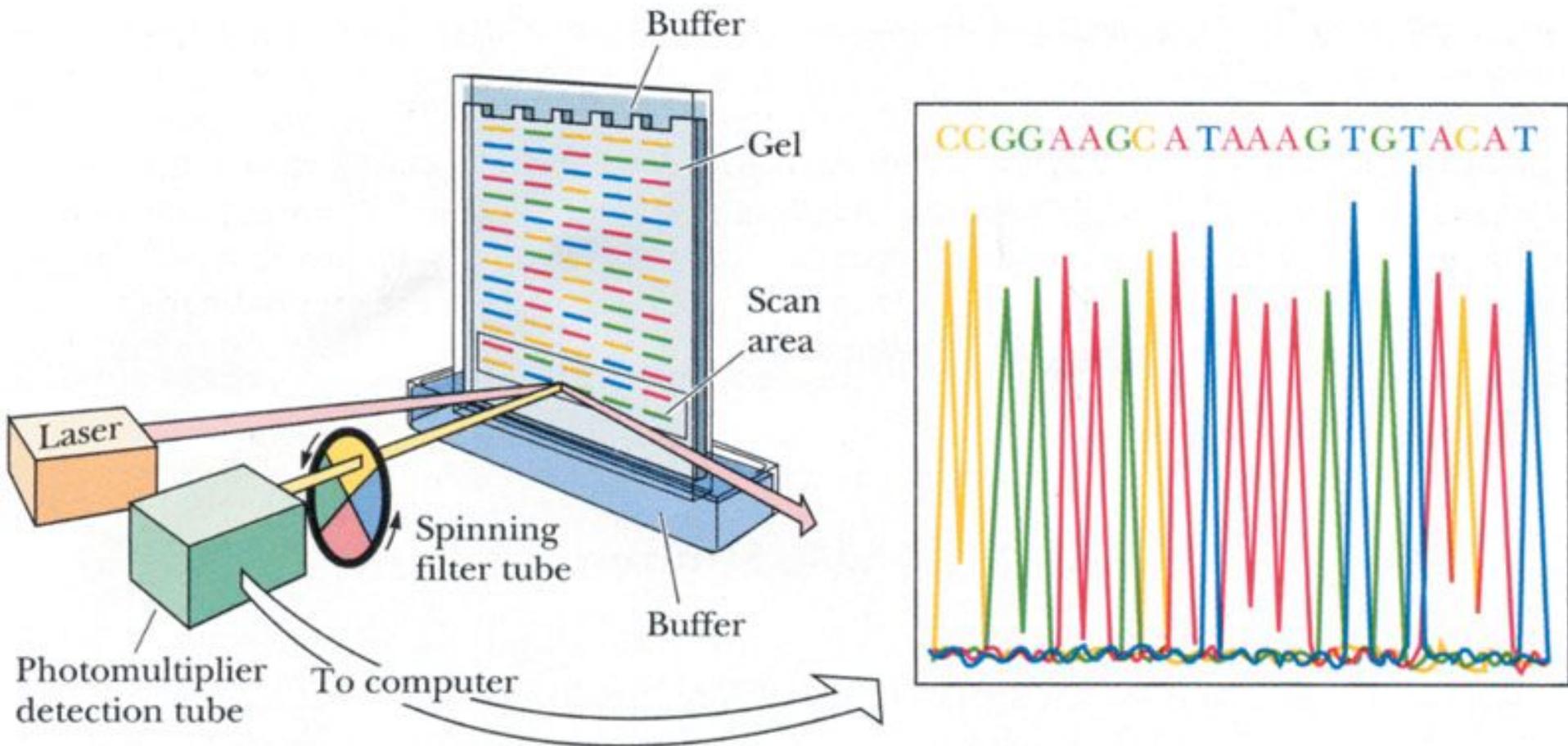


# 电泳技术



带电颗粒在电场作用下向着与其电性相反的电极移动，称为电泳(electrophoresis，简称EP)。1937年瑞典科学家Tiselius建立了“移界电泳法(moving boundary EP)”，成功地将血清蛋白质分成清蛋白、 $\alpha_1$ 、 $\alpha_2$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ 球蛋白5个主要成分，由于他的突出贡献，1948年荣获诺贝尔奖金。

50年代，许多科学家着手改进电泳仪，寻找合适的电泳支持介质，先后找到滤纸、醋酸纤维素薄膜、淀粉及琼脂作为支持物。60年代，Davis等科学家利用聚丙烯酰胺凝胶作为电泳支持物，在此基础上发展了SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、等电聚焦电泳、双向电泳和印迹转移电泳等技术。这些技术具有设备简单，操作方便，分辨率高等优点。

