 1% 至约 6% 的适当的交联剂(% C) 例如双丙烯酰胺使具有在约 3% 与约 25% (% T) 之间的丙烯酰胺的分离聚丙烯酰胺凝胶聚合。在一个实施方案中,在凝胶缓冲剂的存在下使用约 2% 至约 5% 的交联剂(% C) 使所述凝胶聚合。在一个实施方案中,聚丙烯酰胺凝胶可以包括 25% 的丙烯酰胺、24% 的丙烯酰胺、23% 的丙烯酰胺、22% 的丙烯酰胺、21% 的丙烯酰胺、20% 的丙烯酰胺、19% 的丙烯酰胺、18% 的丙烯酰胺、17% 的丙烯酰胺、16% 的丙烯酰胺、15% 的丙烯酰胺、14% 的丙烯酰胺、13% 的丙烯酰胺、12% 的丙烯酰胺、11% 的丙烯酰胺、10% 的丙烯酰胺、9% 的丙烯酰胺、

8%的丙烯酰胺、7%的丙烯酰胺、6%的丙烯酰胺、或者5%的丙烯酰胺。

[0074] 在电泳系统和配制品的一个实施方案中,任选地,还原剂可以包括在所述凝胶、所述缓冲剂或所述加样缓冲液中的一种或多种中,以便保持化学还原环境。多种适当的还原剂是本领域已知的,其中的任何一种适合与在此公开的实施方案一起使用。作为非限制的例子,可以将还原剂,例如巯基乙酸(TGA)或亚硫酸氢钠,加入所述配制品。这样的还原剂的适当的浓度范围可以是约0.5mM至约20mM、约1mM至约15mM、约2mM至约10mM或者约5mM至约7.5mM。在包括任选的还原剂的一些实施方案中,可以将所述还原剂加入所述凝胶电泳缓冲液。

[0075] 在某些非限制但优选的实施方案中,所述SDS可以基本上不存在于所述电泳凝胶中且可以代替地在所述电泳缓冲液和/或加样缓冲液中提供。以下详细描述多种适当的电泳缓冲液。

[0076] 在一些实施方案中,根据目前描述的实施方案的聚丙烯酰胺凝胶可以包括伯有机胺或者单取代或二取代的胺缓冲剂。所述凝胶胺缓冲剂的pKa范围可以接近中性,典型地在约5至约8的范围内,在约5.5至约7.5的范围内,在约6至约7的范围内,在约6.2至约6.8的范围内,或者约6.5。所述凝胶胺缓冲剂的pKa范围可以接近中性,典型地在约5至约8的范围内,在约5.5至约7.5的范围内,在约6至约7的范围内,在约6.2至约6.8的范围内,或者约6.5。适合与在此描述的电泳系统和方法一起使用的示例性但非限制的凝胶胺缓冲剂可以包括双(2-羟乙基)-亚氨基-三(羟甲基)甲烷(以下称“Bis-Tris”)、1,3-双(三(羟甲基)甲氨基)丙烷(以下称“Bis-Tris丙烷”)、三(羟甲基)氨基甲烷(以下称“Tris”)、三乙醇胺、或者其具有在约5.5至约7.5的范围内的pKa值的任何衍生物或盐。当然,本领域技术人员容易明白的是在实施目前描述的实施方案期间可以使用具有至少一个伯胺或取代的胺且进一步具有在5.5至7.5的范围内的pKa的任何凝胶胺缓冲剂,而不偏离其精神和范围。

[0077] 在一些实施方案中,在所述凝胶中存在的凝胶胺缓冲剂的浓度可以在约150mM至约350mM的范围内,或者在约165mM至约325mM的范围内。典型地,在所述凝胶中存在的凝胶胺缓冲剂的浓度可以小于约300mM。在某些非限制实施方案中,在凝胶中存在的凝胶胺缓冲剂的浓度可以在约175mM至约300mM的范围内,或者在约190mM至约295mM的范围内。

[0078] 在一些实施方案中,可以将所述凝胶胺缓冲剂作为水溶液直接加入所述分离胶、所述成层胶、或者所述分离胶和成层胶,在合并其其它含水组分时且在聚合反应引发之前。可选地,可以通过将聚合的凝胶浸在含有所需浓度的凝胶胺缓冲剂的水溶液中且使所述凝胶胺缓冲剂渗入所述聚合的凝胶基质而将所述凝胶胺缓冲剂结合到所述凝胶基质中。

[0079] 在一些实施方案中,形成电泳系统的基础的聚丙烯酰胺凝胶可以包括与以上描述的凝胶胺结合的凝胶两性电解质。适合与所述主题凝胶配制品一起使用的凝胶两性电解质可以包括,无限制地,具有氨基且能够在水溶液中形成两性离子的任何生物缓冲剂。在一些实施方案中,非常适合与所述主题凝胶配制品一起使用的凝胶两性电解质会具有比所述凝胶胺的pKa值高约1.5pH单位的pK值。作为非限制的例子,为了与目前描述的实施方案一起使用包括以下示例性的凝胶两性电解质:N-(三(羟甲基)甲基)甘氨酸(以下称“tricine”)、N,N-双(2-羟乙基)甘氨酸;N,N-二羟乙基甘氨酸(以下称“bicine”)、哌嗪-N,N'-双(2-乙磺酸)(以下称“PIPES”)、3-(N-吗啉代)-2-羟基丙磺酸(以下称

“MOPSO”)、N-(2-乙酰氨基)-2-氨基乙磺酸(以下称“ACES”)、N,N-双(2-羟乙基)-2-氨基乙磺酸(以下称“BES”)、N-三(羟甲基)甲基-2-氨基乙磺酸(以下称“TES”)、-(2-羟甲基)-1-哌嗪乙磺酸(以下称“HEPES”)、2-氨基-甲基-1,3-丙二醇 3-[4-(2-羟乙基)-1-哌嗪基]丙磺酸(以下称“HEPPS”)、和 N-三(羟甲基)甲基-3-氨基丙磺酸(以下称“TAPS”)。当然,本领域技术人员容易明白的是具有至少一个胺或取代的胺且进一步具有比用于所述凝胶选择的凝胶胺高约 1.5pH 单位的 pKa 的任何凝胶两性电解质可以用于实施目前描述的实施方案,而不偏离其精神和范围。两性电解质可以在约 25mM 至约 175mM、约 45mM 至约 100mM、约 50mM 至约 75mM 或者约 50mM 至约 60mM 的范围内的浓度在凝胶配制品中存在。

[0080] 在一些实施方案中,可以将所述凝胶两性电解质作为水溶液直接加入所述分离胶、所述成层胶、或者所述分离胶和成层胶,在合并其的其它含水组分时且在聚合反应引发之前。可选地,可以通过将聚合的凝胶浸在含有所需浓度的凝胶两性电解质的水溶液中且使所述凝胶两性电解质渗入所述聚合的凝胶基质而将所述凝胶两性电解质结合到所述凝胶基质中。

[0081] 在一些实施方案中,可以用适当的酸滴定所述主题缓冲凝胶系统和配制品,这样达到所述电泳凝胶的所需的 pH。在一个实施方案中,可以使用足够量的酸,这样所述电泳凝胶的 pH 是大体中性的(即,在约 pH 5.5 至约 pH 7.5 的范围内)。在一个实施方案中,可以使用足够量的酸,这样所述电泳凝胶的 pH 在约 pH 5.5 至约 pH 7.5 的范围内,在约 pH 6 至约 pH 7 的范围内,或者在约 pH 6.2 至约 pH 6.8 的范围内。在一个实施方案中,可以使用足够量的酸,以将所述电泳凝胶的 pH 调节到大体中性,例如,约 6.2、约 6.3、约 6.4、约 6.5、约 6.6、约 6.7、约 6.8、约 6.9、约 7.0、约 7.1、或约 7.2 的 pH。典型地,但非排他地,选择的酸可以包括阴离子源,例如氯离子、磷酸盐离子、硫酸盐离子或乙酸盐离子。在所述凝胶配制品中存在的阴离子可以一部分作为用于不连续凝胶系统的前导离子源起作用。适合用于滴定本实施方案的凝胶缓冲系统的示例性但非限制的酸是盐酸(HCl)。在一个实施方案中,可以用所述伯胺和/或所述两性电解质的大约一半的 HCl(在摩尔基础上)滴定电泳凝胶,以便所述缓冲剂的 pH 是大约中性的。在一些实施方案中,用于滴定电泳凝胶的氯离子的最终浓度可以在约 95mM 至约 170mM、约 120mM 至约 160mM、约 135mM 至约 145mM 的范围内,或者为约 140mM。

