



生物化学实验

电泳技术

5.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳

北京大学 王青松 胡晓倩

概述

- 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (polyacrylamide gel electrophoresis, 简称PAGE) 是以聚丙烯酰胺凝胶作为支持物的电泳方法, 是研究蛋白质和核酸的重要分离和分析手段。
- 聚丙烯酰胺凝胶电泳在科研、教学及生产中应用广泛, 可用于蛋白质、酶、核酸等生物大分子的分离、定性、定量分析, 也用于少量样品的制备, 还可测定蛋白质相对分子质量及等电点等。

PAGE电泳技术的发展

- 1959年, Raymond和Weintraub最早建立了利用聚丙烯酰胺凝胶作为支持介质的区带电泳方法即聚丙烯酰胺凝胶电泳。
- 1964年, Davis和Ornstein等用聚丙烯酰胺圆盘电泳成功分离人血清蛋白。
- 之后相继发展: 聚丙烯酰胺垂直板电泳、聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳、SDS-PAGE电泳、等电聚焦电泳、双向电泳技术。

聚丙烯酰胺凝胶电泳的优点

- 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，与被分离物不起化学反应；
- 3. 对pH和温度变化较稳定；
- 4. 几乎无电渗作用，只要丙烯酰胺纯度高，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，灵敏度高，其灵敏度常规可达100 ng，最低可达1 ng；
- 6. 凝胶孔径可调节，根据被分离物相对分子质量选择合适的浓度；
- 7. 分辨率高，尤其是不连续凝胶电泳，集浓缩、分子筛和电荷效应为一体，较琼脂糖凝胶有更高的分辨率。

聚丙烯酰胺凝胶

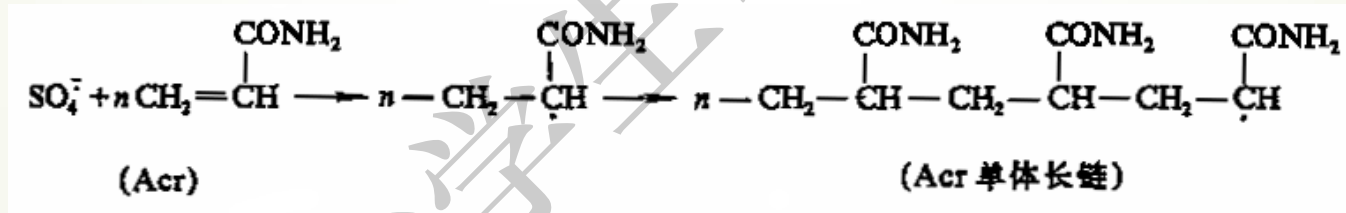
- 聚丙烯酰胺凝胶电泳是由**单体丙烯酰胺** (Acrylamide, Acr) 和**交联剂N, N-甲叉双丙烯酰胺** (methylene-bisacrylamide, Bis) 在**催化剂过硫酸铵AP**或**核黄素**和**加速剂TEMED**的作用下聚合交联而成的三维网状结构的凝胶。
- 聚丙烯酰胺凝胶的聚合所用的催化系统:
 - 1) 化学催化系统: AP-TEMED系统 (常用)
 - 2) 光催化系统: 核黄素-TEMED
 - 催化剂AP: 过硫酸铵 (ammonium persulfate, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$)
 - 加速剂TEMED: 四甲基乙二胺 (N,N,N',N'-tetramethylethylene diamine)

