

聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦测定蛋白质等电点

一、实验目的

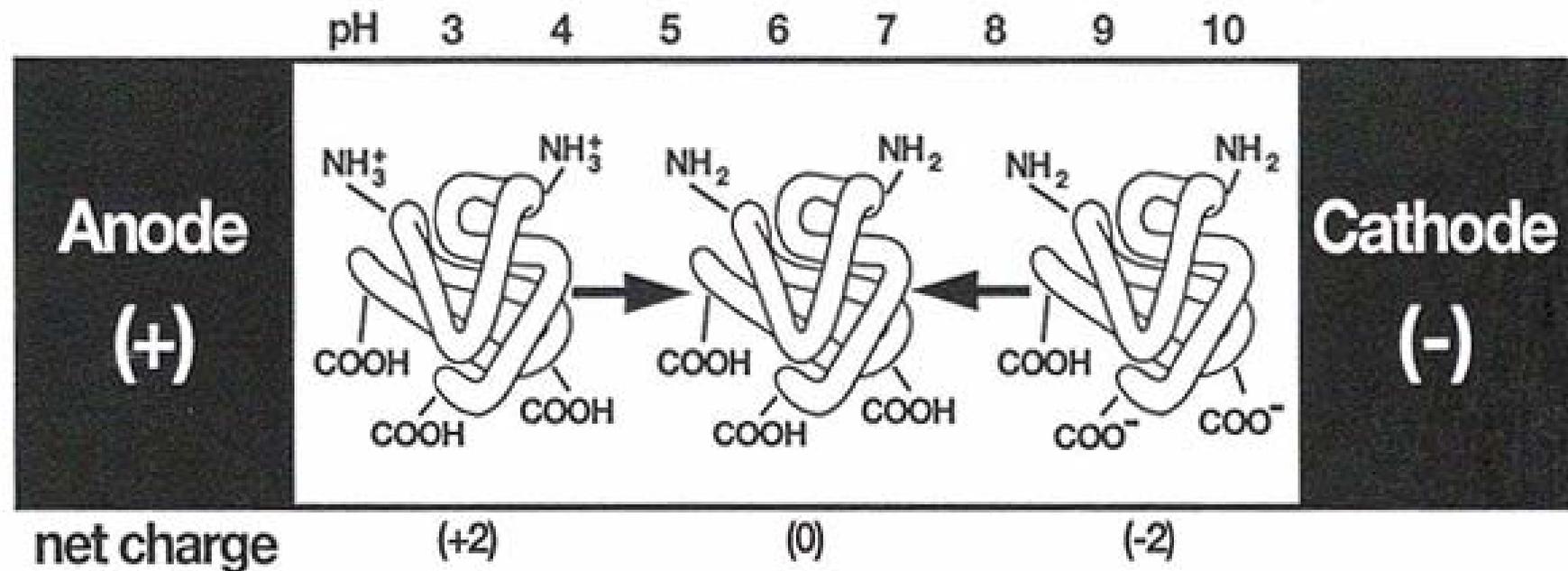
- 学习等电聚焦的原理
- 掌握聚丙烯酰胺凝胶垂直管式等电聚焦电泳技术

二、实验原理

- 聚丙烯酰胺等电聚焦电泳 (Isoelectric Focusing-PAGE, 简称IEF-PAGE): 通过蛋白质等电点的差异而分离蛋白质的电泳方法。(分辨率: 0.001pH单位) ▶
- 以聚丙烯酰胺凝胶为电泳支持物。
- 两性电解质载体(carrier ampholyte) 在电场作用下, 按各自pI形成从阳极到阴极逐渐增加的线性pH梯度。▶
- 蛋白质在pH梯度凝胶中泳动, 当迁移至pH值等于pI处时, 不再泳动, 而被浓缩成狭窄的区带。——pI、分离、鉴定 ▶

