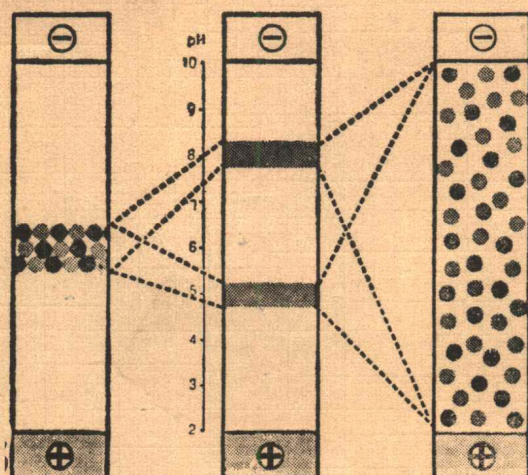




LKB

# 薄层等电聚焦技术

郭尧君



中国生物物理学会

# 薄层等电聚焦技术

郭 尧 君

(中国科学院生物物理研究所)

一九八八年八月

# 目 录

|                                           |        |
|-------------------------------------------|--------|
| <b>第一章 等电聚焦的原理</b> .....                  | ( 1 )  |
| 1. 蛋白质的等电点.....                           | ( 1 )  |
| 2. 电泳——在恒定pH介质中蛋白质的分离 .....               | ( 3 )  |
| 3. 等电聚焦——在pH梯度中的电泳 .....                  | ( 4 )  |
| 4. 等电聚焦的浓缩效应( 聚焦效应 ) .....                | ( 6 )  |
| 5. 载体两性电解质的特性.....                        | ( 6 )  |
| 6. pH梯度的形成.....                           | ( 9 )  |
| 7. 等电聚焦的分辨率.....                          | ( 11 ) |
| <b>第二章 薄层分析等电聚焦的方法</b> .....              | ( 13 ) |
| 1. 薄层和超薄层聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦操作程序.....             | ( 13 ) |
| 2. 薄层琼脂糖凝胶等电聚焦操作程序.....                   | ( 30 ) |
| <b>第三章 薄层等电聚焦技术的实验考虑</b> .....            | ( 35 ) |
| 1. 稳定介质.....                              | ( 35 ) |
| 2. 载体两性电解质和pH梯度范围的选择.....                 | ( 38 ) |
| 3. 电极溶液的选择.....                           | ( 38 ) |
| 4. 丙烯酰胺的聚合.....                           | ( 38 ) |
| 5. 四甲基乙二胺( TEMED )对丙烯酰胺凝胶的聚合和pH梯度的影响..... | ( 40 ) |
| 6. 样品的预处理及加样方法.....                       | ( 42 ) |

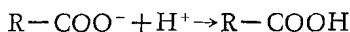
|                               |               |
|-------------------------------|---------------|
| 7. 盐离子对等电聚焦的影响.....           | ( 43 )        |
| 8. pH梯度和pI的测定 .....           | ( 44 )        |
| 9. 电泳参数( 功率、温度、时间 ) 的考虑.....  | ( 46 )        |
| 10. 聚焦后的检测方法.....             | ( 48 )        |
| <b>第四章 薄层等电聚焦技术的一些应用.....</b> | <b>( 58 )</b> |
| 1. 蛋白质和两性分子的分离分析及等电点的测定...    | ( 58 )        |
| 2. 在临床及法医学上的应用.....           | ( 58 )        |
| 3. 在农业和食品分析中的应用.....          | ( 61 )        |
| 4. 在生化分类学及其它基础理论研究中的应用.....   | ( 62 )        |

# 第一章 等电聚焦的原理

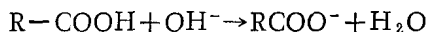
电泳是生化工作者常用的分析技术之一。等电聚焦(Iso-electrofocusing 缩写IEF或EF)也是一种电泳。这是1966年建立起来的一种高分辨的蛋白质分离分析的新技术。二十多年来发展很快。日趋完善。它的基本原理是利用蛋白质分子或其它两性分子的等电点的不同在一个稳定的、连续的、线性的pH梯度中进行蛋白质的分离分析。所以利用等电聚焦技术分析的对象是蛋白质和两性分子。分析的条件是凝胶中有稳定的、连续的、线性的pH梯度。下面分别就分析的对象和条件来说明等电聚焦的原理。