AP-TEMED催化系统

- TEMED催化过硫酸铵AP生成硫酸自由基：

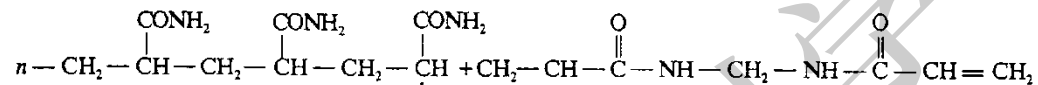


- 硫酸自由基的氧原子激活Acr单体并形成单体长链：



- Bis将单体长链连成网状结构：

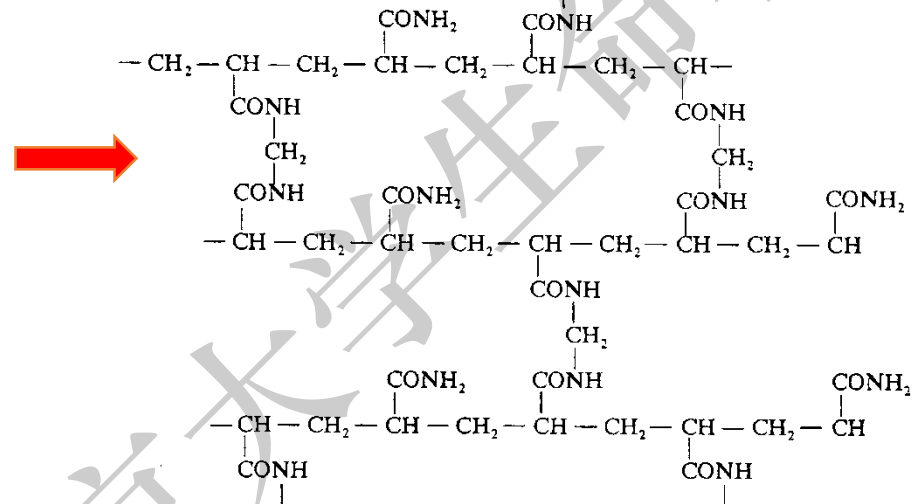
三维网状结构凝胶



Acr单体长链



Bis



三维网状凝胶

凝胶聚合反应的影响因素

- **1. 催化剂和加速剂的浓度** 过量的催化剂和加速剂会引起烧胶和蛋白质条带的畸变。
- **2. pH** TEMED只能以游离碱的形式发挥作用，在酸性条件下，叔胺缺少自由碱基，引发AP产生自由基的过程会被延迟，聚合时间延长。
- **3. 温度** 聚合速度与温度有关，一般是高温聚合快，而聚合的速度影响交联孔径的大小，所以凝胶聚合时必须保持温度恒定，通常室温下聚合。
- **4. 分子氧** 分子氧会阻止碳链的延长，妨碍聚合作用，**聚合过程中要尽量避免接触空气。**
- **5. 杂质** 某些金属离子或杂质会影响凝胶的化学聚合，应选择高纯度的电泳试剂。

凝胶总浓度及交联度对凝胶的影响

- 凝胶溶液中单体和交联剂的总浓度和两者的比例是决定聚丙烯酰胺凝胶的机械性能、弹性、透明度、粘着度及孔径大小的主要因素。**T为凝胶溶液中单体和交联剂的总质量浓度，C为凝胶溶液中交联剂占单体和交联剂总量的质量分数。**

$$T = \frac{a + b}{m} \times 100\% \quad C = \frac{b}{a + b} \times 100\%$$

式中，a为丙烯酰胺单体的质量(g)，b为交联剂的质量(g)，m为溶液的终体积(mL)。

- 凝胶a、b的比例决定了凝胶的物理性状。
 - 当a:b<10，凝胶脆且硬，不透明，呈乳白色；
 - 当a:b>100，使用5%的丙烯酰胺凝胶也呈糊状。
 - **通常用a:b在30左右，且丙烯酰胺浓度高于3%，凝胶富有弹性并且透明。**

凝胶浓度与孔径的关系

- 凝胶的总质量浓度T和交联度C决定凝胶的有效孔径。
- 凝胶的三维网状结构具有**分子筛效应**，不同大小和形状的大分子通过孔径时所受的阻滞力不同，加上大分子的**电荷效应**，使各种大分子迁移率不同得以分离。
- 实际工作中，**依据待分离蛋白质的相对分子质量的大小选择合适的凝胶浓度**，使蛋白质混合物得到最大限度的分离。

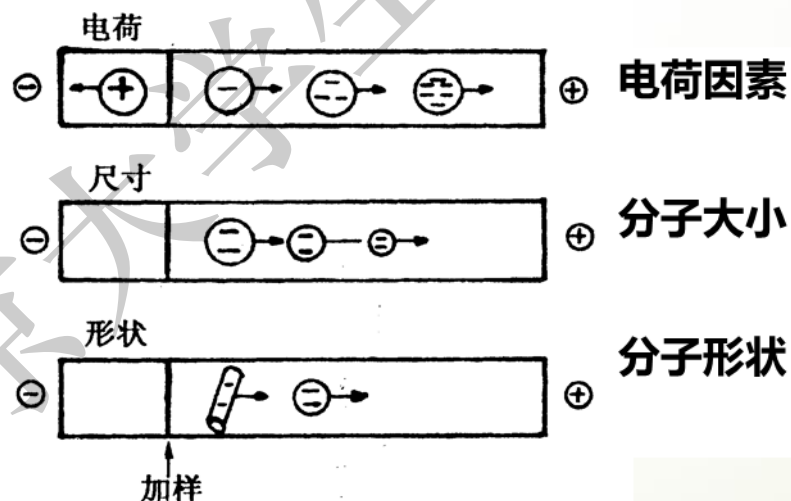
蛋白质相对分子质量范围 (kDa)	适用的凝胶浓度/T%
< 10	20~30
10 ~ 40	15~20
40 ~ 100	10~15
100 ~ 500	5~10
> 500	2~5