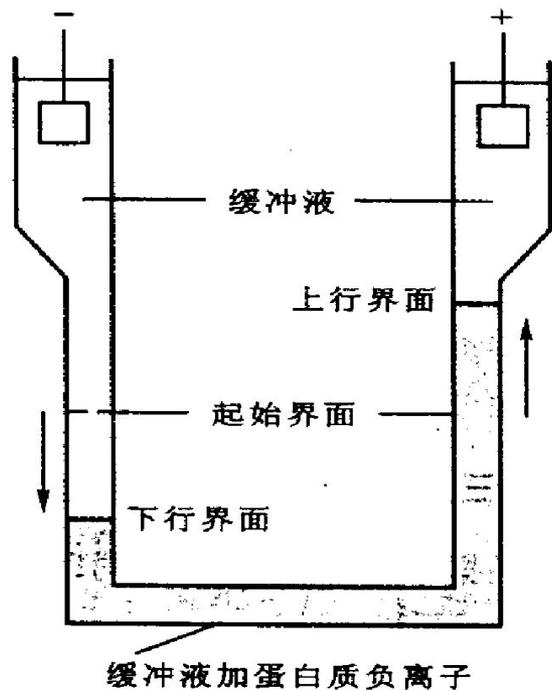


图 7-12 界面移动电泳的图解  
 选择适当 pH 的缓冲溶液使蛋白质带同种电荷;这里假设蛋白质为负离子

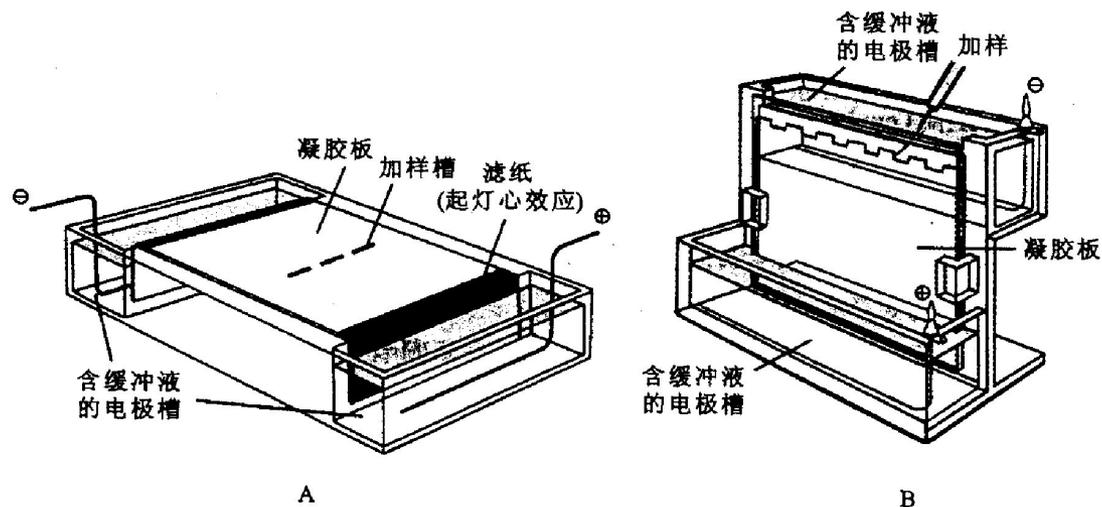
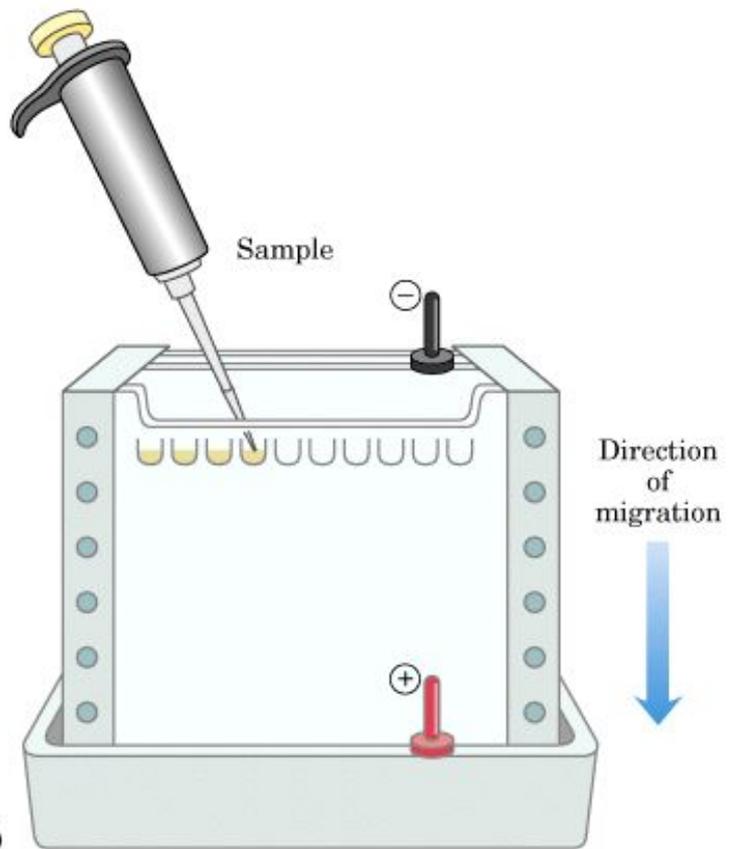
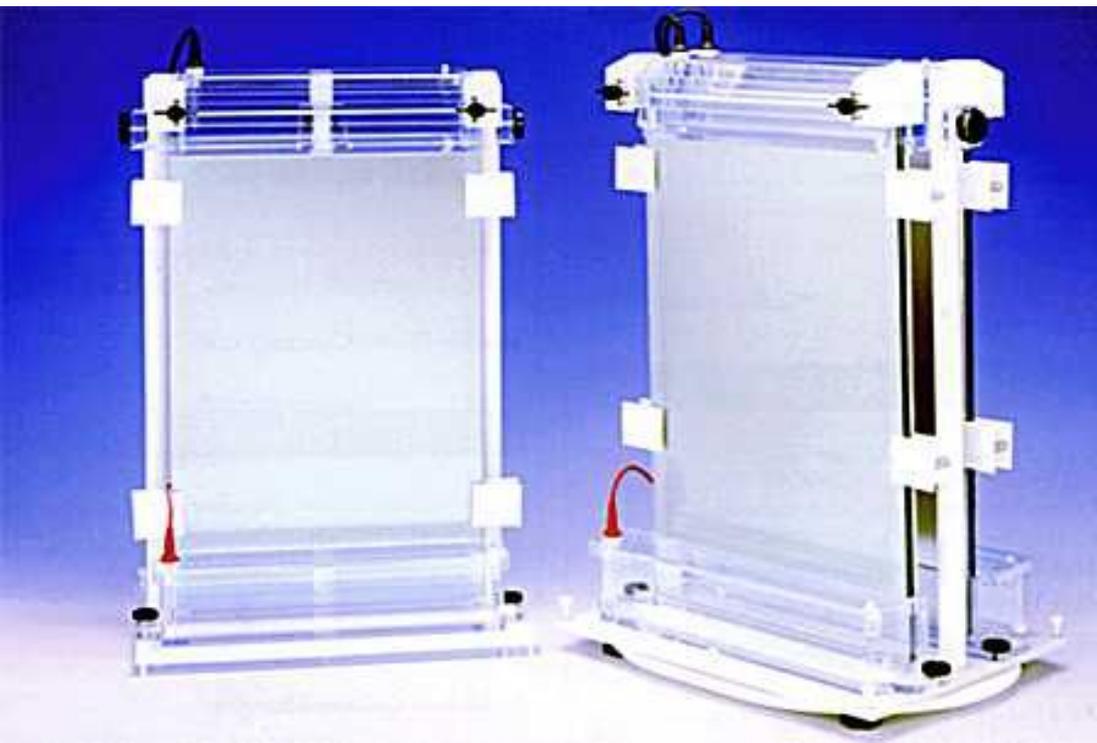
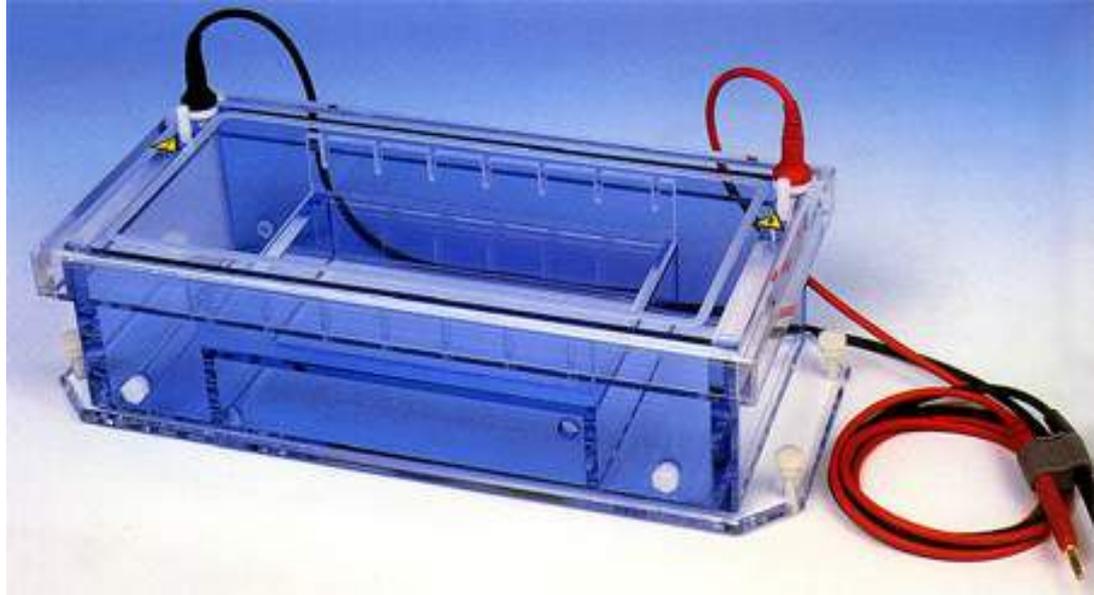