[0082] 在一些实施方案中,在不连续凝胶系统中作为前导离子源起作用的阴离子可以在所述成层胶中、在所述分离胶中、或者在所述成层胶和所述分离胶中存在。适合用于目前描述的凝胶配制品的示例性但非限制的前导离子可以包括阴离子,例如氯离子、磷酸盐离子、硫酸盐离子或乙酸盐离子。这样的阴离子源可以包括 HCl 或任何酰基卤、磷酸、硫酸、或乙酸。

[0083] 在一个实施方案中,前导离子在所述成层胶中的浓度可以比前导离子在所述分离胶中的浓度高。在另一个实施方案中,前导离子在所述成层胶中的浓度可以与前导离子在所述分离胶中的浓度基本上相同。在一些实施方案中,前导离子在所述成层胶中的浓度可以是多达约 350mM、多达约 300mM、多达约 250mM、多达约 200mM、多达约 150mM、多达约 125mM、多达约 110mM、多达约 100mM 或者多达约 75mM。

[0084] 在一些实施方案中,任选地,根据目前描述的实施方案的电泳凝胶可以包括密度剂,例如,蔗糖、甘油、或类似的试剂。在所述配制品中包括的密度剂的量可以在约 0 至约 8

重量%、约 0.5 至约 5 重量%、约 1.0 重量%至约 3.5 重量%、或者约 1.5 重量%至约 2 重量%的范围内。在一个实施方案中,在凝胶配制品中存在的蔗糖的浓度可以是多达约 10 重量%、多达约 8.5 重量%、多达约 5 重量%、多达约 4.5 重量%、多达约 4 重量%、多达约 3.5 重量%、多达约 3 重量%、多达约 2.5 重量%、多达约 2 重量%、多达约 1.5 重量%、多达约 1.0 重量%或者多达约 0.5 重量%。在一些实施方案中,在电泳凝胶中存在的密度剂的量可以变化。有利地,在制备梯度胶期间可以使用一些实施方案,例如,在例如美国专利 No. 6, 472, 503 和 6, 197, 173 中描述的方法。

[0085] 可以使用含水电泳缓冲液系统使根据以上公开的配制品制备的凝胶经受电泳。典型地,所述含水电泳缓冲液系统可以包括具有至少一个胺基的至少一种缓冲两性电解质。在一个实施方案中,为了与所述主题不连续电泳系统一起使用而选择的电泳缓冲液两性电解质会与在与所述含水电泳缓冲液一起使用的电泳凝胶中存在的凝胶缓冲两性电解质不同。在一个实施方案中,选择的电泳缓冲液两性电解质的 pKa 可以小于使用的凝胶缓冲两性电解质的 pKa。

[0086] 在某些特别优选的实施方案中,优选地,选择的含水电泳缓冲液两性电解质将形成不连续缓冲系统的基础。在这样的系统中,所述电泳缓冲液两性电解质可以一部分作为用于不连续缓冲系统的尾随离子起作用。在一个实施方案中,特别适合与目前描述的系统和方法一起使用的电泳缓冲液两性电解质的 pKa 会低于所述凝胶缓冲两性电解质的 pKa。

[0087] 适合与目前描述的系统和方法一起使用的含水电泳缓冲液两性电解质的非限制的例子包括 3-(N-吗啉代)丙磺酸(“MOPS”)、2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)、3-[N, N-双(2-羟乙基)氨基]-2-羟基丙磺酸(以下称“DIPSO”)、N'-双(2-羟基丙磺酸)(“POPSO”)、HEPPS、N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-2-羟基丙磺酸(“HEPPSO”)、或 3-[N-三(羟甲基)甲氨基]-2-羟基丙磺酸(“TAPSO”)、或其任何适当的盐。典型地,在含水电泳缓冲液中存在的两性电解质的量会在约 10mM 至约 100mM、约 15mM 至约 75mM、约 25mM 至约 50mM 或者约 40mM 至约 45mM 的范围内。任选地,所述电泳缓冲液可以包括附加的缓冲剂,例如 tris, 除 SDS 和 EDTA 之外。非常适合与目前公开的实施方案一起使用的电泳缓冲液的示例性但非限制的例子可以包括 25-100mM MES、25-100mM Tris、约 0.05 至约 0.5% SDS 以及 0.5mM 至约 2mMEDTA。

[0088] 这种凝胶和缓冲剂系统也具有所述凝胶基质和储备溶液的改善的稳定性。可以将根据这种系统制备的凝胶在制冷下贮藏超过一年,而不会由于丙烯酰胺水解而损失性能。同样,可以将没有聚合引发剂的储备缓冲剂和储备凝胶溶液在室温下贮藏至少几个星期,而不损失性能。

[0089] 在这种凝胶配制品的一个实施方案中,电泳凝胶可以均匀地充满包括伯有机胺或取代的胺具有接近中性的 pKa 的凝胶缓冲溶液、以及亚摩尔(submolar)量的如以上所描述的酸或两性电解质缓冲剂,这样所述缓冲剂的 pH 在约 pH 6 与 pH 8 之间、优选地在约 pH 6.5 至 pH7.5 之间、且最优选地 6.5 至 7.0。所述电泳凝胶可以是任何琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶或者含有琼脂糖和聚丙烯酰胺的复合凝胶。优选地,所述电泳凝胶包括使用约 1% 至约 6% 的交联剂(% C)聚合的在 3% 与 25% (% T) 之间的丙烯酰胺。更优选地,使用约 2% 至约 5% 的交联剂(% C)使这种聚丙烯酰胺凝胶聚合。优选地,所述胺包括 Bis-Tris 或 N-(2-羟乙基)吗啉,且最优选地, Bis-Tris。适当的酸和两性离子化合物是 Tricine、

Bicine、N-(2-乙酰氨基)-2-氨基乙磺酸、2-(N-吗啉代)-2-羟基丙磺酸、N-三-(羟甲基)-2-乙磺酸、N-2-羟乙基-哌嗪-N-2-乙磺酸、N,N-双-(羟乙基)-2-氨基乙磺酸、和 3-(N-三-(羟甲基)甲氨基)-2-羟基丙磺酸。

[0090] 在凝胶和缓冲剂系统中,当由于所述聚丙烯酰胺基质的水解所述凝胶的性能下降时,电流增加,且迁移速率下降。以大浓度存在的中性物质的任何分解,其产生带电的种,将趋向于使所述电泳中断。这种中断由产生的额外电流而产生,其反过来增加焦耳腐蚀而没有帮助分离。另外,不连续性由在所述凝胶中形成的在阴极缓冲剂和阳极缓冲剂中不存在的阴离子水解产物和阳离子水解产物产生。凝胶缓冲剂种或添加剂的水解与所述凝胶基质组合物独立地发生。迁移速率的下降可能归因于由所述凝胶的聚丙烯酰胺的碱催化水解引起的在所述凝胶中的较高的固定电荷。所述固定电荷导致水的显著逆流,其可以使大分子的迁移速率减速。已经发现的是,用接近中性的缓冲凝胶和用具有接近中性的 pKa 的缓冲物质可以解决产生较低的分辨率、增加的电流、下降的迁移速率的凝胶不稳定的问题。这样的缓冲系统改善了新鲜或预浇注的聚丙烯酰胺凝胶、以及含有碱不稳定的材料(例如尿素或甲酰胺)的新鲜或预浇注的凝胶的性能,甚至当用碱稳定的聚合物制备所述凝胶时。

[0091] 不受任何一种特殊理论或作用机理约束,已经确定的是,在所述凝胶中与在所述阳极缓冲剂和阴极缓冲剂中使用不同的缓冲物质是有利的。在一些实施方案中,用于所述凝胶或所述阴极缓冲剂的阴离子物质不需要在所述阳极缓冲剂中存在,因为阴离子不从所述阳极缓冲剂中迁移出。

[0092] 这些缓冲系统提供以下益处:在贮藏和运行期间的中性 pH 凝胶、最少的成本、以及最快的运行时间。

[0093] 用于制备所述主题不连续电泳凝胶的多种方法对于本领域技术人员来说是已知的,且可以使用任何这样的方法来没有限制地制备电泳凝胶。以下描述的是本领域技术人员可以用于制备不连续电泳凝胶的一个示例性的方法。然而,容易理解的是,在不偏离本实施方案的精神和范围的情况下同样可以使用制备不连续电泳凝胶的其它方法。

