



生物化学实验

电泳技术

5.6 等电聚焦电泳

北京大学 王青松 胡晓倩

等电聚焦电泳

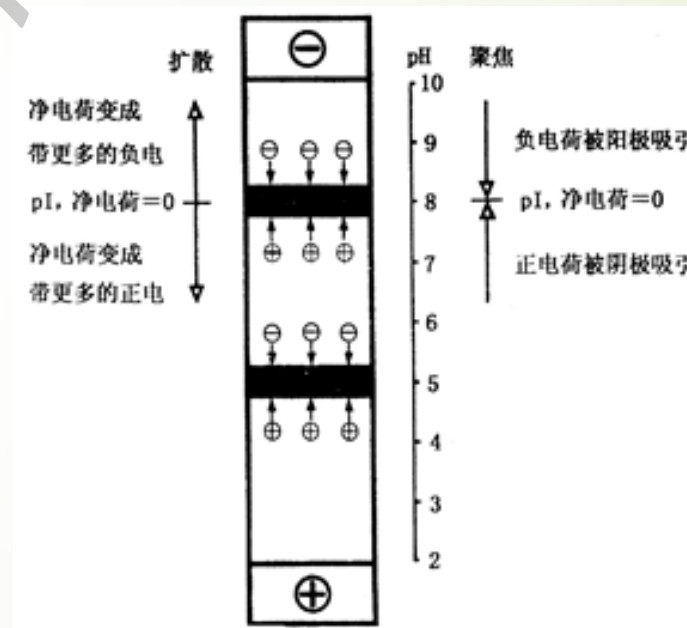
- 等电聚焦电泳 (Isoelectric focusing, IEF) 是一种利用蛋白质分子或其它两性电解质生物分子具有不同的**等电点 (Isoelectric point, pI)** 的性质, 在一个稳定、连续、线性的pH梯度中对蛋白质进行分离的高分辨率分离技术。
- 等电聚焦电泳具有**操作简单, 分辨率高等优点**。
- 等电聚焦分离的高分辨率蛋白质条带可对样品进行定量分析, 测定蛋白质等电点, 也可进行电泳转移或双向凝胶电泳对蛋白质进一步分析。

IEF电泳的实验原理

- 蛋白质是两性电解质，由于各种蛋白质的氨基酸组成不同，因而有不同的等电点 pI 。
 - 当 $pH > pI$ 时，蛋白质带负电荷，在电场的作用下向正极移动。
 - 当 $pH < pI$ 时，蛋白质带正电荷，在电场的作用下向负极移动。
 - 当 $pH = pI$ 时，蛋白质所带净电荷为零，在电场的作用下不发生移动。
- 因此可利用蛋白质不同的等电点 pI 对其进行分析和分离。

IEF电泳的实验原理

- 等电聚焦电泳就是在电泳支持介质（常用聚丙烯酰胺凝胶）中加入**载体两性电解质（carrier ampholytes）**，通以直流电后在正负极之间形成稳定、连续的线性pH梯度。
- 蛋白质在凝胶中受电场力作用下泳动，当蛋白质分子到达它的等电点位置时，分子所带净电荷为零，就停止迁移。
- 不同的蛋白质因其等电点 pI 的不同，最终在与其本身 pI 相等的pH位置被聚焦成窄而稳定的区带（如图），这种“聚焦效应”使等电聚焦的分辨率大大高于常规电泳。



pH梯度的建立方法

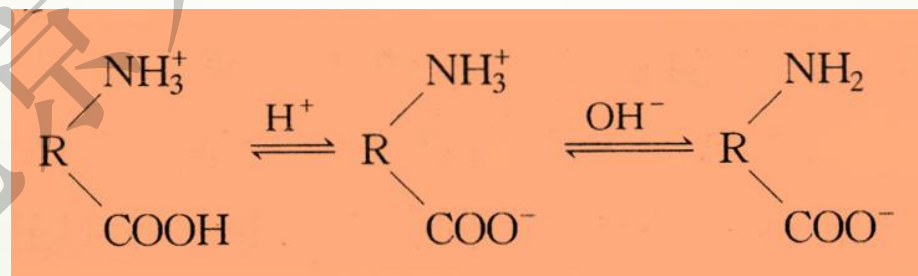
- 稳定、重复性良好的pH梯度的建立对于IEF非常关键。
- pH梯度的建立主要有2种方法。

1. 载体两性电
解质法

2. 固定pH梯度法

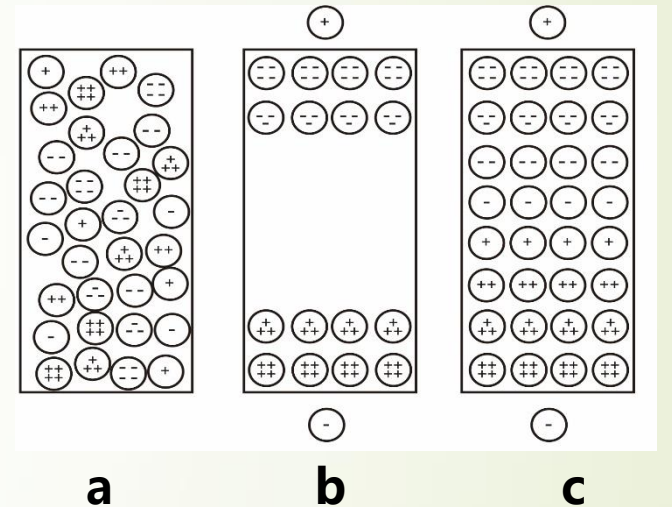
1. 载体两性电解质法

- 载体两性电解质法：是用多种载体两性电解质（ampholytes）混合物建立稳定良好的pH梯度。
- 载体两性电解质是由脂肪族多氨基多羧基的异构物和同系物组成，有连续改变的氨基与羧基比，它既带有酸性基团（ NH_3^+ ）又带有碱性基团（ COO^- ），即它既可接受质子，又可释放质子，在酸性条件下带正电荷，在碱性条件下带负电荷。
- 当它所带的正负电荷相等即净电荷为零时呈电中性，此时溶液的pH值等于该两性电解质的等电点pI。反应式如下：



