



生物化学实验

电泳技术

5.1 电泳原理与分类

北京大学 王青松 胡晓倩

概述

- 电泳 (electrophoresis, EP) : 带电颗粒在电场的作用下, 向着与其电性相反的电极方向移动, 这种现象称之为电泳。
- 特点: 电泳具有**设备简单、操作方便、分辨率高等优点**。电泳分离后的生物大分子可进行染色、紫外吸收、放射自显影、生物活性测定, 进行定量比较分析。
- 电泳技术是生物化学、分子生物学等教学科研中不可或缺的重要技术, 也是医学检验、制药、农、林、食品化学等领域中广泛应用且不可缺少的重要手段。

电泳的发展

- 1807年，俄罗斯科学家Reuss最早发现电泳现象。
- 1937年，瑞典科学家Tiselius设计了世界上第一台自由电泳仪，建立了“移界电泳法”，成功将血清蛋白质分成白蛋白， α 1-球蛋白， α 2-球蛋白， β -球蛋白和 γ -球蛋白，共5个主要成分，**由此创建了电泳技术。因此获得1948年诺贝尔奖。**
- 1940年左右：以纸为支持物的电泳问世。

电泳的发展

- 1960s: 发展了以凝胶为主的支持物的电泳方法 (如聚丙烯酰胺凝胶、琼脂糖凝胶电泳等)。
 - 1967年, Shapiro发明SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。
 - 1969年, Weber应用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳技术测定蛋白质相对分子质量。
 - 1970年, Laemmli发明不连续SDS电泳。
- 1970s, 推出了多种电泳模式: 垂直板电泳、等电聚焦电泳、双向电泳、圆盘电泳、脉冲电泳、印迹转移电泳等技术。
- 1990s, 推出了分辨率极高的高效毛细管电泳。

电荷的来源

- 生物大分子如蛋白质、核酸、多糖等都是具有阳离子和阴离子基团的两性离子，常常以带电颗粒形式分散在溶液中，它们所带的净电荷取决于介质的 H^+ 浓度或与其他大分子的相互作用。
- 在电场中，带电的生物大分子会向一定的电极移动，迁移的方向取决于它们的带电性质。
- 蛋白质由氨基酸组成，氨基酸含有可解离的氨基 ($-\text{NH}_3^+$) 和羧基 ($-\text{COO}^-$)，是典型的两性电解质，在一定的pH条件下会解离而带电。
- 蛋白质带电的性质和数量取决于蛋白质分子的性质和溶液的pH及离子强度。

等电点

- 等电点 (isoelectric point, pI) : 在某一pH条件下, 蛋白质分子所带的正电荷数等于负电荷数, 净电荷为0, 蛋白质在电场中不移动, 此时溶液的pH称为该蛋白质的等电点。
 - 溶液的 $pH > pI$, 蛋白质会解离出 H^+ 而带负电荷, 蛋白质分子在电场中向正极移动。
 - 溶液的 $pH < pI$, 蛋白质会结合一部分 H^+ 而带正电荷, 蛋白质分子在电场中向负极移动。

泳动度

- 不同的带电颗粒在同一电场的运动速度不同，其泳动速度用迁移率即泳动度表示。
- 泳动度 (mobility)：是指带电颗粒在单位电场强度下的泳动速度，公式如下：

$$U = \frac{v}{E} = \frac{d/t}{V/l} = \frac{dl}{Vt}$$

- U (也可用m表示)：泳动度 ($\text{cm}^2/\text{V} \cdot \text{s}$)
- v：颗粒泳动速度 (cm/s)
- E：电场强度 (V/s)
- d：泳动距离 (cm)
- l：介质的有效长度 (cm)
- V：实际电压 (V)
- t：通电时间 (s 或 min)

- 泳动度是一个物理常数，可用来鉴定蛋白质及研究它们的某些物理化学性质。

泳动度

- 在电场中，被分离的球形分子所受的力F为：

$$F = Q * E \quad (\text{颗粒所带净电荷量} Q \text{与电场强度} E \text{的乘积})$$

- 根据Stoke定律，球形分子在液体中泳动要受到阻力（摩擦力）F'为：

$$F' = 6\pi r\eta v \quad (\text{式中} r \text{为分子半径，} \eta \text{为介质粘度，} v \text{为分子移动速度})$$

- 当分子运动平衡作稳定运动时： $F = F'$ 则： $QE = 6\pi r\eta v$

- 因 $U = \frac{v}{E}$ ，因此：

$$U = \frac{Q}{6\pi r\eta}$$

因此，泳动度与球形分子半径、介质粘度、颗粒所带电荷相关。

电泳分类

按分离原理 分类

- 区带电泳
- 移界电泳
- 等速电泳
- 等电聚焦

按有无固体 支持物分类

- 自由电泳
- 支持物电泳

按支持物的装 置形式分类

- 平板式电泳
- 垂直板电泳
- 柱状（管状）
电泳

按电泳电压 分类

- 常压电泳
- 高压电泳

按分离原理分类

- **区带电泳：**电泳过程中，不同的离子成分在均一的缓冲液体系中分离成独立的区带，是目前应用最广泛的电泳技术。
- **移界电泳：**是Tiselius最早建立的电泳，在U形管中进行，由于分离效果较差，已被其它方法取代。
- **等速电泳：**需专用电泳仪，电泳达到平衡后，各组分的区带相随并形成清晰的界面，并以等速移动。
- **等电聚焦电泳：**具有不同等电点的两性电解质载体在电场中形成pH梯度，使被分离物电泳移动至各自等电点的pH处聚集成很窄的区带，特点是分辨率高。

按有无固体支持物分类

- **自由电泳：**在溶液中进行电泳，无固体支持物。包括：显微电泳、移界电泳、柱电泳、自由流动幕电泳、等速电泳等。
- **支持物电泳：**需要固体支持物作为电泳的支持介质，是目前应用最多的电泳方法。固体支持物包括滤纸、醋酸纤维薄膜、琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶等。

按支持物的装置形式分类



- 平板式电泳装置：主要用于核酸的琼脂糖凝胶电泳。
- 垂直板电泳装置：主要用于蛋白质的SDS-PAGE电泳。

按电泳电压分类

- **常压电泳：**电压在**100~500V**，产热量小，室温下电泳分离不会破坏蛋白质样品，无需冷却装置，但是一般分离时间长。
- **高压电泳：**电压在**500~1000V或更高**。电压高，因此电泳时间短，有的样品需数分钟电泳即可。适合低分子化合物，如氨基酸和无机离子的分离。
- **缺点：**电压高，产热量大，热量大会导致蛋白质的变性影响分离，且发热会引起缓冲液中水分蒸发过多，支持物上（滤纸或凝胶等）离子强度增加，以及引起虹吸现象（电泳槽内液被吸到支持物上）等。因此，高压电泳**必须配有冷却装置**。