[0094] 在一个实施方案中,可以制备丙烯酰胺和双丙烯酰胺的含水储备溶液。任选地,可以制备丙烯酰胺和双丙烯酰胺的单个储备溶液。另外,可以制备蔗糖、凝胶胺、凝胶两性电解质和含有酸的氯化物的单独含水储备溶液。任选地,可以制备 SDS 和还原剂的单独储备溶液。最后,制备过硫酸铵(APS;典型地 10 重量%) 和四甲基乙二胺(TEMED;典型地在 4 重量%至 10%之间)的储备溶液。可以合并适量的各种储备溶液,这样最终的组合物具有每个单独组分(除 APS 和 TEMED 之外)的所需的浓度,且用适当的稀释剂(例如,水)调节所述体积,这样每个组分的正确浓度是存在的。这时,添加 APS 和 TEMED,以便引发丙烯酰胺和双丙烯酰胺的聚合。然后,可以将所述混合物浇注在玻璃板或塑料板之间。可以将所述板彼此间隔开,这样在所述凝胶被浇注的板之间的空间相距在 2mm 至 0.5mm 之间。另外,将在所述板之间的空间在至少三个侧面密封。任选地,可以将丁醇或含水缓冲剂薄层涂在所述聚合的凝胶的表面上,以降低所述聚合的凝胶组合物的表面张力且保证所述聚合的凝胶的上边缘是大体直的。在将所述聚合的凝胶组合物浇注在所述板之间之后,使所述凝胶组合物静止适量时间,以实现所述丙烯酰胺和双丙烯酰胺单体的大体完全聚合。

[0095] 在一些实施方案中,可以将成层胶溶液单独制备且浇注在所述聚合的分离胶上。完全聚合的电泳凝胶的 S : R 比将典型地是约 1 : 4 或约 1.9 : 7.5,虽然也可以使用如以

上描述和以下例证的各种其它 S : R 比。在已经浇注所述成层胶之后,但是在进行完成的聚合反应之前,可以将一个或多个梳插入所述含水聚合的成层胶组合物中,在两个玻璃梳或两个塑料梳之间,由此限定多个孔,在使用之前可以立即将所述样品加入所述多个孔中。可选地,在不使用成层胶的实施方案中,可以将所述梳插入以上描述的聚合的含水分分离胶混合物中。典型地,但非必须地,可以将所述梳保持在合适的位置,直到所述电泳凝胶准备使用,在那时之后移开所述梳且将所述样品装载到由所述聚合的聚丙烯酰胺凝胶基质限定的孔中。

[0096] 在一些实施方案中,聚丙烯酰胺的百分率可以通过电泳凝胶的长度变化。多种这样的梯度胶是本领域公知的,其中的任何一种均可以适合与目前描述的配制品一起使用。梯度胶可以是约 2% 至约 30% 的聚丙烯酰胺、约 3% 至约 27% 的聚丙烯酰胺、约 4% 至约 20% 的聚丙烯酰胺、或者约 5% 至约 15% 的聚丙烯酰胺。在一些实施方案中,梯度胶可以是约 3% 至约 12% 的聚丙烯酰胺、约 3% 至约 20% 的聚丙烯酰胺、约 3% 至约 15% 的聚丙烯酰胺、约 4% 至约 12% 的聚丙烯酰胺、约 4% 至约 20% 的聚丙烯酰胺、或者约 4% 至约 15% 的聚丙烯酰胺。适合用于制备梯度聚丙烯酰胺凝胶的任何方法均可以用于无限制地制备具有所述主题配制品的梯度胶。这样的方法对于本实施方案所属的领域的技术人员来说是公知的。这样的方法公开于,例如,美国专利 No. 6, 488, 880 ;6, 267, 579 ;4, 594, 064 ;和 5, 071, 531。在一个实施方案中,梯度胶可以任选地包括根据以上讨论和在此结合的方法浇注的成层胶。

[0097] 在一些实施方案中,在所述凝胶聚合之后,可以将所述电泳凝胶系统和组合物包装在气密包装或防水包装中。所述气密包装或防水包装可以特别适于通过浇注的凝胶保湿性最大化且适于防止所述凝胶的脱水,其可以不利地影响其性能。在一个实施方案中,可以将每种凝胶单独地包装在气密包装或防水包装中且作为套件的一部分提供给客户。在一个实施方案中,套件可以包括多种这样单独包装的电泳凝胶。在一个实施方案中,套件可以包括 2-100 种单独包装的电泳凝胶、5-75 种单独包装的电泳凝胶、10-50 种单独包装的电泳凝胶、15-35 种单独包装的电泳凝胶、或者 20-25 种单独包装的电泳凝胶。可以将凝胶组自己包装在适当的容器中,所述容器被运送到最终用户且适合将所述单独包装的凝胶贮藏在适当的环境中。根据目前描述的配制品和方法制备的电泳凝胶在约 1°C 至约 25°C 或者约 4°C 至约 22°C 的温度范围下稳定贮藏多达 6 个月、多达 5 个月、多达 4 个月、多达 3 个月、多达 2 个月或者多达 1 个月。在一些实施方案中,任选地,可以将含有多种单独包装的电泳凝胶的套件与一种或多种适当的含水电泳缓冲液结合提供给客户。可以直接使用的浓度提供所述含水电泳缓冲液,或者可以可选地以使用者可以根据需要稀释的浓度形式提供所述含水电泳缓冲液。可以,例如,以 20X 储备溶液、15X 储备溶液、10X 储备溶液、5X 储备溶液或者 2X 储备溶液提供所述含水电泳缓冲液。

[0098] 在一个实施方案中,可以将电泳分离凝胶装配成适当的槽系统,所述槽系统有助于沿着所述凝胶的长度施加电场。将这样的槽系统配置为保证所述含水电泳缓冲液与所述凝胶相互作用且使所述电压被沿着所述凝胶的整个纵轴相等地施加,如以上详细公开和在此结合的。

[0099] 包括以下实施例,以说明本发明的一些优选实施方案。本领域技术人员应该理解的是,跟随的实施例中公开的技术代表在本发明的实施中非常起作用的由发明人发现的技

术,且因此可以被认为构成用于其实施的优选模式。然而,根据本发明,本领域技术人员应该理解可以对公开的特定实施方案进行一种或多种变化且在不偏离在此陈述的实施方案的精神和范围的情况下仍然得到同样或类似的结果。

实施例

[0100] 进行以下实验,以确定适合用于在此包括的快速电泳缓冲液配制品的各种组分的范围。特别地,估计凝胶缓冲剂组分和盐的各种组合。除非另外指出,具有以下限定的构成的分离聚丙烯酰胺凝胶是8%的聚丙烯酰胺和4.4%的双丙烯酰胺交联剂(8% T/4.4% C)。将具有4%的聚丙烯酰胺和3.8%的双丙烯酰胺交联剂(4% T/3.8% C)的成层胶手浇注在分离胶之上。除非另外说明,成层胶与分离胶的比(S : R)为约1 : 4,所述凝胶的厚度为约1mm,且将所述凝胶手浇注在小型凝胶盒中。

[0101] 用于测试以下描述的各种凝胶配制品的样品由以下的一种或多种组成:在指出的泳道中的Mark12™、SeeBlue Plus2®预染的标记物、Novex® Sharp 预染的、和大肠杆菌裂解物(所有都从Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA得到)。选择Mark12™,由于其在高负荷(10 μL)下的高盐浓度以及其作为用于使NuPAGE®凝胶合格的选择标准的历史用途。选择Novex® Sharp 预染的标准,以有助于与胰岛素、链B相应的3.5kDa带的视觉跟踪,这样可以容易地监测设施凝胶操作的完成。选择SeeBlue Plus2®,因为已知的是19-22kDa碱性玫瑰精-标记的肌红蛋白带可以随电压量变化。例如,当使SeeBlue Plus2®蛋白质标准在NuPAGE®凝胶上以涡轮模式(即,250V)运行时,所述肌红蛋白带以比如果使所述凝胶以正常模式(即,200V)运行的较低的表观分子量运行。选择大肠杆菌裂解物以观察复杂蛋白质样品的迁移。

[0102] 实施例 1

[0103] 检测的第一种试验凝胶配制品是具有以下构成的8%的SDS-PAGE分离胶:100mM Bis-Tris、75mM Tricine、4体积%蔗糖、和20mM BES。所述成层胶具有以下构成:357mM Bis-Tris和210mM氯化物,pH 6.5,浇注在所述分离胶之上。所述凝胶的S : R比是1 : 4。