图 7-13 水平式(A)和垂直式(B)平板凝胶电泳图解



(a)

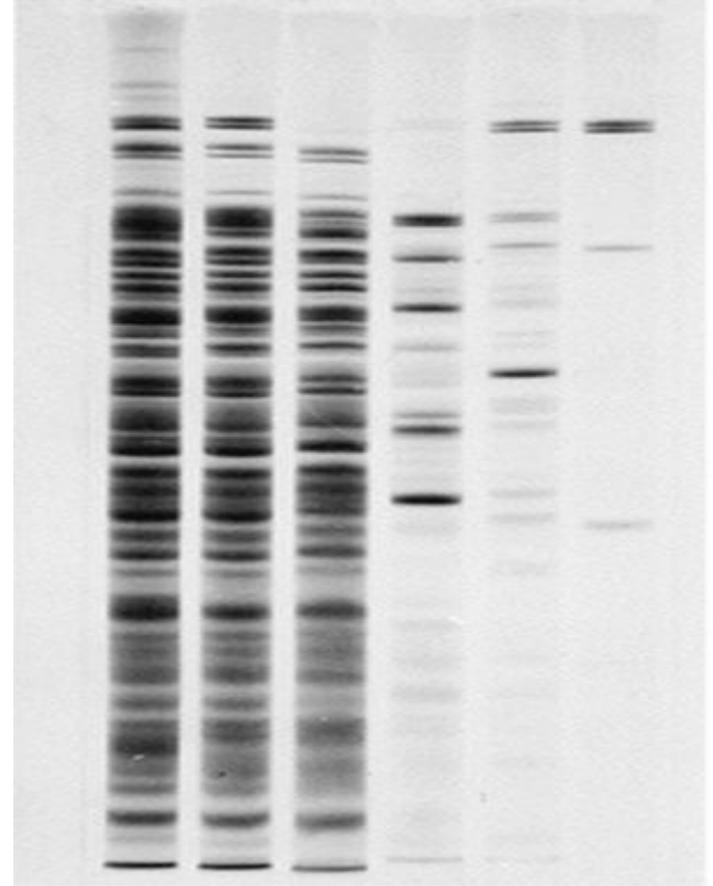




**SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳 SDS-PAGE**  
*(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)*

## 一、聚丙烯酰胺凝胶的特点

聚丙烯酰胺凝胶是由单体**丙烯酰胺**(acrylamide, 简称**Ac**)和交联剂**N,N'**-甲叉双**丙烯酰胺**(methylene-bisacrylamide, 简称**Bis**)在加速剂和催化剂的作用下聚合并交联成三维网状结构的凝胶, 以此凝胶为支持物的电泳称为聚丙烯酰胺凝胶电泳 (polyacrylamide gel electrophoresis, 简称**PAGE**)。



## 二、聚丙烯酰胺凝胶优点

- (1) 在一定浓度时，凝胶透明，有弹性，机械性能好；
- (2) 化学性能稳定，与被分离物不发生化学反应；
- (3) 对pH和温度变化较稳定；
- (4) 几乎无电渗作用，只要Acr纯度高，操作条件一致，则样品分离重复性好；
- (5) 样品不易扩散，且用量少；
- (6) 凝胶孔径可通过选择单体及交联剂的浓度调节；
- (7) 分辨率高，尤其在不连续凝胶电泳中，集浓缩、分子筛和电荷效应为一体，因而较醋酸纤维薄膜电泳、琼脂糖电泳等有更高的分辨率。

PAGE应用范围广，可用于蛋白质、酶、核酸等生物分子的分离、定性、定量及少量的制备，还可测定相对分子质量、等电点等。

### 三、凝胶聚合的原理及有关特性

#### 1. 聚合反应

凝胶的聚合常用过硫酸铵 (AP) 为催化剂，四甲基乙二胺 (TEMED) 为加速剂。TEMED的碱基可催化AP水溶液产生游离氧原子，激活Acr单体，使其聚合成单体长链，在Bis作用下，聚合成网状凝胶。碱性条件下凝胶易聚合，室温下7.5%的凝胶在pH8.8时约需30min聚合，在pH4.3时约需90min。

## 2. 影响聚合的因素

(1) **Acr及Bis的纯度**：应选用分析纯的Acr及Bis，两者均为白色结晶物质， $\lambda_{280}$ 无吸收。如试剂不纯，含有杂质或丙烯酸时，则凝胶聚合不均一，或聚合时间延长甚至不聚合，因而需进一步**纯化**。

Acr及Bis固体应避光，贮存在棕色瓶中，因自然光、超声波及 $\gamma$ 射线均可引起Acr自身聚合或形成亚胺桥而交联，造成试剂失效。Acr和Bis贮液的pH值为4.9-5.2，当pH值的改变大于0.4时则不能使用，因在偏酸或偏碱的环境中，它们可不断水解放出丙烯酸和 $\text{NH}_4^+$ 而引起pH值改变，从而影响凝胶聚合。因此，**配制的Acr和Bis贮液应置棕色瓶中，4℃贮存，存放期一般不超过1-2个月为宜。**

