

等电聚焦电泳法测定蛋白质的等电点

实验原理

等电聚焦 (Isoelectric focusing, 简称 IEF) 是六十年代中期出现的新技术。近年来等电聚焦技术有了新的进展, 已迅速发展成为一门成熟的近代生化实验技术。目前等电聚焦技术已可以分辨等电点 (pI) 只差 0.001pH 单位的生物分子。由于其分辨力高, 重复性好, 样品容量大, 操作简便迅速, 在生物化学、分子生物学及临床医学研究中得到广泛的应用。

蛋白质分子是典型的两性电解质分子。它在大于其等电点的 pH 环境中解离成带负电荷的阴离子, 向电场的正极泳动, 在小于其等电点的 pH 环境中解离成带正电荷的阳离子, 向电场的负极泳动。这种泳动只有在等于其等电点的 pH 环境中, 即蛋白质所带的净电荷为零时才能停止。如果在一个有 pH 梯度的环境中, 对各种不同等电点的蛋白质混合样品进行电泳, 则在电场作用下, 不管这些蛋白质分子的原始分布如何, 各种蛋白质分子将按照它们各自的等电点大小在 pH 梯度中相对应的位置处进行聚焦, 经过一定时间的电泳以后, 不同等电点的蛋白质分子便分别聚焦于不同的位置。这种按等电点的大小, 生物分子在 pH 梯度的某一相应位置上进行聚焦的行为就称为“等电聚焦”。等电聚焦的特点就在于它利用了一种称为两性电解质载体的物质在电场中构成连续的 pH 梯度, 使蛋白质或其他具有两性电解质性质的样品进行聚焦, 从而达到分离、测定和鉴定的目的。

两性电解质载体，实际上是许多异构和同系物的混合物，它们是一系列多羧基多氨基脂肪族化合物，分子量在 300~1000 之间。常用的进口两性电解质为瑞典 Pharmacia-LKB 公司生产的 Ampholine 和 Pharmalyte，价格昂贵。国产的有中国军事医学科学院放射医学研究所和上海生化所生产的两性电解质，价格便宜，质量尚佳。两性电解质在直流电场的作用下，能形成一个从正极到负极的 pH 值逐渐升高的平滑连续的 pH 梯度。若不同的 pH 值的两性电解质的含量与 pI 值的分布越均匀，则 pH 梯度的线性就越好。对 Ampholine 两性电解质的要求是缓冲能力强，有良好的导电性，分子量要小，不干扰被分析的样品等。

在聚焦过程中和聚焦结束取消了外加电场后，如保持 pH 梯度的稳定是极为重要的。为了防止扩散，稳定 pH 梯度，就必须加入一种抗对流和扩散的支持介质，最常用的这种支持介质就是聚丙烯酰胺凝胶。当进行聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳时，凝胶柱内即产生 pH 梯度，当蛋白质样品电泳到凝胶柱内某一部位，而此部位的 pH 值正好等于该蛋白质的等电点时，该蛋白质即聚焦形成一条区带，只要测出此区带所处部位的 pH 值，即为其等电点。电泳时间越长，蛋白质聚焦的区带就越集中，越狭窄，因而提高了分辨率。这是等电聚焦的一大优点，不像一般的其他电泳，电泳时间过长则区带扩散。所以等电聚焦电泳法不仅可以测定等电点，而且能将不同等电点的混合的生物大分子进行分离和鉴定。

早期的等电聚焦电泳是垂直管式的，其特点是体系是封闭的，不与空气接触，可防止样品氧化。近年来，又发展了超薄层水平板式等电聚焦电泳。此法的优点是加样数量

多，节省两性电解质，电泳后固定、染色、干燥都十分迅速简便，其最大优点是防止了电极液的电渗作用而引起正负两极 pH 梯度的漂变。

测定 pH 梯度的方法有四种：

1. 将胶条切成小块，用水浸泡后，用精密 pH 试纸或进口的细长 pH 复合电极测定 pH 值，然后作图。
2. 用表面 pH 微电极直接测定胶条各部分的 pH 值，然后作图。
3. 用一套已知不同的 pI 值的蛋白质作为标准，测定 pH 梯度的标准曲线。
4. 将胶条于 - 70℃冰冻后切成 1mm 的薄片，加入 0.5ml 0.01M KCl，用微电极测其 pH。

