



生物化学实验

电泳技术

5.5 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

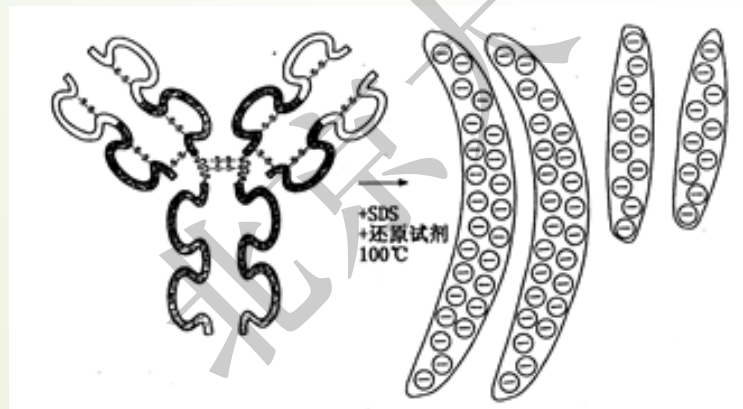
北京大学 王青松 胡晓倩

概述

- SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, 简称SDS-PAGE) 是在聚丙烯酰胺凝胶系统中加入一定量的**阴离子去污剂SDS**和**强还原剂**后, 蛋白质分子解聚成单链并与SDS结合形成带负电的**蛋白质-SDS复合物**, 该复合物的电泳迁移率主要取决于蛋白质的相对分子质量, 可用于测定单链蛋白质或亚基的相对分子质量。
- SDS-PAGE不连续系统电泳广泛应用于生物化学实验室中蛋白质相对分子质量、纯度测定、及Western blot实验。

SDS-PAGE电泳的原理

- 十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS) : 阴离子去污剂, 能破坏蛋白质分子内的二级和三级结构, 使分子去折叠, 并与蛋白质分子结合形成蛋白质-SDS复合物。
- 强还原剂: 主要有 β -巯基乙醇 (β -mercaptoethanol) 和二硫苏糖醇 (dithiothreitol, DTT) , 作用是使蛋白质分子中半胱氨酸残基之间的二硫键打开, 并不易再氧化。
- 蛋白质样品溶液中同时加入SDS和DTT后, 蛋白质分子被解聚成亚基, SDS与蛋白质结合形成带负电荷的蛋白质-SDS复合物。



- 免疫球蛋白分子在100°C用SDS和DTT处理3~5 min后解聚成单链分子, 并形成带负电荷的蛋白质-SDS复合物。

SDS-PAGE电泳的原理

- 蛋白质-SDS复合物降低或消除了各种蛋白质分子之间天然的电荷差异，并引起蛋白质构象的改变，在水溶液中的形状近似于雪茄烟形的长椭圆棒形结构，其短轴的长度相同，长轴的长度则与蛋白质的相对分子质量成正比。
- 蛋白质-SDS复合物在凝胶中的迁移率不再受蛋白质原有的电荷和形状的影响，而只与椭圆棒的长度也就是蛋白质相对分子质量有关。蛋白质的电泳迁移率主要决定于亚基的相对分子质量，而与其所带电荷的性质无关。
- 在电场下，相对分子质量大的蛋白质受到的阻力大，在凝胶中迁移速度慢，反之相对分子质量小的亚基受到的阻力小，在凝胶中迁移速度快。这样利用凝胶的分子筛效应就把同一样品中不同大小相对分子质量的蛋白质分开。

不连续系统

- **不连续系统**：是使用不同孔径的凝胶和不同缓冲体系的电泳方式。在电泳分离过程中，由于浓缩胶的堆积作用，可使样品在浓缩胶和分离胶的界面上被浓缩成一窄带（**浓缩效应**），然后在一定浓度或浓度梯度的凝胶上进行分离（**分子筛效应+电荷效应**）。虽然制胶操作难度较大，但它具有连续系统不可比拟的优越性，**分辨率高**。