## 1. 蛋白质的等电点

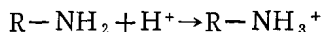
所有的蛋白质都是由不同数量和比例的L- $\alpha$ 氨基酸组成的,一些氨基酸的侧链在一定pH值的环境溶液中是带电的,例如在酸性pH时,天冬氨酸和谷氨酸残基的羧基结合一个质子而不带电。



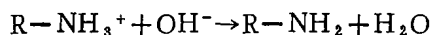
但在高pH时,羧基将介离而变成带负电。



赖氨酸残基的氨基和组氨酸残基的咪唑基在酸性pH时也结合一个质子,此时他们带正电。



但在高温时，这些基团将被介离而不带电荷。



蛋白质的净电荷是组成它的氨基酸残基上所有正负电荷的总和，所以它的净电荷也决定于它的环境的pH，这可以由图1净电荷—pH曲线来说明，在低pH，蛋白质的净电荷是正的。而在高pH，它的净电荷是负的，但在某一pH，净电荷曲线和pH轴相交，即为此蛋白质的等电点pI，蛋白质在此pH溶液中的净电荷是零。蛋白质的等电点仅仅决定于它的氨基酸组成，是一个物理化学常数。每一个蛋白质或多肽是由不同数目和比例的氨基酸组成的，因此蛋白质的等电点范围很宽，糖蛋白的pI可低达1.8，溶菌酶的pI可高达11.7，这样一个宽广的pI范围使得可以利用它来进行蛋白质的分离和分析，最早建立这个技术的是瑞典科学家 Harry Rillbe和Olov Vesterbery。

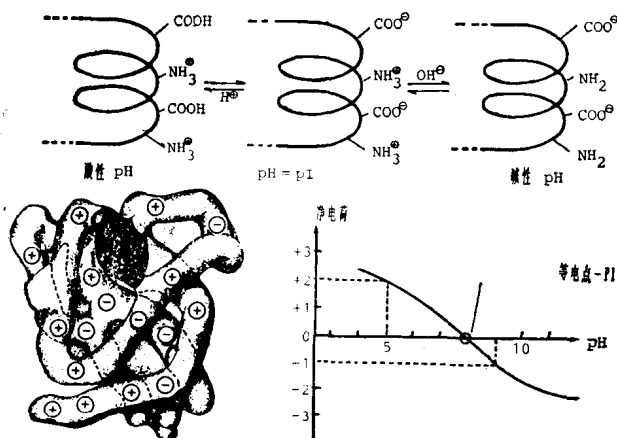


图1 蛋白质的净电荷—pH曲线

带有电荷的蛋白质分子可在电场中泳动，其电泳迁移率随所带电荷的不同而异。等电聚焦就是在支持介质中放入载体两性电解质，通以直流电后即形成从阳极到阴极逐步增加的pH梯度。当带电的蛋白质分子进入此体系时即移动并聚焦于相当其等电点pH的位置。为此，本技术可依等电点的不同将蛋白质分子分离。并且反之根据蛋白带在pH梯度中的位置测得该蛋白质的等电点。