[0104] 将五(5) μL的具有Ponceau S示踪染料的Mark12™蛋白质标记物装载在所述凝胶的每个泳道,且将所述凝胶在300V下在NuPAGE® MES SDS电泳缓冲液(Invitrogen Corp., Carlsbad, CA)中运行15分钟。基于单独地加入每个样品的Ponceau S示踪染料向所述凝胶的底部的迁移而确定所述凝胶操作的完成。在所述操作完成时,将所述凝胶用使用SimplyBlue™ SafeStain(来自Invitrogen Corp, Carlsbad, CA)的Coomassie® G-250染色。

[0105] 图1示出了由这种凝胶配制品产生的标记物带的迁移图案。3.5kDa胰岛素B带(在图1中标明的)仅仅迁移所述凝胶的长度的大约2/3。这表明(Ponceau S)示踪染料比较低分子量的蛋白质迁移得快。另外,比55.4kDa谷氨酸脱氢酶带(在图1中标明的)迁移得快的带显得比那些比55.4kDa带迁移得慢的带分散,且6kDa抑肽酶带和3.5kDa胰岛素B带的外边缘向所述凝胶的底部弯曲。因此,虽然改善了15分钟的凝胶运行时间,使用这种凝胶配制品的带的分辨率不是最佳的。

[0106] 实施例 2

[0107] 基本上同实施例 1 中描述的一样浇注 SDS-PAGE 试验凝胶,除了将 S : R 比变化到 41 : 59 试图提高比 55.4kDa 谷氨酸脱氢酶带迁移得快的带的堆叠和分离之外。将五 (5) μ L 的 Mark12™ 蛋白质标记物装载在所述凝胶的每个泳道,且将所述凝胶在 300V 下在 MES SDS 电泳缓冲液中运行 16 分钟。基于 Ponceau S 示踪染料向所述凝胶的底部的迁移而确定所述凝胶操作的完成,且将所述凝胶用同以上一样的 SimplyBlue™ SafeStain 染色。

[0108] 产生的凝胶 (图 2) 示出了由这种凝胶配制品产生的标记物带的迁移图案。3.5kDa 胰岛素 B 带迁移所述凝胶的整个长度,虽然需要附加的 1min 运行时间。在最外面泳道 (即,泳道 1、2、9 和 10 ;由星号标明的) 中的 200kDa 肌球蛋白带比在泳道 3-8 中看到的相应带分散。另外,比 55.4kDa 谷氨酸脱氢酶带 (在图 2 中标明的) 迁移得快的带比那些比 55.4kDa 带迁移得慢的带分散,且 6kDa 抑肽酶带和 3.5kDa 胰岛素 B 带的外边缘向所述凝胶的底部弯曲。

[0109] 实施例 3

[0110] 基本上同实施例 2 中描述的一样浇注 SDS-PAGE 试验凝胶,有以下变化:使用 100mM Bis-Tris 和 100mM Tricine 制备 8% (8% T/4.4% C) 分离胶。浇注在所述分离胶上的 4% (4% T/3.8% C) 成层胶具有 6.1 的 pH 且使用 357mM Bis-Tris 和 150mM 硫酸制备。在这个实施例中,使用硫酸,以提供比 Cl 迁移得慢的前导离子 (SO_4^{2-})。所述凝胶的 S : R 比是 41 : 59。将五 (5) μ L 的 Mark12™ 蛋白质标记物装载在所述凝胶的每个泳道,且将所述凝胶在 300V 下在 MES SDS 电泳缓冲液中运行 18 分钟。基于 Ponceau S 示踪染料向所述凝胶的底部的迁移而确定所述凝胶操作的完成,在那之后将所述凝胶用同以上一样的 SimplyBlue™ SafeStain 染色。

[0111] 图 3 示出了由这种凝胶配制品产生的标记物带的迁移图案。如示出的,在所述成层胶中使用硫酸产生了令人不满意的结果且似乎压过所述 MES 缓冲剂的缓冲能力和分辨率。

[0112] 实施例 4

[0113] 基本上同实施例 2 中描述的一样浇注两份相同的 8% SDS-PAGE 分离胶,除了将每份凝胶中的 Bis-Tris 的量减少到 178mM,将氯化物减少到 105mM,且不存在 Tricine 之外。将包括 178mM Bis-Tris、105mM 氯化物 (具有 pH 6.5) 的 4% 成层胶浇注在每份分离胶之上。所述凝胶的 S : R 比是 1 : 3。

[0114] 将五 (5) μ L Mark12™ 蛋白质标记物装载在每份凝胶的泳道 1-3、5、7、9 和 10,将 5 μ l SeeBlue Plus2® 预染的蛋白质标准装载在泳道 4,将 10 μ g 大肠杆菌裂解物装载在泳道 6,且将 5 μ l Novex® Sharp 预染的蛋白质标准装载在泳道 8。将所述凝胶中的一份 (图 4A 所示) 在 MES SDS 电泳缓冲液中在 300V 下运行 13 分钟,且将第二份凝胶 (图 4B 所示) 在 MES 电泳缓冲液中在 350V 下运行 10 分钟。通过看到在泳道 8 中的预染的 3.5kDa 带的迁移确定凝胶操作的完成。将所述凝胶用同以上一样的 SimplyBlue™ SafeStain 染色。

[0115] 在图 4A 和 4B 中看到的 3.5kDa 胰岛素 B 带显示出比在图 1-3 中描述的凝胶更好的迁移特性,虽然所述带比在泳道 4 和 8 的带宽。总之,对于图 4B 所示的在 350V 下运行的凝胶,与较低分子量相应的带比图 4A 所示的在 300V 下运行的凝胶的相应带宽。另外,在 350V 下运行的凝胶 (图 4B) 中的在 66-6kDa 范围内的带看到一些带分裂。

[0116] 实施例 5

[0117] 基本上同实施例 1 中描述的一样浇注 8% SDS-PAGE 分离胶,除了将 Bis-Tris 的浓度增加到 228mM,将氯化物的浓度调整到 140mM,将 Tricine 的浓度降低到 50mM,除去 BES,且所述分离胶的 pH 为 6.5 之外。将包括 228mM Bis-Tris、140mM Cl⁻、50mM Tricine、以及 0 重量%蔗糖的 4%成层胶浇注在所述分离胶之上。将五 (5) μ L Mark12TM蛋白质标记物装载在泳道 1、2、5-7、9 和 10,将 5 μ l SeeBlue Plus2[®]预染的蛋白质标准装载在泳道 3,将 10 μ g 大肠杆菌裂解物装载在泳道 4,且将 5 μ l Novex[®] Sharp 预染的蛋白质标准装载在泳道 8。将所述凝胶在 MES SDS 电泳缓冲液中在 300V 下运行 13 分钟。通过看到在泳道 8 中的预染的 3.5kDa 带的迁移确定凝胶操作的完成。将图 5 所示的凝胶用同以上一样的 SimplyBlueTM SafeStain 染色。通过添加 50 至 100mM Tricine 以及 120-160mM 氯化物降低了低分子量带的加宽,且改善了带清晰度。

[0118] 实施例 6

[0119] 图 6 说明了在商业上可买到的 SDS-PAGE 凝胶配制品 (NuPAGE[®] Novex 8% Bis-Tris Midi 凝胶;图 6A、6C 和 6E) 与实施例 5 中描述的试验凝胶配制品的电泳特性的差异;实施例 5 中描述的试验凝胶配制品即,具有 228mM Bis-Tris、140mM 氯化物以及 50mM Tricine 与 4%蔗糖的 8% SDS-PAGE 分离胶,以及具有相同的缓冲剂构成而没有蔗糖的 4%成层胶,其中 S : R 比为 1.9 : 5.6 (图 6B、6D 和 6F 所示的试验凝胶)。将以下样品制备且装载在所述凝胶中的每种:泳道 1、2、5、6、9 和 10 含有 5 μ l Mark12TM蛋白质标记物,泳道 7 含有 10 μ l Mark12TM蛋白质标记物,泳道 3 含有 5 μ l SeeBlue Plus2[®]预染的蛋白质标准,泳道 4 含有 10 μ g 大肠杆菌萃取液,且泳道 8 含有 5 μ l Novex[®] Sharp 预染的蛋白质标准。将 NuPAGE[®] Novex 8% Bis-Tris 凝胶和所述试验凝胶配制品在 MES SDS 电泳缓冲液中分别在 200V 下运行 32 分钟和 29 分钟 (图 6A 和 6B);分别在 250V 下运行 20 分钟和 19 分钟 (图 6C 和 6D);且分别在 300V 下运行 16 分钟和 13 分钟 (图 6E 和 6F)。在凝胶操作完成之后,将所述凝胶用如以上所描述的 SimplyBlueTM SafeStain 染色。