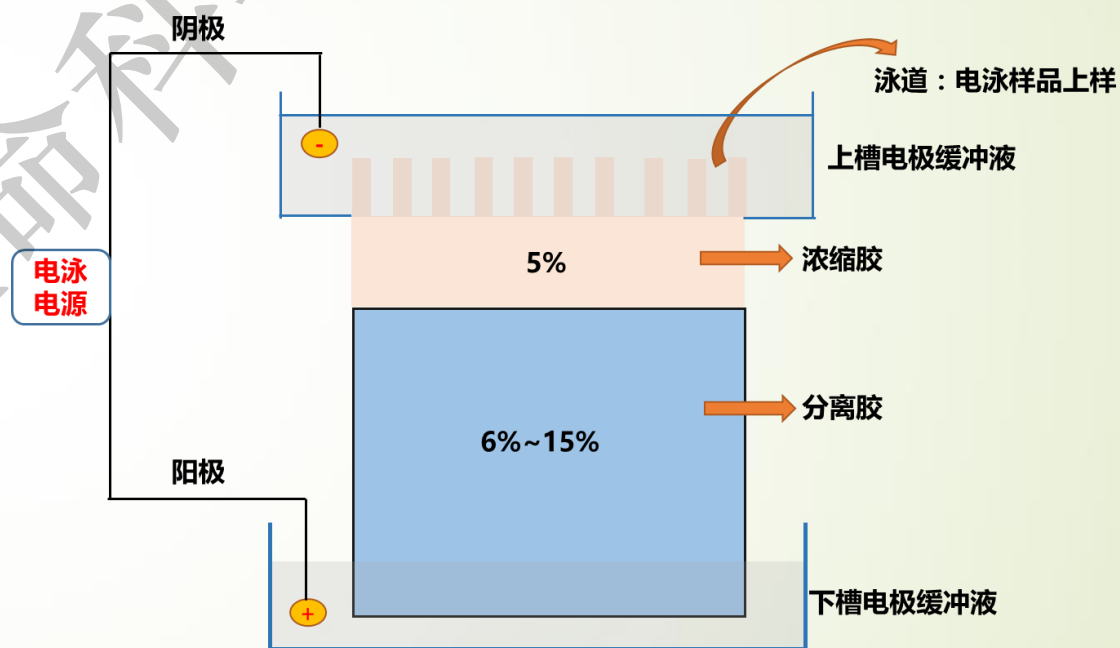
- 不连续电泳的**4个不连续性**
 - 缓冲液离子成分的不连续性
 - 缓冲液pH梯度的不连续性
 - 凝胶孔径的不连续性
 - 电位梯度的不连续性



- **样品的浓缩效应**
- **分子筛效应**
- **电荷效应**

不连续电泳系统的组成

- 凝胶由上下2层不同的凝胶层组成，上层为浓缩胶，下层为分离胶。
- 浓缩胶 (stacking gel)：为大孔胶，缓冲液 250 mM Tris-HCl, pH 6.8
- 分离胶 (separating gel)：为小孔胶，缓冲液 375 mM Tris-HCl, pH 8.8
- 在上下电泳槽内充以上槽/下槽电极缓冲液，为：Tris—甘氨酸缓冲液 (pH 8.3)