(2) AP、核黄素、TEMED：是凝胶聚合不可缺少的试剂，AP为白色粉末，核黄素为黄色粉末，应在干燥、避光的条件下保存，其水溶液应置棕色瓶中，4℃冰箱贮存，一般AP溶液仅能存放一周。TEMED为淡黄色油状液，原液应密闭贮于4℃冰箱中。增加AP和TEMED可加快聚合速率，但过量的AP和TEMED会引起电泳时烧胶和谱带变形。应选择合适的配方使聚合在40-60min内完成。

(3) pH：碱性条件下聚合较快，但碱性过强时胶硬而脆，需高pH时应减少AP和TEMED用量，制酸性胶可加AgNO<sub>3</sub>等促进聚合。

(4) 温度：温度高聚合快，但高浓度凝胶聚合时易产生小气泡，低温(5℃)聚合凝胶会变得脆而混浊，一般25-35℃聚合较好。

(5) 氧分子：氧分子阻碍凝胶聚合，故不含SDS的凝胶最好先抽真空脱气，再加引发剂。

## 四、SDS-PAGE原理

SDS即十二烷基硫酸钠是阴离子去污剂，在水溶液中，以单体和分子团的混合形式存在，单体和分子团的浓度与SDS总浓度、离子强度及温度有关。

为了使单体和蛋白质结合生成蛋白质-SDS复合物，需要采取低离子强度，使单体浓度有所升高。在单体浓度为0.5mmol/L以上时，蛋白质和SDS就能结合成复合物；当SDS单体浓度大于1mmol/L时，与大多数蛋白质平均结合比为1.4g SDS/g蛋白质；在低于0.5mmol/L浓度时，其结合比一般为0.4g SDS/g蛋白质。

由于SDS带有大量负电荷，当其与蛋白质结合时，所带的负电荷大大超过了天然蛋白质原有的负电荷，因而消除或掩盖了不同种类蛋白质间原有电荷的差异，使蛋白质均带有相同密度的负电荷，因而可利用 $M_r$ 差异将各种蛋白质分开。

在蛋白质溶解液中，加入SDS和巯基乙醇，巯基乙醇可使蛋白质分子中的二硫键还原，使多肽分成单个亚单位。SDS可使蛋白质的氢键、疏水键打开，还引起蛋白质构象的改变。此复合物的流体力学和光学性质均表明，它们在水溶液中的形状近似雪茄形的长椭圆棒。不同蛋白质-SDS复合物的短轴相同，约1.8nm，而长轴则与蛋白质的 $M_r$ 成正比。

## 五、凝胶系统

根据缓冲液的pH值和凝胶孔径差异，分为连续凝胶系统和不连续凝胶系统。

连续系统：电泳体系中缓冲液pH值及凝胶浓度相同，带电颗粒在电场作用下，主要靠电荷和分子筛效应。

不连续系统：缓冲液离子成分，pH，凝胶浓度及电位梯度均不连续性，带电颗粒在电场中泳动不仅有电荷效应，分子筛效应，还具有浓缩效应，因而其分离条带清晰度及分辨率均比前者好，目前使用最广泛。

## 六、分离效应

### 1. 分子筛效应

大小和形状不同的蛋白质通过一定孔径分离胶时，受阻滞的程度不同而表现出不同的迁移率，这就是分子筛效应。

蛋白质进入pH8.8的同一孔径的分离胶后，分子小且为球形的蛋白质分子所受阻力小，移动快，走在前面；反之，则阻力大，移动慢，走在后面，从而通过凝胶的分子筛作用将各种蛋白质分成各自的区带。这种分子筛效应不同于柱层析中的分子筛效应，后者是大分子先从凝胶颗粒间的缝隙流出，小分子后流出。

## 2. 电荷效应

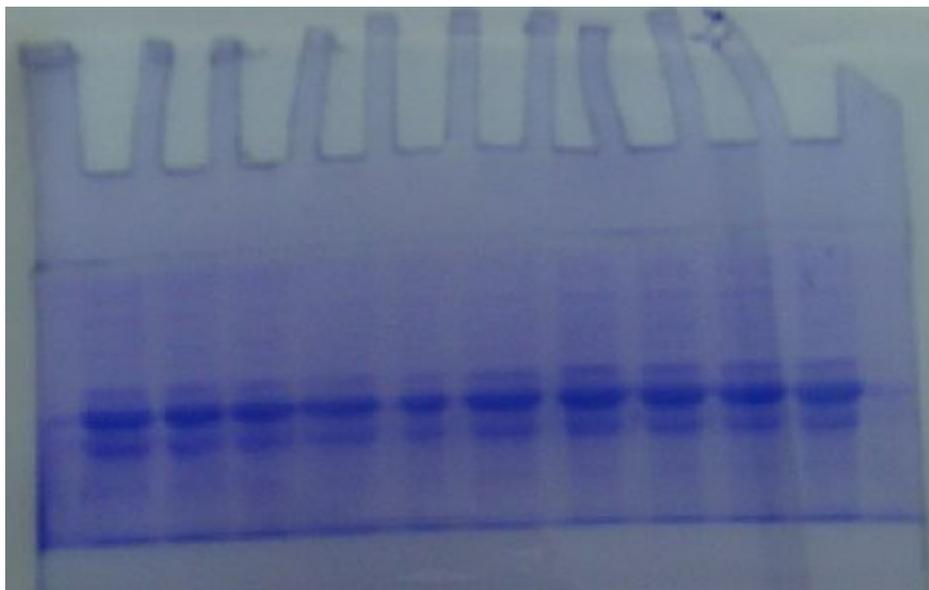
在pH8.8的分离胶中，各种带净电荷不同的蛋白质有不同的迁移率。净电荷多，则迁移快；反之，则慢。因此，各种蛋白质按电荷多少、相对分子质量及形状，以一定顺序排成一个个区带，因而称为区带电泳。

目前，PAGE连续体系应用也很广，虽然电泳过程中无浓缩效应，但利用分子筛及电荷效应也可使样品得到较好的分离，加之在温和的pH条件下，不致使蛋白质、酶、核酸等活性物质变性失活，也显示了它的优越性。