净电荷PAGE电泳

- 净电荷聚丙烯酰胺凝胶电泳是**对天然状态的蛋白质进行分离，保持蛋白质的天然构象及其生物学活性。**
- 净电荷PAGE电泳利用蛋白质分子带有净电荷的性质和数目差异、以及相对分子质量及分子形状的差异，使蛋白质在电场中具有不同的泳动速度和方向，从而达到分离的目的。
- 多数蛋白质的pI在中性偏酸性范围，通常是将样品在碱性缓冲系统中进行电泳。
- 蛋白质分子带负电荷，以不同速度向阳极迁移，称为**阳极电泳**；对于一些碱性蛋白，使用酸性缓冲系统进行电泳，蛋白质分子带正电荷而向阴极迁移，称为**阴极电泳**。

蛋白质在净电荷PAGE电泳中的分离因素

- **电荷因素** 蛋白质分子形状和大小相同，所带电荷性质与数量不同。
- **分子大小** 蛋白质分子形状和所带电荷性质与数量相同，分子大小不同。
- **分子形状** 蛋白质分子大小和所带电荷性质与数量相同，分子形状不同。



聚丙烯酰胺凝胶电泳的类型

- 聚丙烯酰胺凝胶电泳根据**有无浓缩效应**，分为**连续系统**和**不连续系统**。
 - 连续系统：电泳体系中缓冲液pH及凝胶浓度相同，带电颗粒在电场作用下泳动，主要靠**电荷+分子筛效应**。
 - 不连续系统：电泳体系中由于缓冲液离子成分、pH、凝胶浓度及电位梯度的不连续，带电颗粒在电场中泳动主要靠**电荷效应+分子筛效应+浓缩效应**，因此其分离条带清晰度及分辨率比连续系统高。

不连续系统详见：第5.5节 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

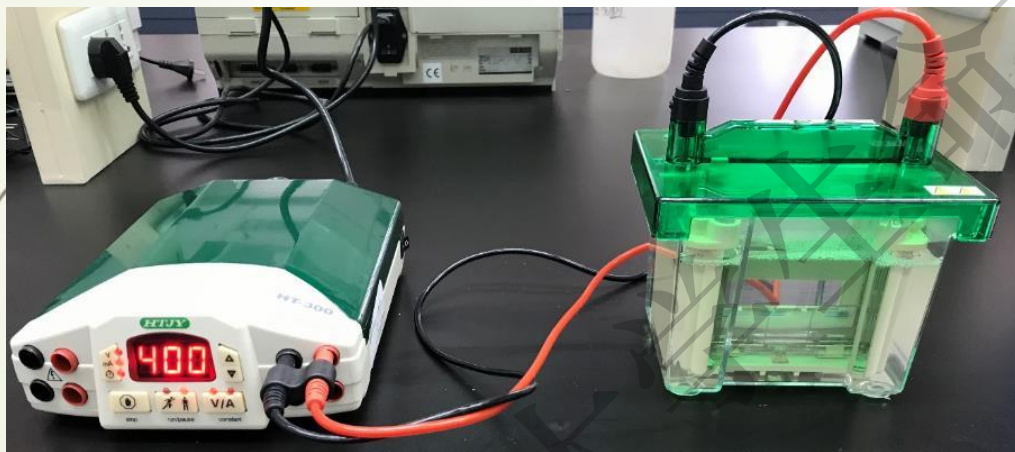
连续系统

- 连续系统是指电泳系统采用相同孔径的凝胶和相同的缓冲系统，进行区带电泳，**利用蛋白质分子的电荷效应进行分离**，凝胶的分子筛效应不明显，一般只用于分离一些比较简单的样品。
- 优点：制胶简单快捷，缓冲系统组成简单。缓冲系统的pH恒定，可以防止样品进胶后因pH变化发生沉淀，
- 缺点：分辨率不高

垂直板电泳

- 垂直板电泳：将配制好的凝胶溶液注入到两块垂直放置的玻璃板之间进行凝胶聚合，然后加样进行电泳。**蛋白质的PAGE电泳主要采用垂直板电泳系统。**
- 聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳是在圆盘电泳的基础上建立的，**优点有：**
 - 1) 表面积大而薄，便于冷却水降低热效应，条带更清晰；
 - 2) 在同一块胶板上，可同时进行10个以上样品的电泳，便于在同一条件下比较分析鉴定；
 - 3) 胶板制作方便，易剥离，样品用量少，分辨率高。可用于分析，也可用于制备；
 - 4) 胶板薄而透明，电泳染色后可制成干胶，便于长期保存及扫描；
 - 5) 可与等电聚焦电泳集合，进行双向凝胶电泳；
 - 6) 可用于蛋白质的免疫印迹及放射自显影分析。

垂直板电泳系统



电泳电源

电泳槽



制胶模具