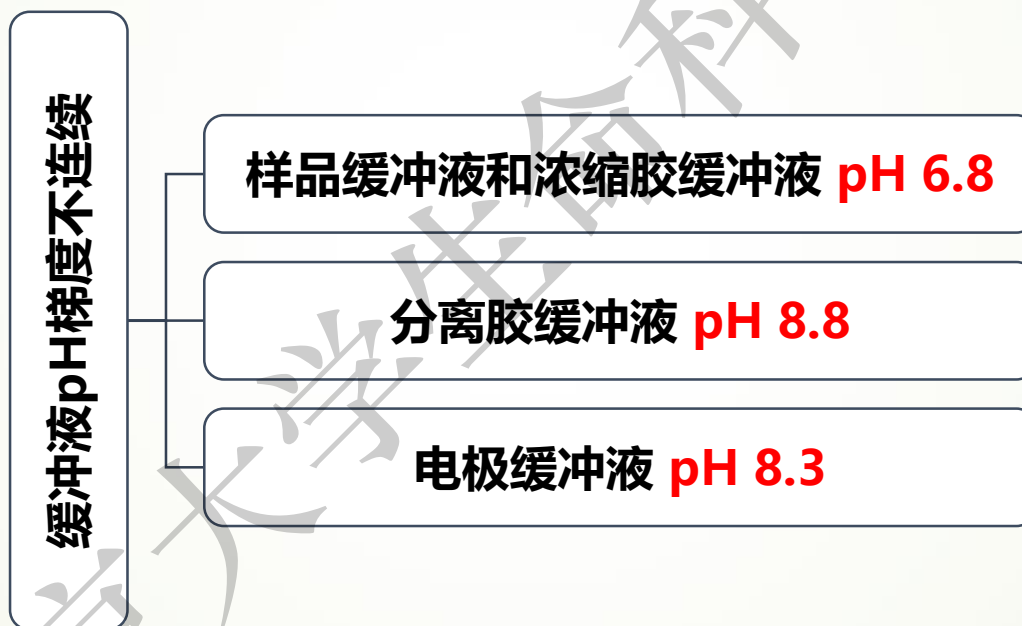


缓冲液离子成分不连续

- 常用凝胶缓冲系统：Tris（三羟甲基氨基甲烷）-HCl系统，但其在浓缩胶（250 mM Tris）和分离胶（375 mM Tris）中浓度不同
- 电极缓冲液：为Tris-甘氨酸（glycine）系统

甘氨酸在浓缩胶和分离胶中的解离为 Gly^- 程度不同， Cl^- 和 Gly^- 在浓缩胶中迁移速度不同，造成离子成分的不连续性。

缓冲液pH梯度不连续



浓缩胶与分离胶之间pH梯度的不连续性，是为了控制 Gly^- 的解离度，从而控制其有效迁移率。

样品的浓缩效应

- 电泳开始后，缓冲系统中HCl全部解离成 Cl^- ，在电场中迁移速度快，为**先导离子**，**走在最前面**，其后形成一个低电导区，具有较高的电位梯度；
- 甘氨酸解离度较小，仅有0.1%~1%解离成 Gly^- ，在电场中迁移很慢，为**尾随离子**，**走在最后面**；
- 样品中**蛋白质-SDS复合物带负电**，移动速度介于两者之间。

因此，有效泳动率： $\text{Cl}^- > \text{蛋白质-SDS} > \text{Gly}^-$

样品的浓缩效应

- 浓缩胶中，这3种离子同时向阳极方向移动， Cl^- 后面较高的电位梯度使后面的蛋白质和尾随离子加速移动，当三者的移动速度相同时，**在先导离子和尾随离子之间就形成了一个稳定的不断向阳极移动的界面**，蛋白质在这个界面上逐步**堆积成一个狭窄的中间层**，达到样品浓缩的目的。
- 当 Gly^- —蛋白质— Cl^- 的移动界面到达浓缩胶和分离胶的界面时，由于分离胶缓冲液的pH是8.8，导致 **Gly^- 的大量解离**， **Gly^- 的迁移速度也随之增加**，赶上并超过蛋白质紧随 Cl^- 之后移动，蛋白质移动速度较慢被留在后面，不再受离子界面的影响，从凝胶不连续的界面开始，**被堆积的蛋白质在分离胶中以固定的电位梯度进行电泳**，受到分离胶分子筛效应和电荷效应的作用使各个组分被分离。

凝胶孔径不连续

- 浓缩胶浓度低，为大孔胶 ($T=5\%$)，只起浓缩作用。
- 分离胶浓度较高，为小孔胶 ($T=6\sim 15\%$)，具有分子筛效应将蛋白质分离。
- 在电场作用下，蛋白质样品颗粒在大孔胶中泳动泳动的阻力小，移动速度快；当进入小孔胶时，受到的阻力大，移动速度减慢。
- 当电泳至两层凝胶交界处，由于凝胶孔径的不连续性使得样品迁移受阻而压缩成很窄的区带。