[0120] 在 250V 和 300V (图 6C-6F) 下,对于所述试验凝胶配制品 (图 6D 和 6F),较低分子量的胰岛素 B 带 (由箭头标明的) 显示出比在 NuPAGE[®] Novex 8% Bis-Tris (图 6C 和 6E) 中较尖锐的分辨率和较短的运行时间。另外,在所有测试的电压下,在所述试验凝胶配制品 (图 6B、6D 和 6F,泳道 3,加框的区域),SeeBlue Plus2[®]预染的蛋白质标准的 14 和 17kDa 带显示出比在 NuPAGE[®] Novex 8% Bis-Tris (图 6A、6C 和 6E,泳道 3,加框的区域) 更好的分辨率和分离。

[0121] 实施例 7

[0122] 对于以下实验,基本上同实施例 5 和 6 中描述的一样浇注试验 SDS-PAGE 凝胶,除了以下指明的之外。对于每组实验条件,浇注总计 7 份试验 SDS-PAGE 凝胶。将上述试验 SDS-PAGE 凝胶在 300V 下运行指出的时间。在每次试验中,对于指出的条件 (200V 或 250V) 中的每个,测试两份 (2) NuPAGE[®] Novex 凝胶。将所有凝胶都在 MES SDS 电泳缓冲液中且在指出的电压下运行指出量的时间。在操作结束时,将每份凝胶用 SimplyBlueTM SafeStain 染色且成像。使用 TOTALLABTM软件 (Nonlinear Dynamics Ltd, Durham, NC) 确定每个带的清晰度。通过测量每个带的面积且通过每个孔的宽度 (孔宽度保持恒定为 10 孔 / 凝胶) 划分所述面积而确定带清晰度。使用 TOTALLABTM软件和 QC 软件确定每个带的迁移 (由其

R_f 值确定)。

[0123] 在图7中,将实施例6中描述的8% SDS-PAGE 试验凝胶浇注且与NuPAGE[®] Novex 8% Bis-Tris 配制品比较。图7A示出了在300V下在MES缓冲液中运行14分钟的试验 SDS-PAGE 凝胶的得到的代表性的图像,其中泳道1、2、4-7、9和10装载有5 μ l Mark12[™] 蛋白质标记物,泳道3装载有10 μ g 大肠杆菌裂解物,且泳道8装载有10 μ l Novex[®] Sharp 预染的蛋白质标准。图7B示出了在200V下在MES缓冲液中运行35分钟的20孔 NuPAGE[®] Novex 8% Bis-Tris 的代表性的图像,其中泳道1、3、8、10、11、13、18和19装载有5 μ l Mark12[™]蛋白质标记物,泳道5装载有10 μ g 大肠杆菌裂解物,且泳道16装载有10 μ l Novex[®] Sharp 预染的蛋白质标准。图7C示出了与图7B描述的相同的凝胶的代表性的图像,除了将所述凝胶在MES SDS 电泳缓冲液中在250V下运行22分钟之外。图7D是总结对于每个实验条件得到的Mark12[™]蛋白质标记物组的每个单独带的相对清晰度(通过像素面积测量)的条形图。在300V下运行的试验凝胶配制品以灰条示出,在200V下运行的NuPAGE[®] Novex 8% Bis-Tris 凝胶以黑条示出,且在250V下使用涡轮方案运行的 NuPAGE[®] Novex 8% Bis-Tris 以白条示出。x轴表示Mark12[™]蛋白质标记物带中的哪个正被分析,且y轴表示像素面积。图7E示出了对于每种凝胶配制品使用如指出的非线性动力学 TOTALLAB[™] v2003.02 软件或 QC 软件而得到平均 R_f 值。

[0124] 基本上如对于图7A-7E描述的得到图8A-8E示出的结果,除了以下之外。将图8A示出的试验凝胶中的聚丙烯酰胺浓度增加到10%,且将所述凝胶在MES缓冲液中在300V下运行16分钟。在图8B和8C中,使用10-孔NuPAGE[®] Novex 10% Bis-Tris 凝胶且泳道装载如下:泳道1、2、5-6、9和10含有5 μ l Mark12[™]蛋白质标记物,泳道3含有10 μ g 大肠杆菌裂解物,且泳道8含有10 μ l Novex[®] Sharp 预染的蛋白质标准。在图8B中,将所述凝胶在200V下在MES缓冲液中运行36分钟,且在图8C中,将所述凝胶在MES缓冲液中在250V下运行24分钟。如对于图7D和7E描述的进行图8D和8E示出的凝胶的分析。

[0125] 基本上如对于图8A-8E描述的得到图9A-9E示出的结果,除了以下之外。当4-12%聚丙烯酰胺梯度胶在MES缓冲液中在300V下运行17min时,浇注图9A所示的SDS-PAGE 试验凝胶。在图9B和9C中,使用12-孔NuPAGE[®] Novex 4-12% Bis-Tris 凝胶且如对于图8B和8C描述的装载泳道。在图9B中,将所述凝胶在200V下在MES缓冲液中运行37分钟,且在图9C中,将所述凝胶在MES缓冲液中在250V下运行25分钟。如对于图7D和7E描述的进行图9D和9E示出的凝胶的分析。

[0126] 实施例8

[0127] 对于图10所示的以下实验,基本上同实施例6至8中描述的一样浇注两份试验 SDS-PAGE 凝胶,除了将图10A所示的分离胶中的蔗糖浓度降低到2重量%,且将图10B所示的分离胶中的蔗糖浓度保持在4重量%之外。在图10A中,将所述凝胶在300V下运行15分钟。在图10B中,将所述凝胶在300V下运行26分钟,图10C示出了对于图10A和10B所示的凝胶得到的相对带清晰度。

[0128] 某些美国专利、美国专利申请、和其它材料(例如,论文)已经通过引用并入本专利中。然而,这样的美国专利、美国专利申请、和其它材料的文本仅仅通过引用并入到这样的文本与在此陈述的其它声明和附图之间不存在冲突的程度。如果这样的冲突发生,那么

在这样的通过引用并入的美国专利、美国专利申请、和其它材料中的任何这样的冲突文本特别地不通过引用并入本专利中。

[0129] 鉴于本说明书,本领域技术人员可以明白本发明的各个方面的进一步修改和替代实施方案。因此,本描述仅仅作为说明性理解且用于教导本领域技术人员实施本发明的一般方式。需要理解的是在此示出和描述的本发明的形式将作为目前优选的实施方案理解。元素和材料可以替代在此说明和描述的元素和材料,可以倒转部分和工艺,且可以单独地利用本发明的某些特征,所有这些都如本领域技术人员在阅读对本发明的描述之后会明白的。在不脱离在以下权利要求中描述的本发明的精神和范围的情况下,可以改变在此描述的元素。另外,需要理解的是在某些实施方案中,可以合并在此单独地描述的特征。