仪器和用具

1. 电泳仪
2. 垂直管式园盘电泳槽一套
3. 注射器与针头
4. 移液管：10ml、5ml、2ml、1ml、0.1ml
5. 小烧杯若干
6. 培养皿一套
7. 直尺
8. 小刀
9. 精密 pH 试纸和带细长复合 pH 电极的 pH 计

10. 塑料薄膜和橡皮筋

试剂

1. 丙烯酰胺
2. 甲叉双丙烯酰胺
3. 两性电解质 Ampholine (40%, pH3.5~9.5)
4. 过硫酸胺 (催化剂)
5. TEMED (四甲基乙二胺) (加速剂)
6. 磷酸
7. NaOH
8. 三氯乙酸 (TCA)

溶液配制

1. 丙烯酰胺贮液 (30%丙烯酰胺, 交联度 2.6%):, 30g 丙烯酰胺和 0.8g 甲叉双丙烯酰胺溶于 H_2O , 定容至 100ml, 滤去不溶物后存于棕色瓶, 4°C可保存数月。(全班公用) (另一配方为 29.1g 丙烯酰胺和 0.9g 甲叉双丙烯酰胺溶于 H_2O , 定容至 100ml, 交联度为 3.0%)。
2. 两性电解质 Ampholine (40%) 的加入量为: 50 μ l /ml 胶液。
3. 过硫酸胺: 配成 1mg/ml 的浓度, 当天配制, 配 100ml 全班公用。胶液中的加入量为 0.5mg/ml 胶液。
4. TEMED: 胶液中的加入量为 1 μ l/ml 胶液。

5. 蛋白质样品：选用两种等电点相差较大的蛋白质，每根垂直管中每种蛋白质的加样量控制在<100μg。蛋白质样品配制成各为 5mg/ml 的浓度。配 2.5ml 全班公用。

6. 固定液：10%的三氯乙酸，每组配 50ml。

7. 阳极电极液：0.1M H₃PO₄

3.4ml 浓磷酸（85%）加 H₂O 至 500ml，每个电泳槽用 500ml。

8. 阴极电极液：0.5M NaOH

2g NaOH 加 H₂O 溶解至 500ml，每个电泳槽用 500ml。

操作步骤

1. 配胶

胶浓度	5.0%	4.8%	5.0%
胶液总体积	8ml	10ml	12ml
丙烯酰胺贮液	1.33ml	1.60ml	2.0ml
Ampholine	0.40ml	0.50ml	0.60ml
TEMED	0.008ml	0.010ml	0.012ml
蛋白质样品	0.080ml	0.100ml	0.120ml
H ₂ O	2.26ml	2.79ml	3.27ml
过硫酸铵(1mg/ml)	4.0ml	5.0ml	6.0ml
装管数	4 支	5 支	6 支

$$\text{胶浓度} T = \frac{\text{丙烯酰胺贮液浓度} \times \text{贮液加入量}}{\text{胶液总体积}} \times 100\%$$

$$\text{交联度} C = \frac{\text{胶液中甲叉双丙烯酰胺的量} b}{\text{胶液中丙烯酰胺的量} a + \text{甲叉双丙烯酰胺的量} b} \times 100\%$$

$$\text{交联度}C = \frac{0.8}{30 + 0.8} \times 100\% = 2.6\%$$

过硫酸铵是胶聚合的催化剂，因此最后加入，加毕，立即摇匀，因胶很快就会聚合，必须立即装管。通常化学聚合的胶液，需在过硫酸铵加入前进行减压抽气处理，本实验将此抽气步骤省略并不影响实验结果。

2. 装管

每个学生装两支管，每组装四支。先用肥皂洗手，然后将圆盘电泳槽的玻璃管洗净，底端用塑料薄膜和橡皮筋封口，垂直放在试管架上，用移液管将配好的胶液移入管内，（每根玻璃管的容量约为 1.5~1.8ml），液面加至距管口 1mm 处，用注射器轻轻加入少许 H₂O，进行水封，以消除弯月面使胶柱顶端平坦。胶管垂直聚合约 30 分钟，聚合完成时可观察到水封下的折光面。