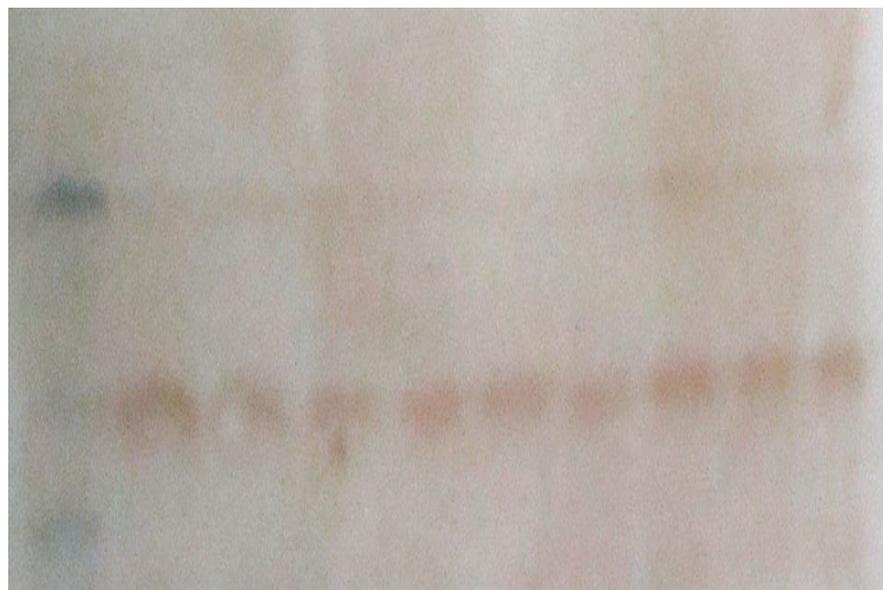
### **3.浓缩效应**

浓缩胶的凝胶浓度小，孔径较大，把较稀的样品加在浓缩胶上，样品移动的速度较快；分离胶孔径小，样品移动慢，由于凝胶孔径的不连续性使样品迁移受阻而压缩成很窄的区带，最终样品几乎能同时进入分离胶进行分离。

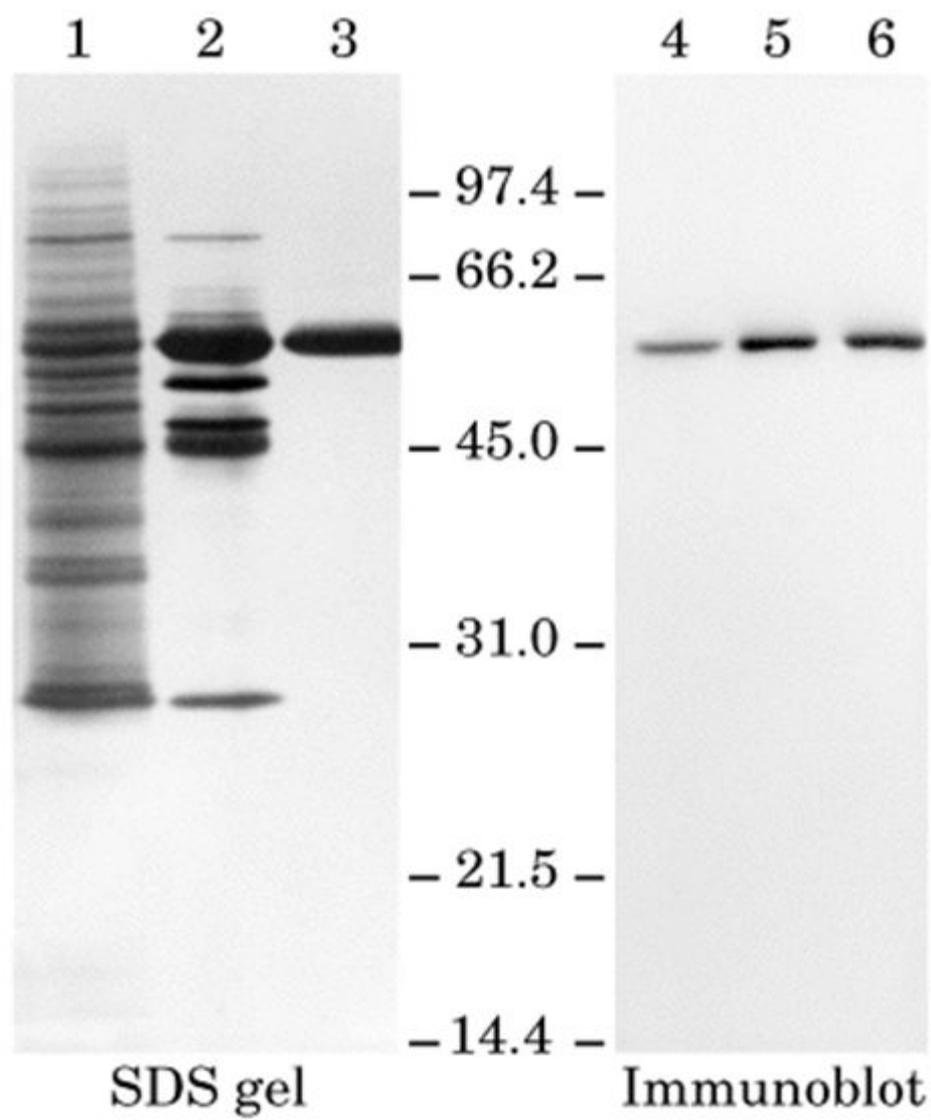
## SDS-PAGE染色方法:

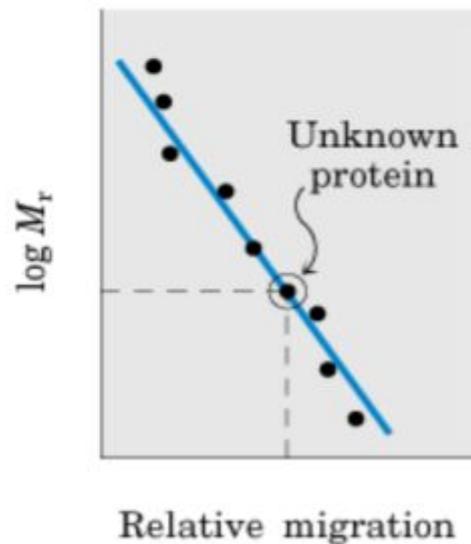
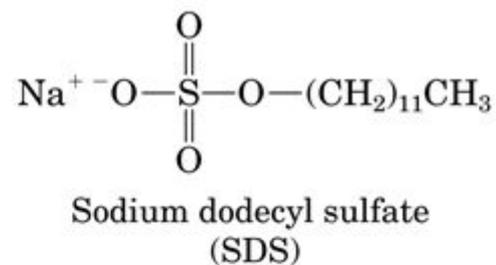
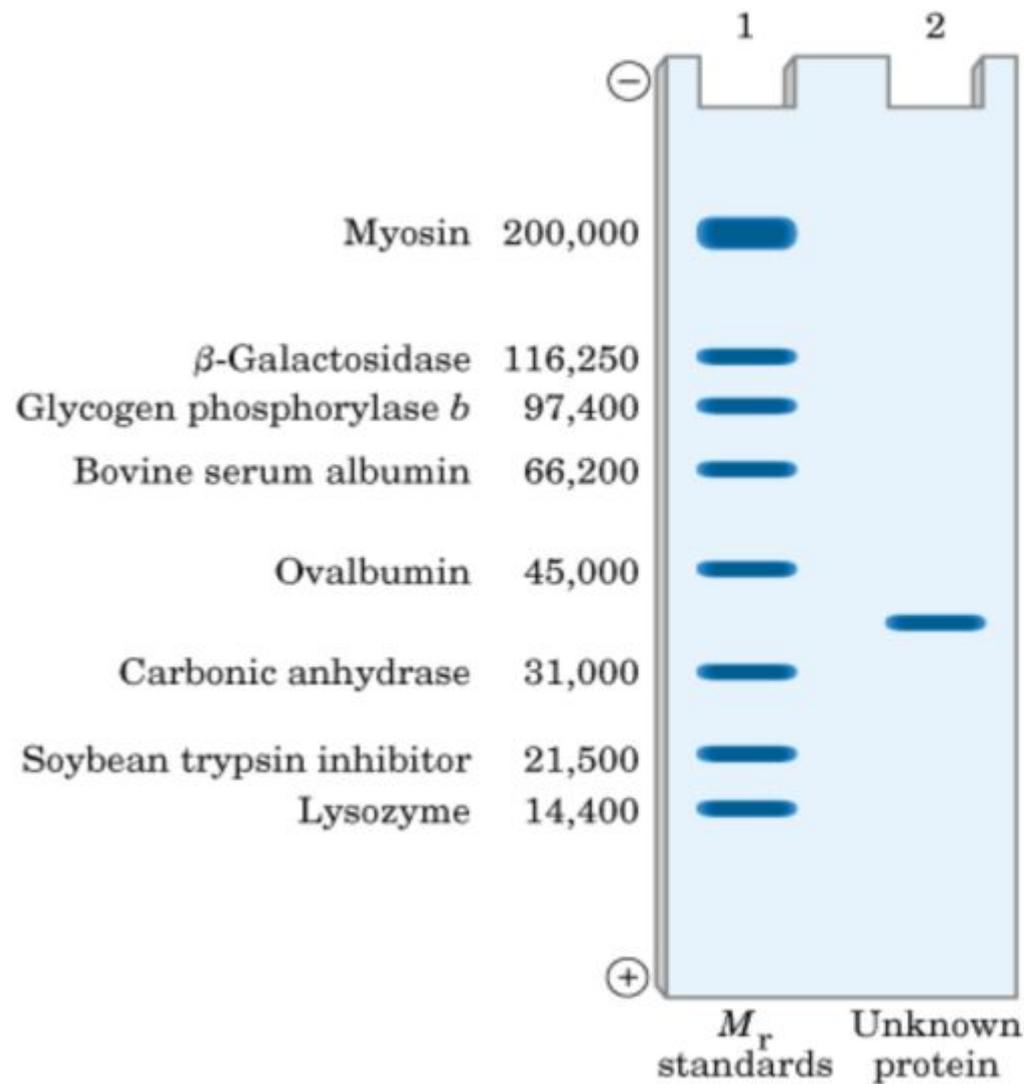


SDS-PAGE考马斯亮蓝染色法



SDS-PAGE银染法





## 七、SDS-PAGE缺点

当蛋白质电荷异常、构象异常、带有较大辅基(如糖蛋白)及一些结构蛋白等测出的 $M_r$ 不太可靠。如组蛋白 $F_1$ ，本身带有大量正电荷，虽然结合了正常量的SDS，仍不能完全掩盖其原有正电荷，故用SDS-PAGE测得的 $M_r$ 为35 000，而用其他方法测定的 $M_r$ 仅为21 000。因此要确定某种蛋白质的 $M_r$ 时，最好用2种测定方法互相验证。

对一些由亚基或两种以上肽链组成的蛋白质，由于SDS及巯基乙醇的作用，肽链间的二硫键被打开，解离成亚基或单个肽链，因此测定结果只是亚基或单条肽链的 $M_r$ ，还需用其他方法测定分子中肽链的数目。

# 等电点聚焦电泳

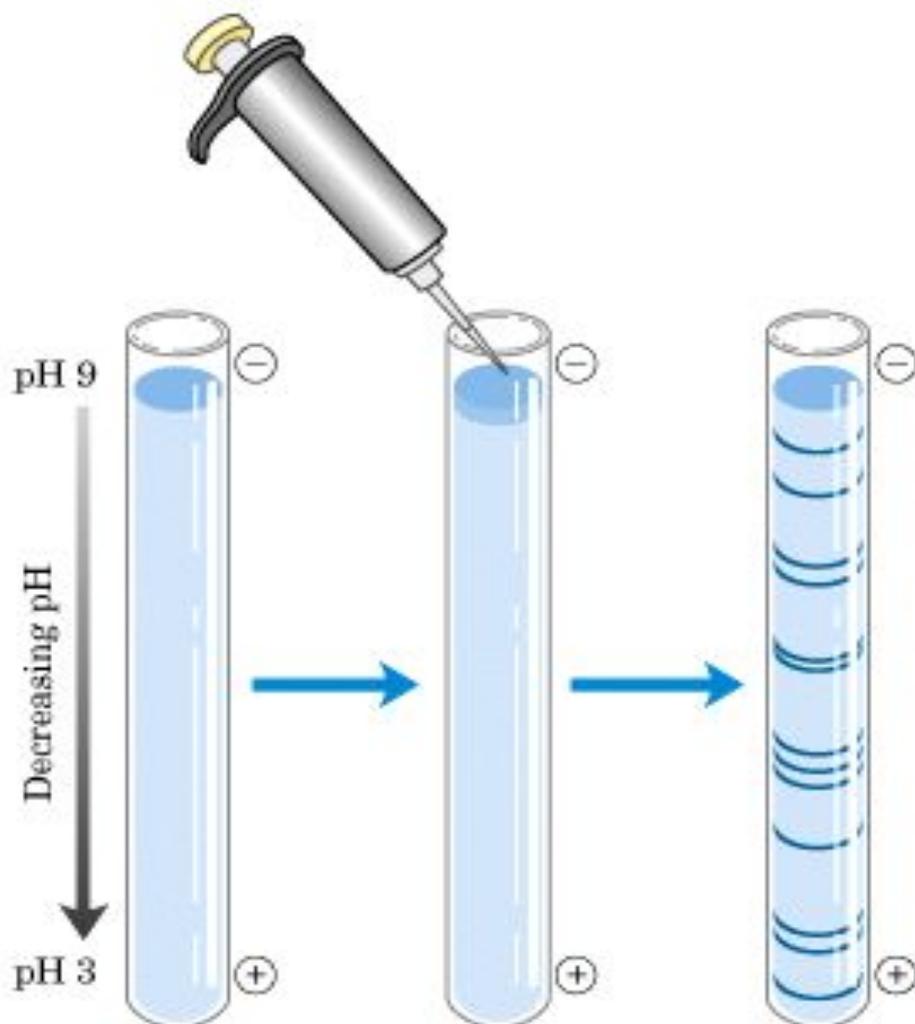
*(Isoelectro focusing electrophoresis, IEF)*