## 2. 电泳——在恒定pH介质中蛋白质的分离

为了区别常规电泳和等电聚焦电泳在分离原理上的差别，这里先试述常规电泳分离的基础。

在常规电泳中，分离是在恒定pH和离子强度的缓冲液中进行的。假定溶液pH是9，根据净电荷—pH曲线（图2）蛋白质A和B将分别有净电荷-3和-1。当这些带负电的蛋

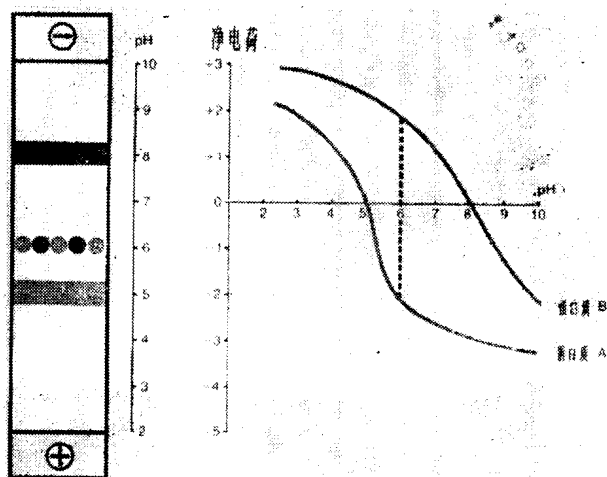


图2 电泳——在恒定pH介质中蛋白质的分离

白质被放在靠近电泳系统的阴极时，它们将在电场的影响下向阳极迁移。带负电荷多的蛋白质A将受到阳极较大的吸引力而逐渐跑到蛋白质B的前面而与蛋白质B分开。

假定蛋白质A和B有严格相同的分子尺寸和形状，它们将仅仅由于净电荷的不同而分开，这是电泳的基础。但是实际上蛋白质通常是有不同的空间形状，所以这种分离技术是基于净电荷、分子尺寸和形状三者的结合。

这种电泳方法虽然早已被建立，并在蛋白质化学分析中被广泛的应用。但它有一个很大的缺点——扩散。为此在加样时必须加成一个很窄的带，否则在电泳过程中带会变宽而影响分离。对电泳时间短和迁移率很快的蛋白质虽然影响不大，但是对于带电差别很小的组份的分离是一个必须考虑的问题。由于蛋白质分子在凝胶中的扩散，影响了常规电泳的分辨率。

### 3. 等电聚焦——在pH梯度中的电泳

等电聚焦不同于上述常规电泳。在等电聚焦中，分离是在连续的、稳定的和线性的pH梯度中进行的。如果我们把蛋白质A和B的混合物放在pH3.5-10的梯度中pH6的位置(图3)，根据净电荷-pH曲线，蛋白质A将有净电荷-2，蛋白质B将有净电荷+2，加上电场后，它们分别向不同的电极迁移。A向阳极，B向阴极。在迁移过程中，蛋白质A将进入越来越低的pH范围，所以它将逐渐损失它的负电荷，当它达到pH是5的梯度位置时，它的净电荷为零，即停止迁移，这就是它的pI位置，与此同时蛋白质B将向越来越高的pH范围迁移，直到到达它的净电荷是零的pH梯度位置，这就是蛋白质B的等电点位置。

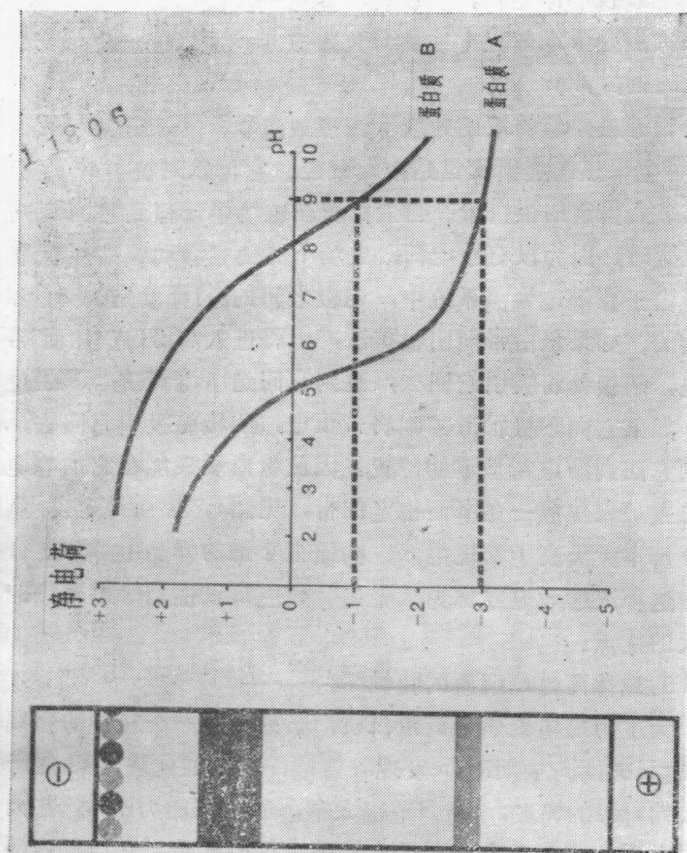


图3等电聚焦——在pH梯度中的电泳

在等电聚焦中，分离仅仅决定于蛋白质的等电点。这是一个“稳态”过程。一旦蛋白质到达它的等电点位置，它就没有净电荷，所以就不能进一步迁移。等电聚焦的最大优点是浓缩效应（或称聚焦效应），所以能产生细窄、稳定的蛋白带。