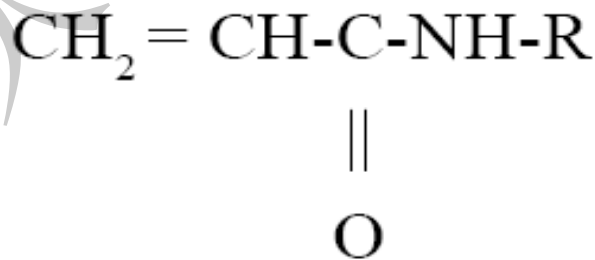
pH梯度的形成

- 未加电场，两性电解质混溶在凝胶中，载体两性电解质分子所带总的净电荷为零（图a）。
- 加电场后，在电场作用下，载体两性电解质将向正极或负极方向泳动，到达净电荷为零的位置时停止，具有最低和最高等电点的分子带电荷最多，泳动速度最快，所以pI 梯度从正/负级两端开始形成（图b）。
- 最终，不同pI 的载体两性电解质分子逐渐到达其等电点位置形成一个连续的pI 梯度（图c）。



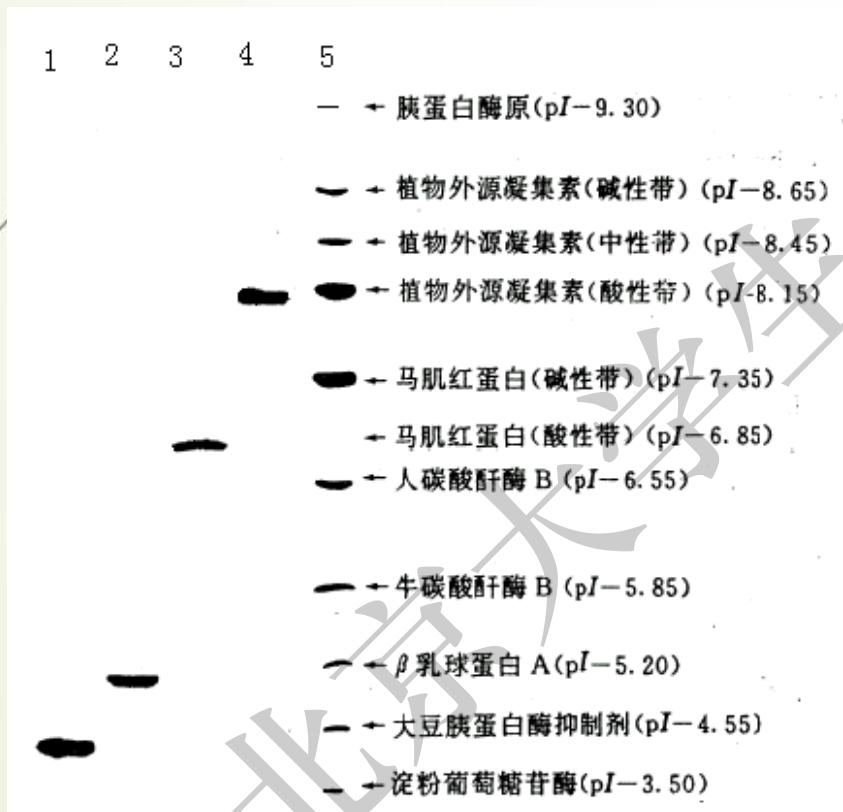
2. 固定pH梯度法

- 1982年，**固相化pH梯度 (immobilized pH gradient, IPG)技术出现**，有效解决了载体两性电解质的阴极漂移、机械不稳定性、重复性差等问题。
- IPG胶的材料是Immobilines，为拥有 $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{R}$ 结构的8种丙烯酰胺衍生物系列，其中R包含弱酸性或弱碱性缓冲基团（羧基或叔氨基团）。
- 在凝胶灌制时，将适宜的IPG试剂添加至丙烯酰胺缓冲液中用于凝胶聚合，在聚合中缓冲基团通过乙烯键共价聚合至聚丙烯酰胺骨架中，从而形成固相pH梯度。



Immobilines试剂的结构

典型的等电聚焦电泳图



1. 鸡卵清清蛋白

2. 牛血清清蛋白

3. 马血红蛋白

4. 糜蛋白酶原A

5. 标准蛋白混合物

注意事项

- 1. 等电聚焦对支持介质纯度要求较高，在聚焦过程中聚丙烯酰胺凝胶要不影响pH梯度的形成和蛋白质的分离。
- 2. 优质的载体两性电解质是得到连续稳定的pH梯度、高分辨率等电聚焦的关键因素。
- 3. 等电聚焦样品对盐离子不耐受：样品应溶解在水中或极低盐浓度的缓冲液中，**盐离子浓度高会破坏pH梯度，使蛋白条带畸变，产生高电流导致烧胶。**
- 4. 某些蛋白质样品易在等电点处不溶，产生沉淀。
- 5. 样品溶解性要好，否则会产生蛋白条带的拖尾和纹理现象。