## 一、聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳原理

蛋白质是两性电解质，当 $\text{pH} > \text{pI}$ 时带负电荷，在电场中向正极移动；当 $\text{pH} < \text{pI}$ 时带正电荷，在电场中向负极移动；当 $\text{pH} = \text{pI}$ 时净电荷为零，在电场中既不向正极也不向负极移动，此时的 $\text{pH}$ 就是该蛋白质的等电点( $\text{pI}$ )。各种蛋白质由不同的氨基酸以不同的比例组成，因而有不同的 $\text{pI}$ 。

利用 $\text{pI}$ 不同，以PAGE为电泳支持物，并在其中加入两性电解质载体(carrier ampholytes)，在电场作用下，两性电解质载体在凝胶中移动，形成 $\text{pH}$ 梯度，蛋白质在凝胶中迁移至其 $\text{pI}$ 的 $\text{pH}$ 处，即不再泳动而聚焦成带，这种方法称**聚丙烯酰胺等电聚焦电泳**(isoelectric focusing-PAGE, **IEF-PAGE**)。

An ampholyte solution is incorporated into a gel.



A stable pH gradient is established in the gel after application of an electric field.

Protein solution is added and electric field is reapplied.

After staining, proteins are shown to be distributed along pH gradient according to their pI values.

## 二、两性电解质载体

两性电解质载体是用多烯多胺和不饱和酸合成的**脂肪族多氨基多羧基化合物的混合物**，其中不同的分子因氨基和羧基比例不同而具有不同的pI。

用IEF-PAGE分离蛋白质并测定pI时可先选用pI3-10的两性电解质载体及同一范围的**标准pI蛋白**，将其与未知样品同时电泳，固定染色后，以pH值为纵轴，距阴极迁移距离(cm)为横轴作出pH梯度标准曲线，根据染色后未知蛋白质迁移距离可推知其pI。

为进一步精确测定未知物的pI，还可选择较窄范围的两性电解质进行电泳，以提高分辨率。如实验时，无标准pI蛋白质作标定依据，则电泳后立即用表面微电极每隔0.5cm直接测定胶板的pH值，制作pH梯度曲线，染色后根据迁移距离推知某种蛋白质的pI。

两性电解质载体是IEF-PAGE中最关键的试剂，它直接影响pH梯度的形成及蛋白质的聚焦。因此，要选用优质两性电解质载体，在凝胶中，其终浓度一般为1%-2%。国内生产的两性电解质载体色黄，导电性略差，但只要控制凝胶中终浓度不超过2%，电泳时电压不要太高，仍可用于分析等电聚焦。另外，为提高分辨率可适当延长电泳时间。

pH梯度的线性依赖于两性电解质的性质，选择哪种pH梯度范围的两性电解质载体，则与被分离蛋白质的pI有关。

### 三、电极溶液

应选择在电极上不产生易挥发物的液体作为电极缓冲液，阴、阳电极溶液的作用是避免样品及两性电解质载体在阴极还原或在阳极氧化，其pH值应比形成pH梯度的阴极略高，比阳极略低。值得指出的是不同厂家合成两性电解质的方法不同，应根据说明书选用有关电极溶液。