#### 4. 等电聚焦的浓缩效应（聚焦效应）

等电聚焦的突出优点是浓缩效应。它可以对抗扩散，而得到窄而稳定的蛋白带。当蛋白质在电场中迁移到它的等电点位置时，因为没有净电荷，电场不能使它移动。即使有扩散，由于在等电聚焦系统中，电极之间的pH梯度是线性和连续的。如果蛋白带向阴极扩散，则将进入高pH范围而带负电，阳极就将吸引它回去，直到它回到净电荷是零的位置。如果它向阳极扩散，则将带正电，阴极将吸引它回去，直到它回到净电荷是零的位置。因此蛋白质只能在它的等电点位置被聚焦成一条窄而稳定的带，见图4，因而等电聚焦的分辨率大大高于常规电泳，即使很小量的样品也能被分离。这种浓缩效应或称为“聚焦”效应可以说是等电聚焦的最大优点。

#### 5. 载体两性电解质的特性

为了用等电聚焦分离蛋白质，必须要有一个稳定的和线性的pH梯度。早期Rilbe发现谷氨酸，组氨酸或赖氨酸能产生大约1pH的梯度，但pH范围太窄，且缓冲能力不够，因为蛋白质分子本身也是两性电解质，在电泳时，它会影响梯度的pH，这就要求形成pH梯度的物质必须有足够的缓冲能力来克服蛋白质的影响。此外载体两性电解质必须有一个好的、均匀的导电性，特别是在它们的等电点，以使在整个系

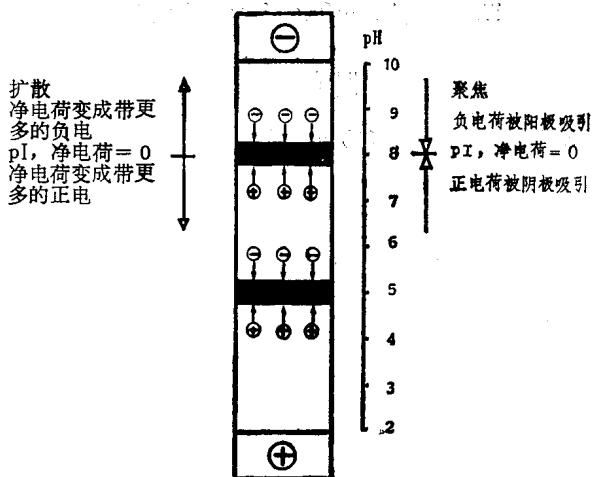


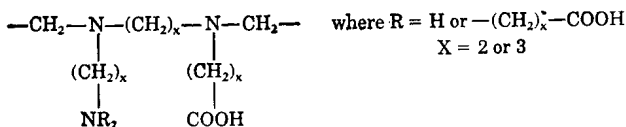
图4 等电聚焦的浓缩效应（聚焦效应）

统中保持电流。1966年Vesterberg合成了载体两性电解质，这是由许多脂肪族的多氨基多羧酸的异构体和同系物（类似物）组成的，结构式如图5。它们有连续改变的氨基与羧基比。这种合成是将不饱和酸如丙烯酸与多乙烯多胺发生双键的加成反应。加成反应先发生在 $\alpha$ ,  $\beta$ 不饱和酸的 $\beta$ 碳原子上，调节胺和酸的比例，就可得到氨基与羧基不同比例的脂肪族多氨基多羧酸。两性电解质的pI值将在大多数羧基的pK值和大多数氨基的pK值之间。多乙烯多胺链愈长，则伸胺对伯胺的比例增加，从而加成方式也愈多，所得两性电解质的pI值也越连续，就能得到平滑的pH梯度。实践证明，五乙烯六胺是最合适的。