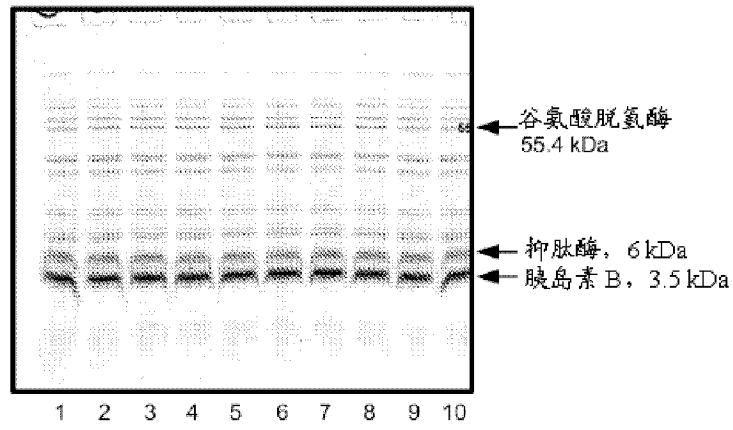


图 1

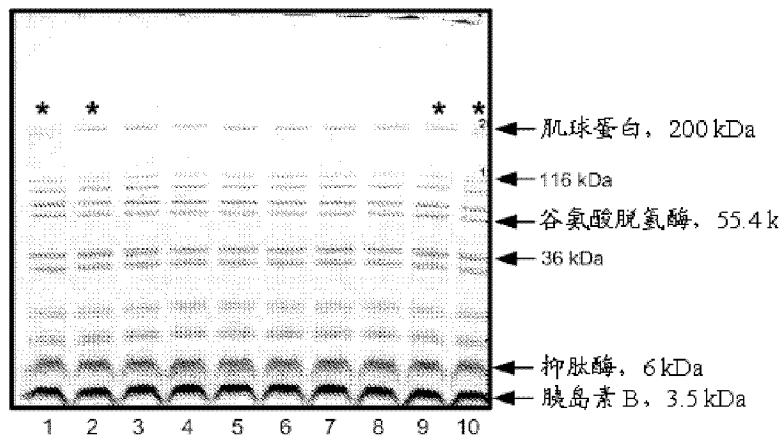


图 2

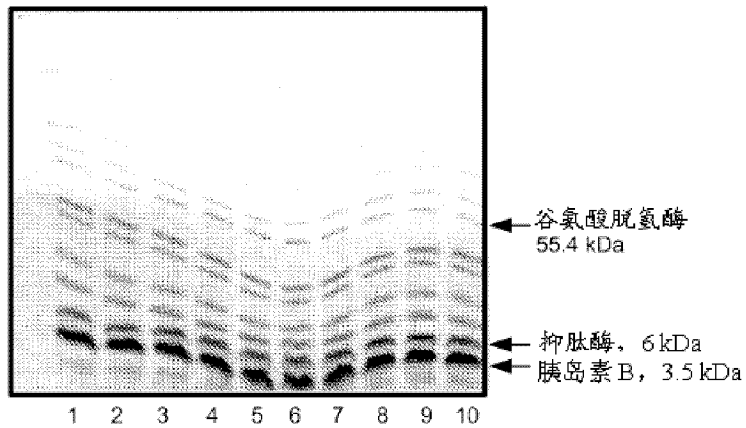


图 3

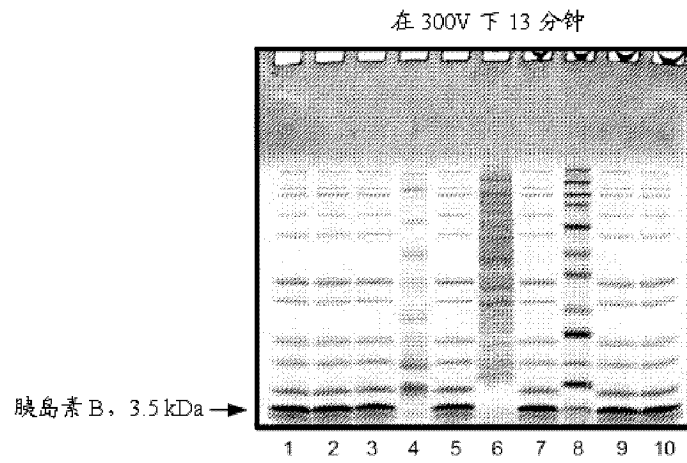


图 4A

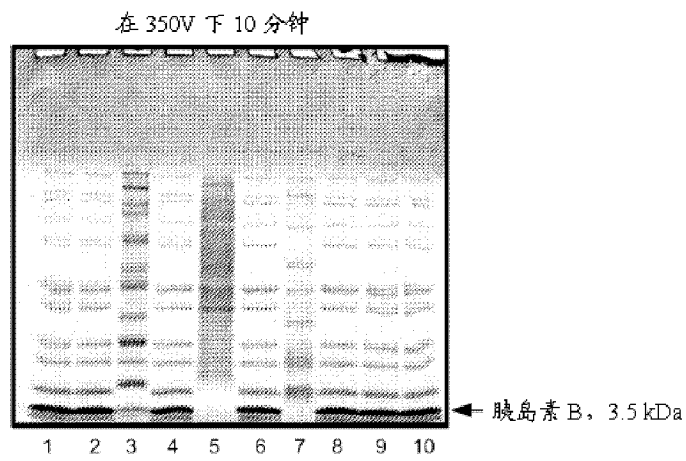


图 4B

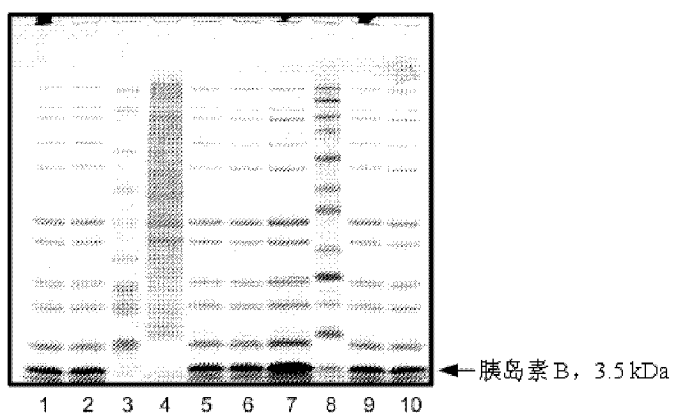


图 5

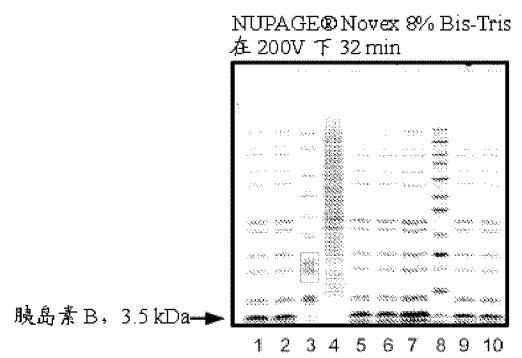


图 6A

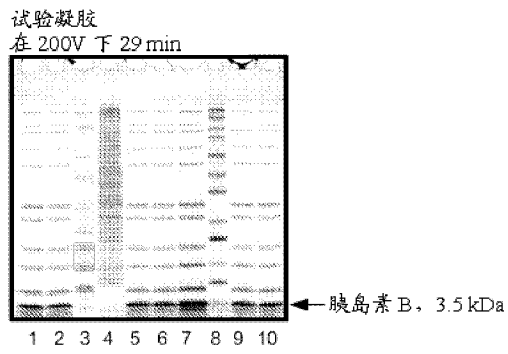


图 6B

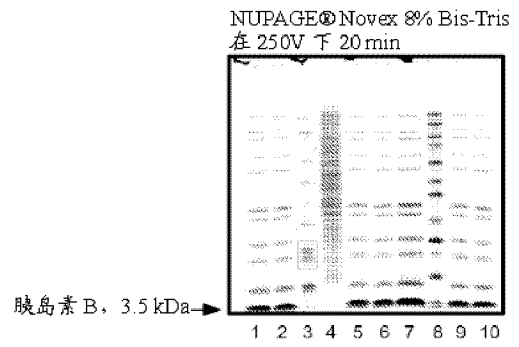


图 6C

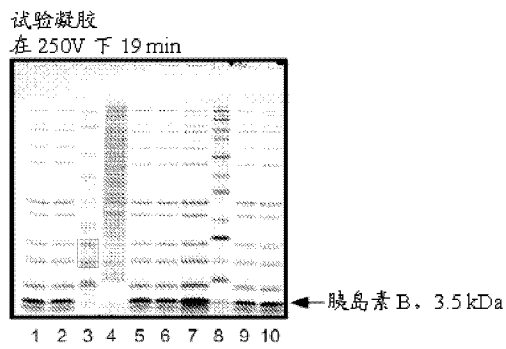


图 6D