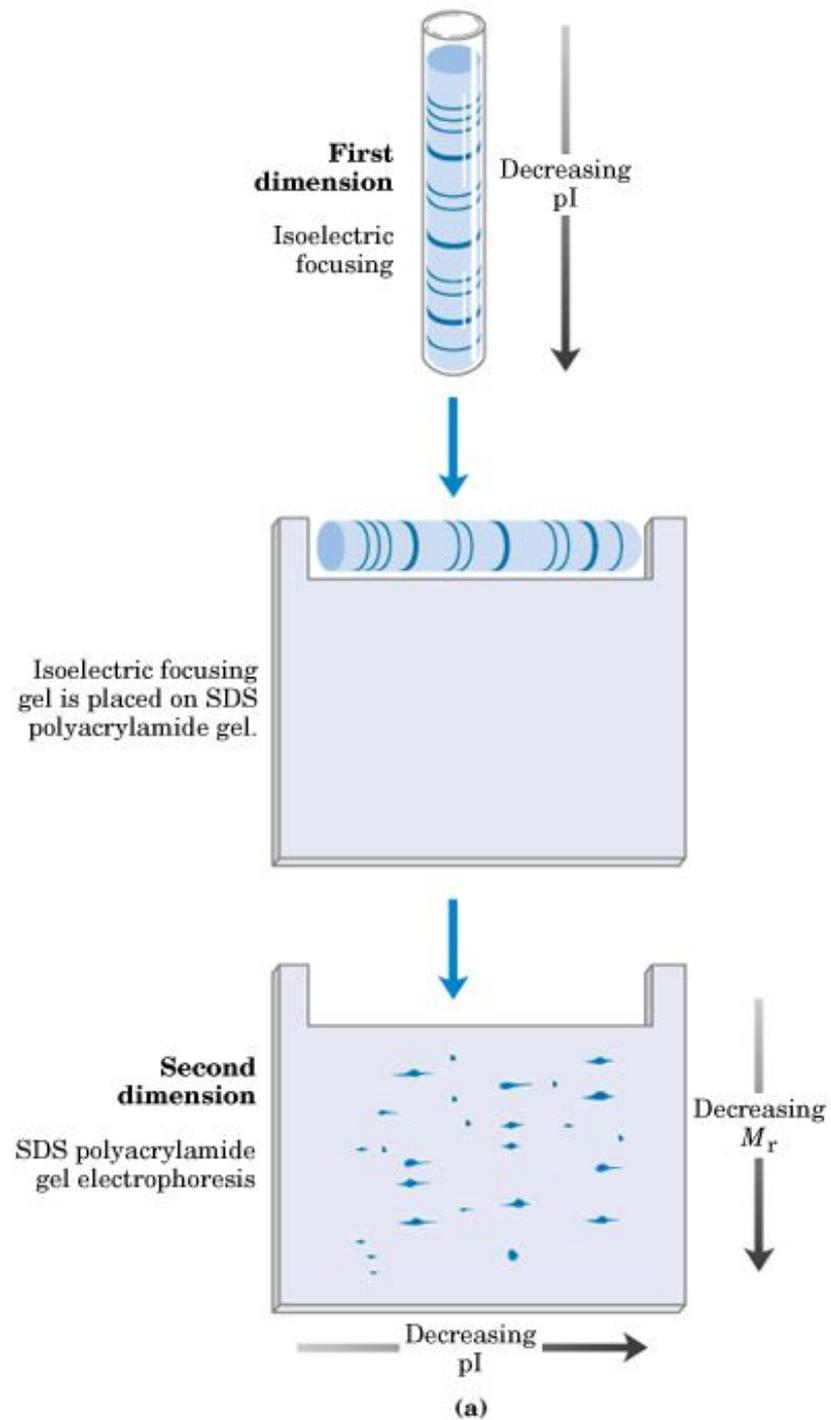
# 双向电泳

*(two-dimensional electrophoresis, 2-DE)*

## 双向电泳

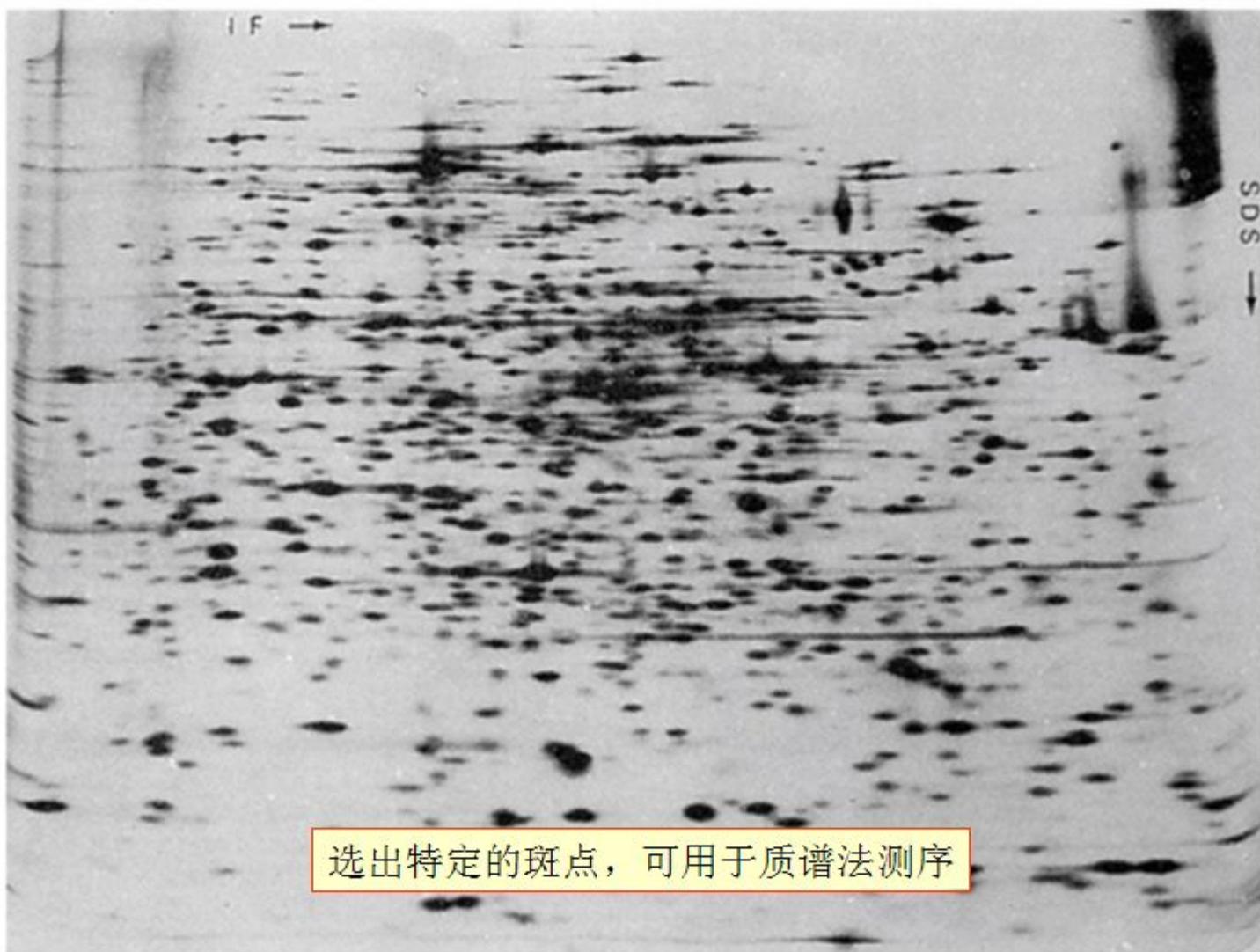
一般第一向IEF-PAGE用**超薄水平板**，电泳结束后切取所需泳道用于第二向电泳，或在**1mm内径的毛细管**中进行第一向IEF-PAGE，取出胶条用于第二向电泳。

第一向电泳的方法同IEF-PAGE，只是制胶时要加入2%两性电解质和6mol/L尿素。第二向电泳时，先将SDS-PAGE灌在**垂直玻璃板**之间，上部留2cm左右空间，待聚合后，将第一向胶条转移到第二向胶之上，用载玻片将胶条轻轻压直，加3  $\mu$  L 1%溴酚兰指示剂，用1%的琼脂糖(用电极缓冲液配制)密封胶条，琼脂糖凝固后即可电泳。待溴酚兰将至凝胶板下方边缘时，停止电泳。第二向电泳时，用梯度混合器将凝胶制成7.5%-15%的浓度梯度，可以提高电泳的分辨率。



目前，已有5000余种蛋白质分采用IEF/SDS-PAGE得到很好的分离，其高分辨率是各种类型单向PAGE及其他双向PAGE所无法比拟的。因此，IEF/SDS-PAGE双向电泳已成为当前分子生物学领域内常用的实验技术，可广泛用于生物大分子如蛋白质，核酸酶解片段及核糖体蛋白质的分离和精细分析，**是蛋白质组学的基本方法**。随着该技术的不断改进与发展，其应用范围将更加广泛。

然而，此技术对某些碱性蛋白质的分离却有其局限性，因在第一向IEF-PAGE的电泳体系中，含有高浓度的尿素，它的存在会使碱性区的pH梯度变得很窄而且不稳定，可使**碱性蛋白质难以进入凝胶中或者易泳出凝胶外**。因此，对碱性蛋白质的分离分析应采用其他方法。



# 思考题

- 1、**SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳**与**聚丙烯酰胺凝胶电泳**原理上有何不同？
- 2、用**SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳**测定蛋白质的分子量，为什么有时和凝胶层析法所得结果有所不同？是否所有的蛋白质都能用**SDS-凝胶电泳法**测定其分子量？为什么？
- 3、进行**聚丙烯酰胺等电点聚焦电泳**时的注意事项有哪些？其关键步骤是什么？