调节所用酸与胺的比例，可得到不同pH范围的载体两性

## LKB Ampholine® carrier ampholytes

结构式



pH ranges

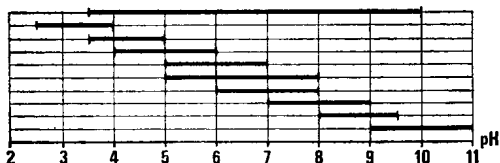


图5 载体两性电解质的结构式

电解质。也可先合成pH宽范围的载体两性电解质,然后用电解法将其分为不同的窄pH范围两性电解质。图5中示出了LKB公司的载体两性电解质的10种pH范围。

载体两性电解质必须具有以下特性:

(1) 强的缓冲能力和可溶性

为了避免聚焦的蛋白质引起pH梯度的pH局部改变,保持pH梯度的稳定。载体两性电解质必须具有强的缓冲能力和可溶性,特别在等电点。常用浓度为 $1-2 \times (W/V)$ 。

(2) 具有好的,均匀的导电性:

在等电点处必须有足够的电导,以使一定的电流通过。且要求不同等电点处的载体,有相似的电导系统,以使整个体系的电导均匀。如果局部电导过小,就会产生极大的电压

降，从而不能保持pH梯度而影响聚焦作用，且能产生局部过热，这不仅会影响pH梯度，而且也会使蛋白质产生热变性作用。甚至将凝胶烧坏。

### (3) 紫外吸收低：

制备分离时，检测蛋白质的方法通常是测量280nm的吸光度。因此要求载体两性电解质在280nm的吸光度尽可能的低。这样在聚焦后，可以不除去两性电解质而直接用光谱方法测定和收集蛋白质。

### (4) 容易从聚焦的蛋白质中分离：

如欲进一步制备提纯聚焦的蛋白质，可以通过离子交换层析、凝胶过滤、盐析、透析或别的方法来除去载体两性电解质。因它的分子量大约只有1000，所以很容易用这些方法除去。载体两性电解质只有氨基和羧基功能团可结合到蛋白质上，且在大部分情况下是可逆结合。

### (5) 无生物学效应

研究已经证明载体两性电解质对哺乳动物的组织培养、酶活性测定，免疫检测或当注射到小白鼠或大白兔中都没有影响。

## 6. pH梯度的形成

在没有电场时，载体两性电解质溶液的pH值大约是该溶液pH范围的平均值。但所有的载体两性电解质分子都带电，只是在溶液中荷正电和荷负电的基团数目是相等的，所以净电荷将是零。当引入电场时，两性电解质分子将向阴极或阳极迁移。带有最低pI的分子（荷最多的负电荷）将最快地向阳极迁移，当它达到净电荷是零的位置时才停止。这个位置靠近阳极，由于它有高的缓冲能力，将给环境溶液一个

pH, 这个pH等于分子本身的pI。其次一个低pI的两性电解质分子(荷其次多的负电荷)也将向阳极移动,直到它的净电荷被减少到零才停止。同样地,由于它的高的缓冲能力,也将使环境溶液的pH等于它本身的pI。依次类推所有的载体两性电解质分子用增加pI级数的办法将分别在阳、阴极之间到达它们自己的位置而给出一个pH梯度。图6示出pH梯度如何随时间形成。开始在酸、碱两端,然后移向中间。使用30W功率,一个小时后,pH梯度完全形成。在两个小时, pH梯度仅仅只有很小的改变。