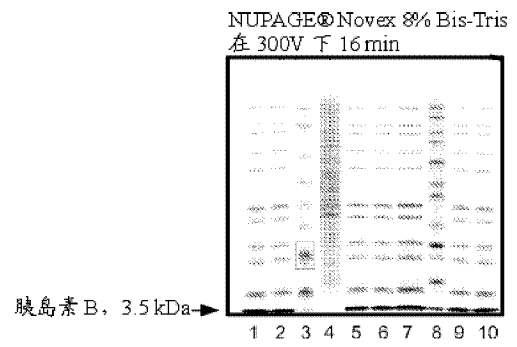


图 6E

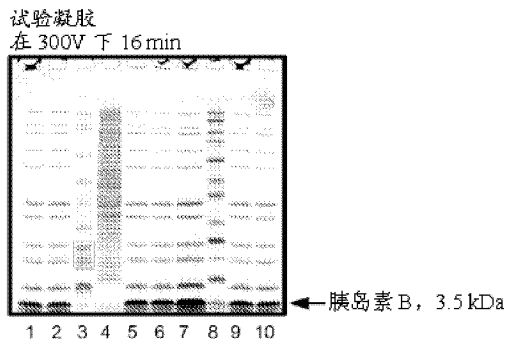


图 6F

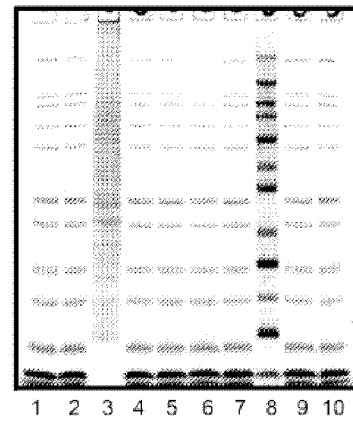


图 7A

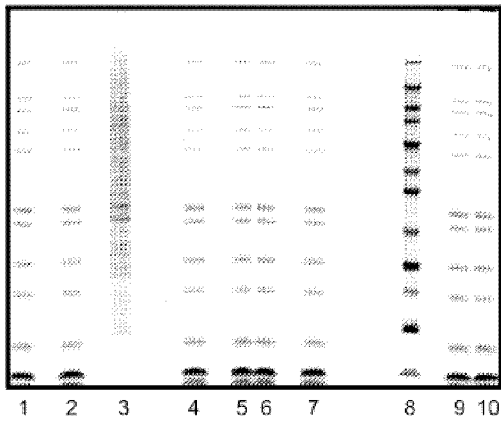


图 7B

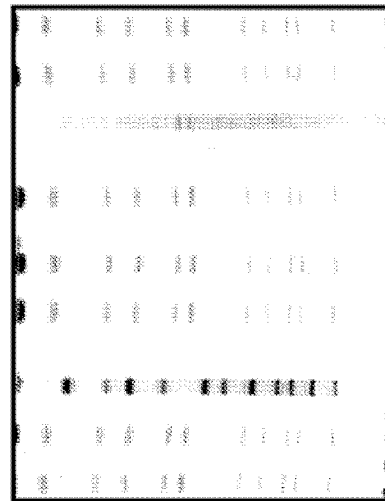


图 7C

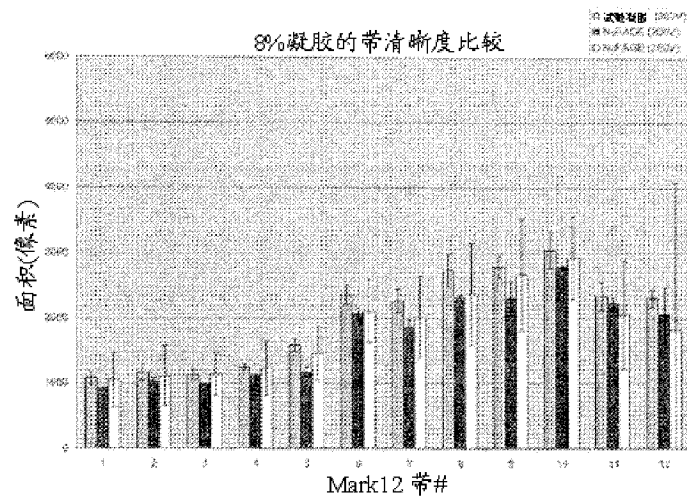


图 7D

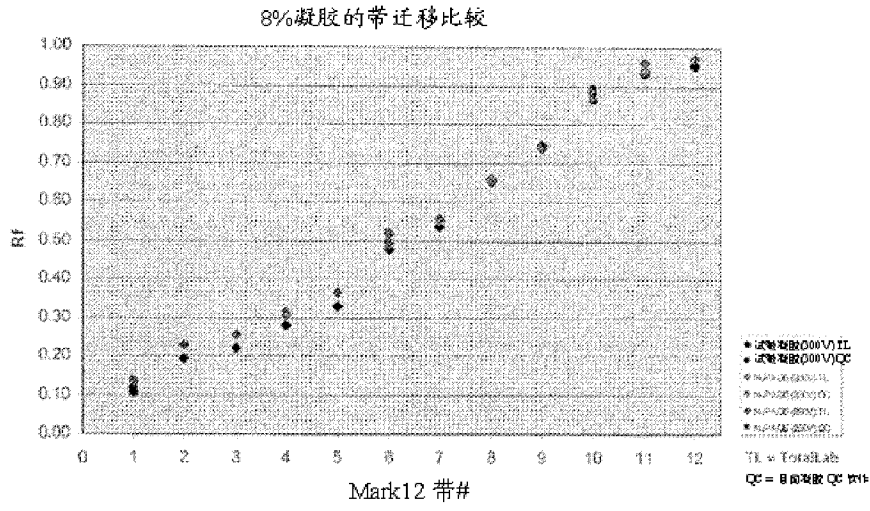


图 7E

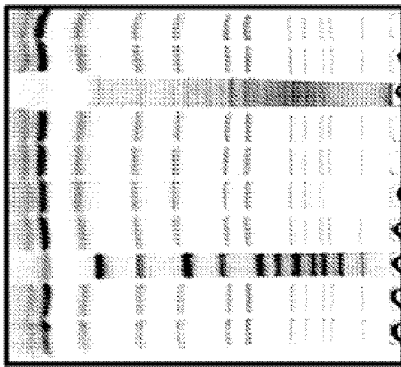


图 8A

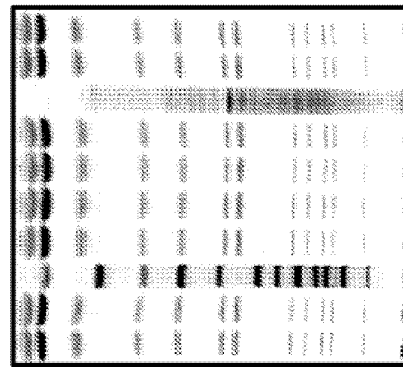


图 8B

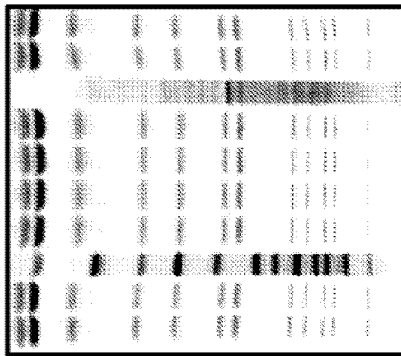


图 8C

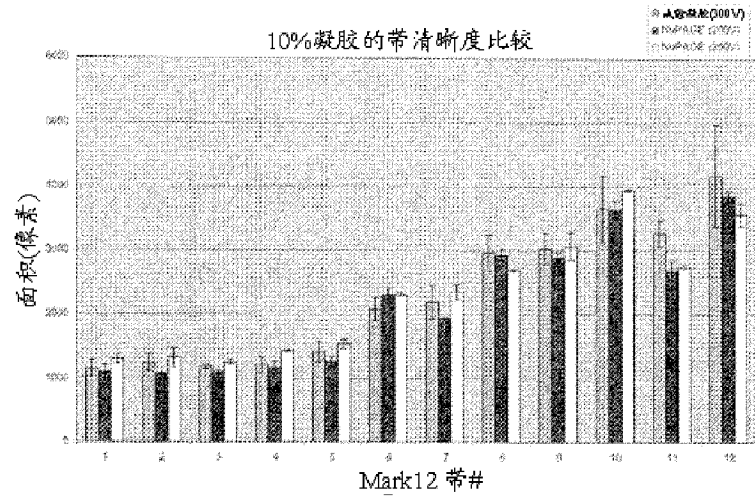