3. 装槽和电泳

用滤纸条吸去胶管上端的水封，除去下端的薄膜，水封端向上，将胶管垂直插入圆盘电泳槽内，调节好各管的高度，记下管号。每支管约 1/3 在上槽，2/3 在下槽。上槽加入 500ml 0.1M H₃PO₄，下槽加入 500ml 0.1M NaOH，淹没各管口和电极，用注射器或滴管吸去管口的气泡。上槽接正极，下槽接负极，开启电泳仪，恒压 160V，聚焦 2 至 3 小时，至电流近于零不再降低时，停止电泳。

4. 剥胶

取下胶管，用 H_2O 将胶管和两端洗 2 次，用注射器沿管壁轻轻插入针头，在转动胶管和内插针头的同时分别向胶管两端注入 H_2O 少许，胶条即自行滑出，若不滑出可用洗耳球轻轻挤出。胶条置于小培养皿内，记住正极端为“头”，负极端为“尾”，若分不清时，可用 pH 试纸鉴定，酸性端为正，碱性端为负。

5. 固定

取 2 支胶条置于一个小培养皿内，倒入 10% 三氯乙酸溶液至没过胶条，进行固定，约半小时后，即可看到胶条内蛋白质的白色沉淀带。固定完毕，倒出固定液，用直尺量出胶条长度“ L_2 ”和正极端到蛋白质白色沉淀带中心（即聚焦部位）的长度“ L' ”。固定后的胶条可在康强 860 紫外/可见分光光度计上用 280nm 或 238nm 波长作凝胶扫描，然后用扫描图作相应的测量和计算。

6. 测定 pH 梯度

将放在另一个培养皿内未固定的胶条，用直尺量出待测 pH 胶条的长度“ L_1 ”。按照由正极至负极的顺序，用镊子和小刀依次将胶条切成 10mm 长的小段，分别置于小试管中，加入 1ml H_2O ，浸泡半小时以上或过夜，用仔细校正后的带细长 pH 复合电极的 pH 计测出每管浸出液的 pH 值。

数据处理

1. 以胶条长度（mm）为横坐标，pH 值为纵坐标作图，得到一条 pH 梯度曲线。所测每管的 pH 值为 10mm 胶条的 pH 的混合平均值。作图时将此 pH 值取为 10mm

小段中心即 5mm 处的 pH 值。

2. 用下式计算蛋白质聚焦部位至胶条正极端的实际长度 L :

$$L = L' \times \frac{L_1}{L_2}$$

上式中: L' ——量出蛋白质的白色沉淀带中心至胶条正极端的长度。

L_1 ——测 pH 的胶条的长度

L_2 ——固定后胶条的长度

3. 根据计算出的 L , 由 pH 梯度曲线上查出相应的 pH 值, 即为该蛋白质的等电点。

4. 画出固定后所测胶条的示意图。

附注

1. 对两性电解质的要求

两性电解质是等电聚焦的关键试剂, 所以对两性电解质的质和量都要特别注意。两性电解质含量以 2% ~ 3% 较适合, 能形成好的 pH 梯度。由于载体两性电解质是由多乙烯多胺与丙烯酸进行加成反应生成的混合物, 防止时间过长会分菌, 分解变质, 不能使用。

2. 指教注意的问题

- (1) 丙烯酰胺最好是重结晶的。
- (2) 过硫酸铵一定要新配制。

(3) 所有水要用双蒸水。

(4) 制胶时，玻璃板和模板必须水平放置。

(5) 模板要平直光滑，不然灌胶时易溅漏。

3、防止烧胶

(1) 平板等点聚焦电泳的胶很薄 (0.6mm)，当问柳在 8mA 时，电压可上升到 550V 以上，由于阴极飘移，造成局部电流过大，胶承受不了而被烧断。

(2) 防止烧胶的办法：注意观察，稳流 8mA，电压上升到 550V 时，立即关电源。用恒功率电泳仪，控制输出功率在指定范围。在一定功率范围内，改进冷却条件，使因电流产生的热量及时散去。

(3) 如果胶被烧了，可在烧断的位置换上一条宽的电极条压过断缝或在电源电极条内侧加一电极条，以此补救。

4.搅拌制作注意事项

固定液可使蛋白质变性，不再扩散，故一定要多换一次；在电泳后取胶、固定、染色直至制干胶板都必须仔细，防止胶被损坏。