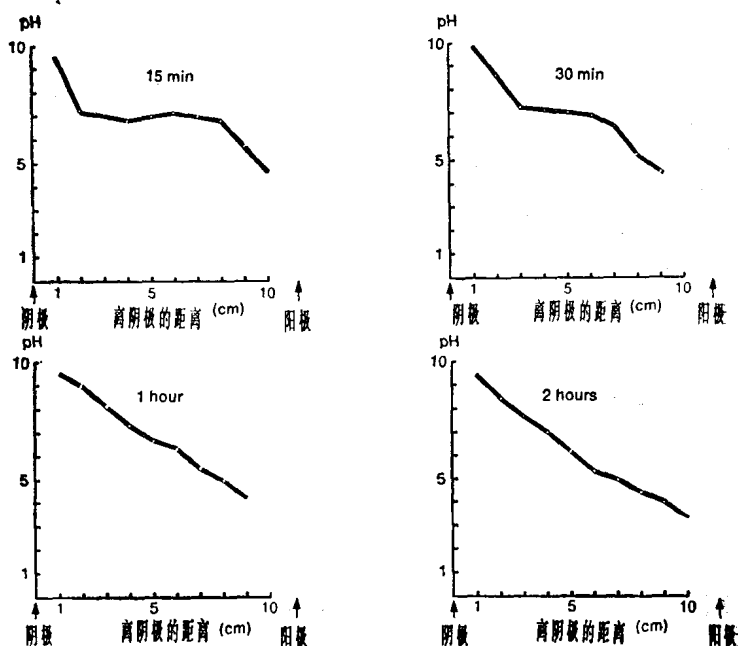


图6 pH梯度的形成

## 7. 等电聚焦的分辨率

分辨率高是等电聚焦技术具有生命力的根本原因，通常用测定两个邻近带的pI差， $\Delta(pI)$ 来表示分辨率。

$$\Delta(pI) = 3 \left( \frac{D(dpH/dx)}{E(du/dpH)} \right)^{1/2}$$

这里D：蛋白质的扩散系数

E：场强

$dpH/dx$ ：pH梯度

$du/dpH$ ：蛋白质的迁移率的斜率

蛋白质的扩散系数和迁移率是常数，所以只有通过提高电场的场强和使用窄pH范围来提高分辨率。pH梯度范围对

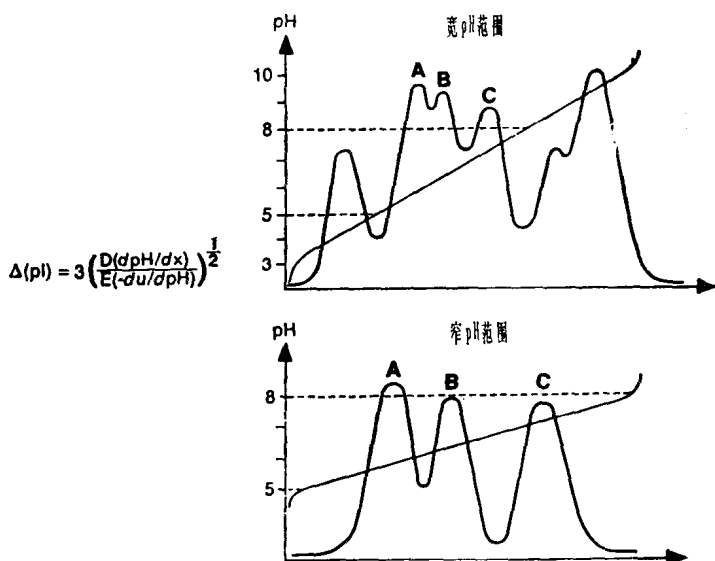


图7 等电聚焦的分辨率

分辨率的影响在图7中示出，在宽pH范围，样品的a、b和c峰有重叠，但在窄pH范围，分辨率明显的提高。

大多数情况下，使用载体两性电解质的等电聚焦技术达到0.01pH的分辨率是不困难的。迄今为止，报导的最高分辨率是0.0025pH。

## 第二章 薄层分析等电聚焦的方法

薄层(0.5毫米)分析等电聚焦是等电聚焦中的高分辨技术。因为胶层越薄,就越易被冷却,就可以加高电压,分辨率就可以提高,电泳时间也可以缩短、胶的染色、脱色、保存也比较方便,所以等电聚焦技术目前正朝着薄层和超薄层方向发展。近年来发展很快的薄层和超薄层聚丙烯酰胺和琼脂糖凝胶的灌制、电泳、固定、染色、脱色、保存等方法的优点是:

I. 节省试剂:胶层薄,试剂用量少,特别是节省载体两性电解质。

II. 胶板大:可在一块板上同时分析几十个样品,以确保在同一条件下同时比较样品的差异。

III. 样品用量少:一般只需几微克样品、如果采用银染色,则需样品量更少。

IV. 电泳时间短:1—2小时

V. 分辨率高:可优于0.01pH

VI. 可用表面电极直接在胶板上测定pH或用标准等电点蛋白测定pH,从而可以快而精确地确定蛋白质的等电点。

VII. 薄层胶便于固定、染色、脱色和制成永久保存的胶板。

### 1. 薄层和超薄层聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦操作程序(1)