电位梯度不连续

- 电位梯度不连续：样品和浓缩胶缓冲液均使用pH6.8的Tris-HCl系统，电极缓冲液使用Tris-甘氨酸系统。
- 电位梯度的高低与电泳速度的快慢有关。根据公式：

$$\text{电泳速度 } v = m \times E \quad (m: \text{迁移率}; E: \text{电场强度})$$

- 电泳开始后，快离子的迁移率最大，其快速移动会在其后形成一个离子浓度很低的低电导区。根据公式 $E = \frac{1}{\eta}$ （E为电位梯度， η 为电导率），导致低电导区有较高的电位梯度，使蛋白质和慢离子在快离子后面快速移动，将蛋白质浓缩成狭窄的区带。

分子筛效应

- 分子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**。
- 蛋白质经过浓缩胶的浓缩效应后，快、慢离子及蛋白质进入pH 8.8的同一孔径的分离胶中，蛋白质分子迁移速度与其相对分子质量大小、形状、迁移率密切相关。
- **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。**
- **注意：这种分子筛效应不同于凝胶过滤层析中的分子筛效应，凝胶过滤层析是大分子先从凝胶颗粒间的缝隙流出，小分子后流出。**

电荷效应

- 蛋白质进入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。
 - **SDS-PAGE电泳的泳动率不再受蛋白质原有电荷与形状的影响。**
 - 各种蛋白质-SDS复合物在电泳中不同的泳动率只反映了蛋白质分子量的不同。**

SDS-PAGE电泳的特点

1. 具有分子筛效应，分辨率高

2. 样品用量少，灵敏度高，可达ng级

3. 凝胶化学性质稳定

4. 凝胶不带电荷，消除了电渗现象

5. 凝胶机械强度好，有弹性，在一定浓度范围内无色透明

6. 凝胶孔径可调节

SDS-PAGE电泳的应用

1. 蛋白质相对分子质量的测定



2. 蛋白质样品的纯度分析



3. 蛋白质免疫印迹分析Western blot



4. 电泳分离得到的目的蛋白质质谱鉴定

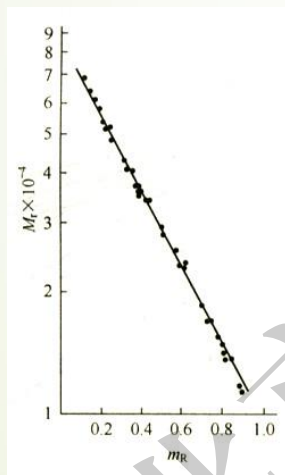


5. 与IEF电泳结合，进行双向凝胶电泳2-DE



蛋白质相对分子质量测定

- 1969年，Weber等人对37种已知相对分子质量的蛋白质进行测定，实验证实当蛋白质或亚基的相对分子质量在15 000到200 000 Da之间时，电泳迁移率与相对分子质量的对数呈线性关系。因此，SDS-PAGE电泳不仅可根据相对分子质量大小对蛋白质进行分离，而且可根据电泳迁移率大小测定蛋白质的相对分子质量。



37种蛋白质相对分子质量的对数
与电泳相对迁移率的关系图

$$\lg M_r = -b \cdot m_R + K$$

M_r : 蛋白质或亚基的相对分子质量,

m_R : 为电泳相对迁移率

b : 斜率

K : 截距 (在一定的条件下, b 和 K 均为常数)

SDS-PAGE 电泳注意事项

- 1. 对于由亚基或2条以上肽链组成的蛋白质，SDS-PAGE电泳测定的只是它们的亚基或单条肽链的分子量，而不是完整蛋白质的分子量。
- 2. 有些蛋白质的相对分子质量测定不准确：1) 电荷异常或构象异常的蛋白质；2) 带有较大辅基的蛋白质（如糖蛋白）；3) 一些结构蛋白如胶原蛋白等。
- 3. SDS-PAGE电泳在样品制备中会导致蛋白质的变性失活，不适用凝胶的活性染色。
- 4. 对于相对分子质量小于15000 Da的小分子蛋白质和肽类，常用的Tris-甘氨酸缓冲系统的分辨率不理想，可采用Tris-tricine缓冲系统。