图 8D

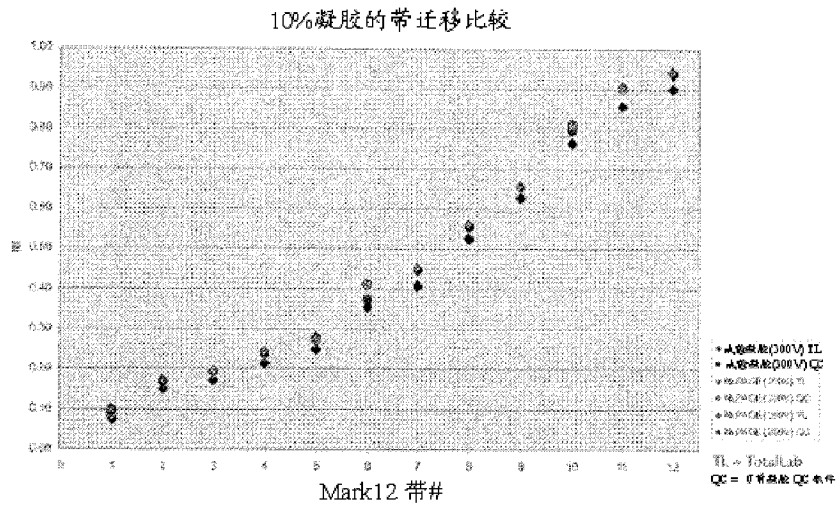


图 8E

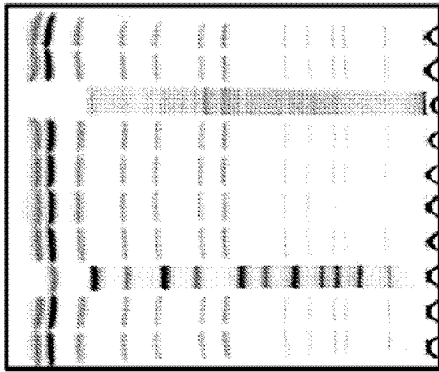


图 9A

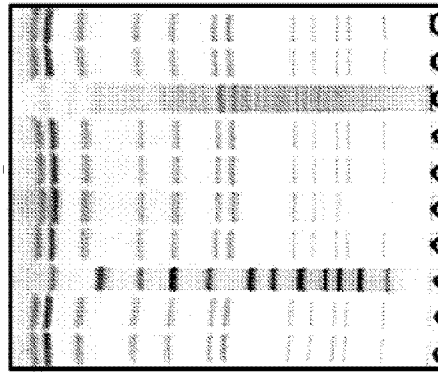


图 9B

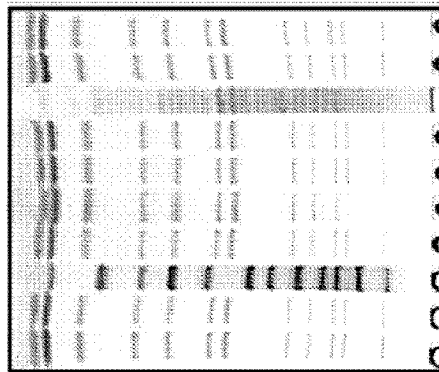


图 9C

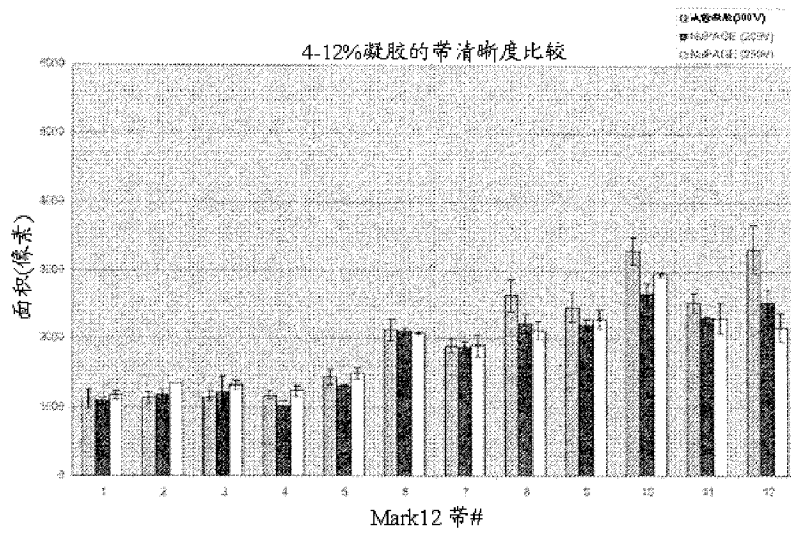


图 9D

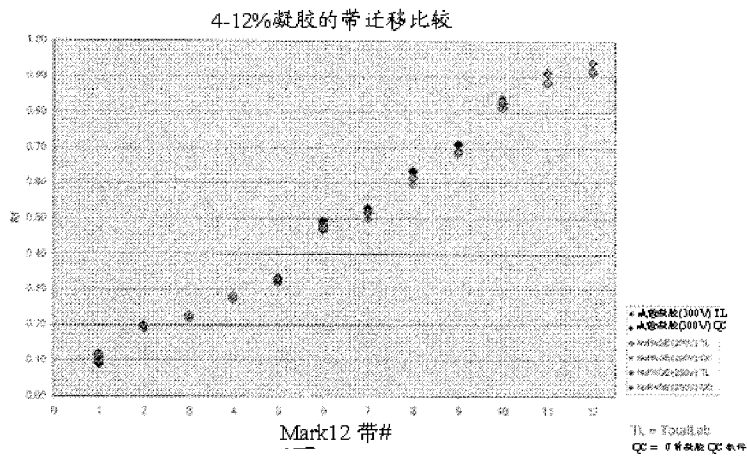


图 9E

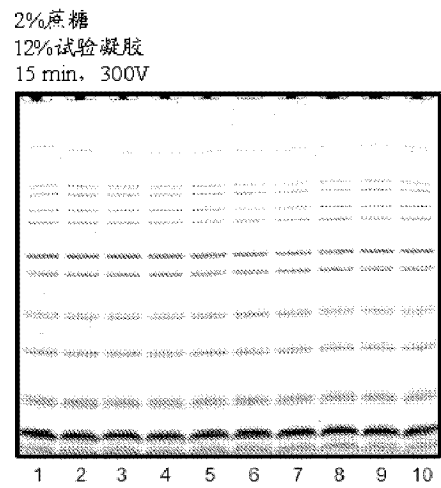


图 10A

4%蔗糖
12%试验凝胶
26 min. 300V

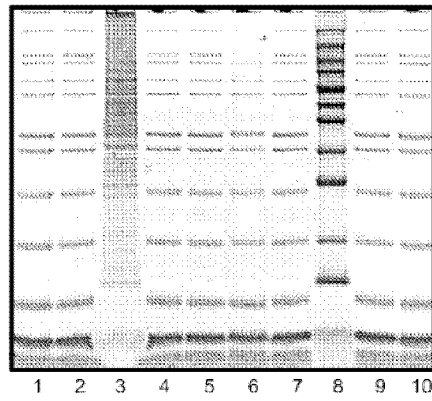


图 10B

蔗糖浓度对带清晰度的影响

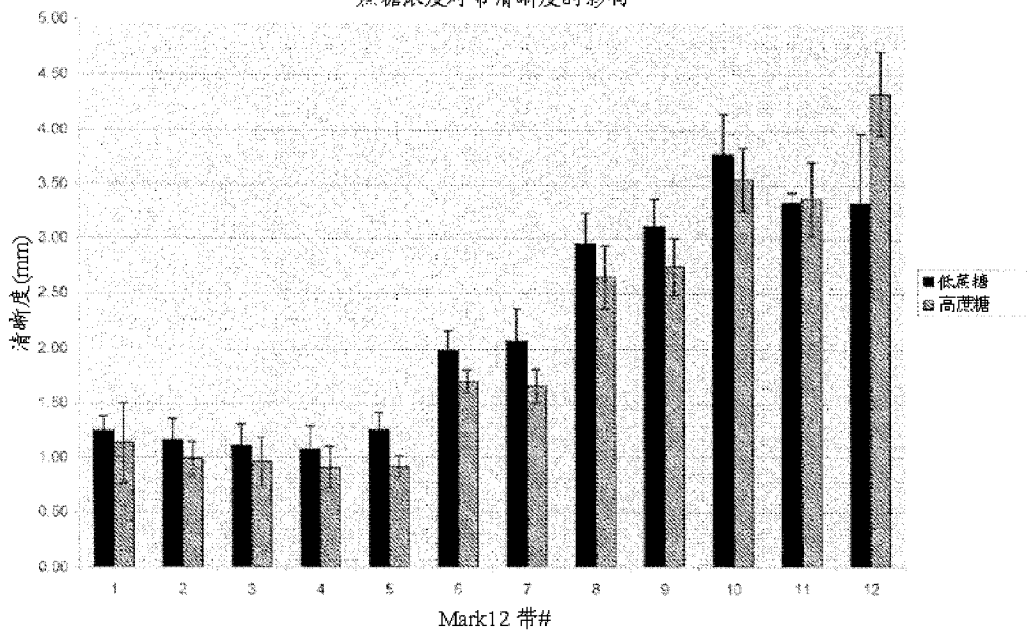


图 10C