等电点 (isoelectric point) :在某一pH时, 蛋白质的净电荷为零。

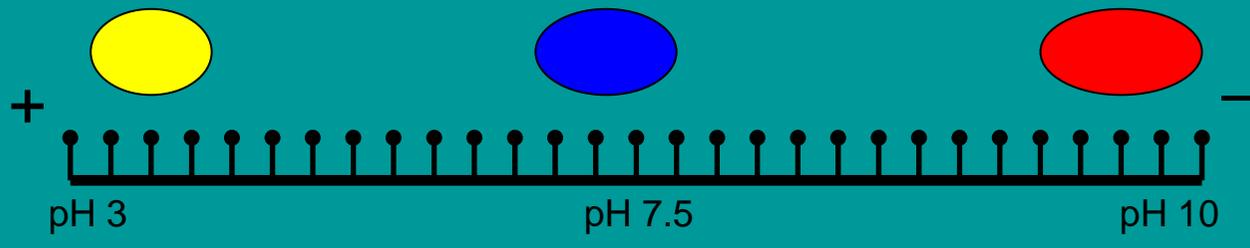
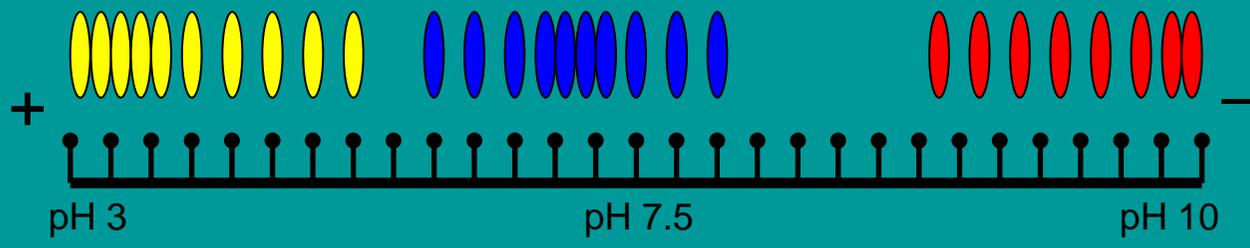
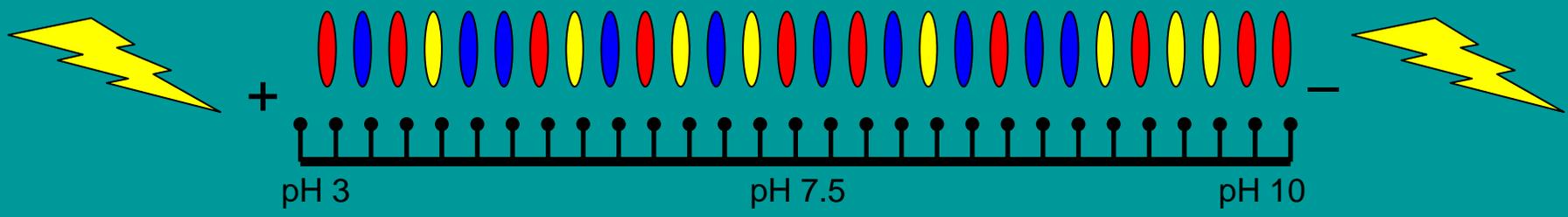
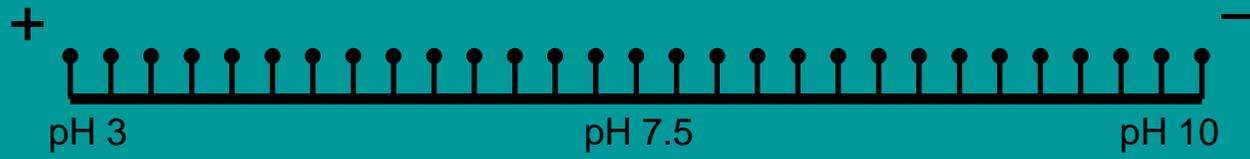
蛋白质的等电点取决于它的氨基酸组成和构象

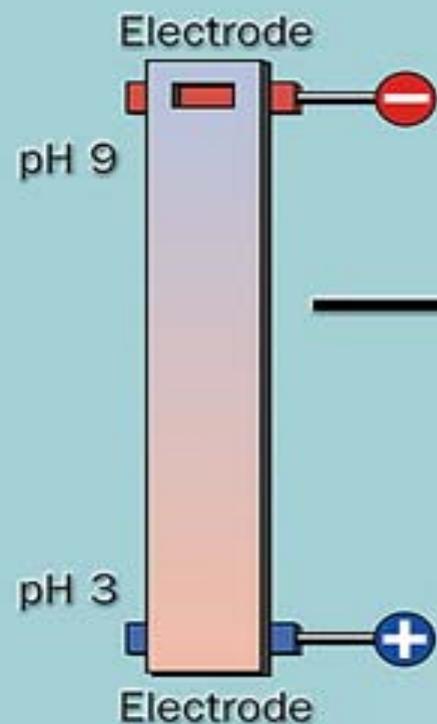


两性电解质载体

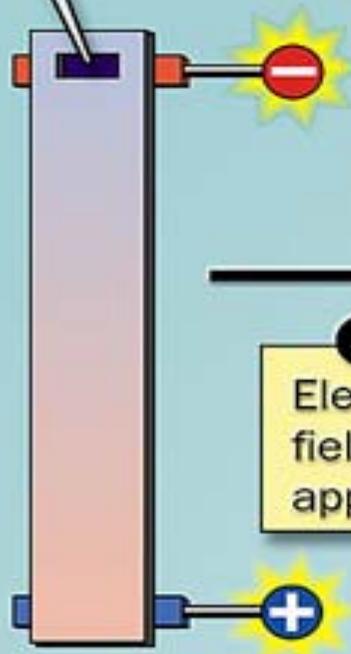
- 易溶于水，在pI处应有足够的缓冲能力，形成稳定的pH梯度。
- pI处有良好的电导系数——保持均匀的电场。
- 分子量小，可通过透析或分子筛法除去，便于与生物大分子分开。
- 化学性能稳定，与被分离物不起化学反应，也无变性作用，其化学组成不同于蛋白质。
- 多羧基、多氨基脂肪族化合物异构物/同系物之混合物





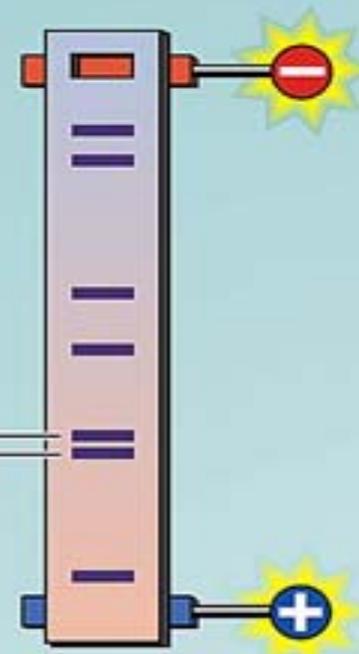


1
Application of an electric current establishes a stable pH gradient in a solution in a gel.



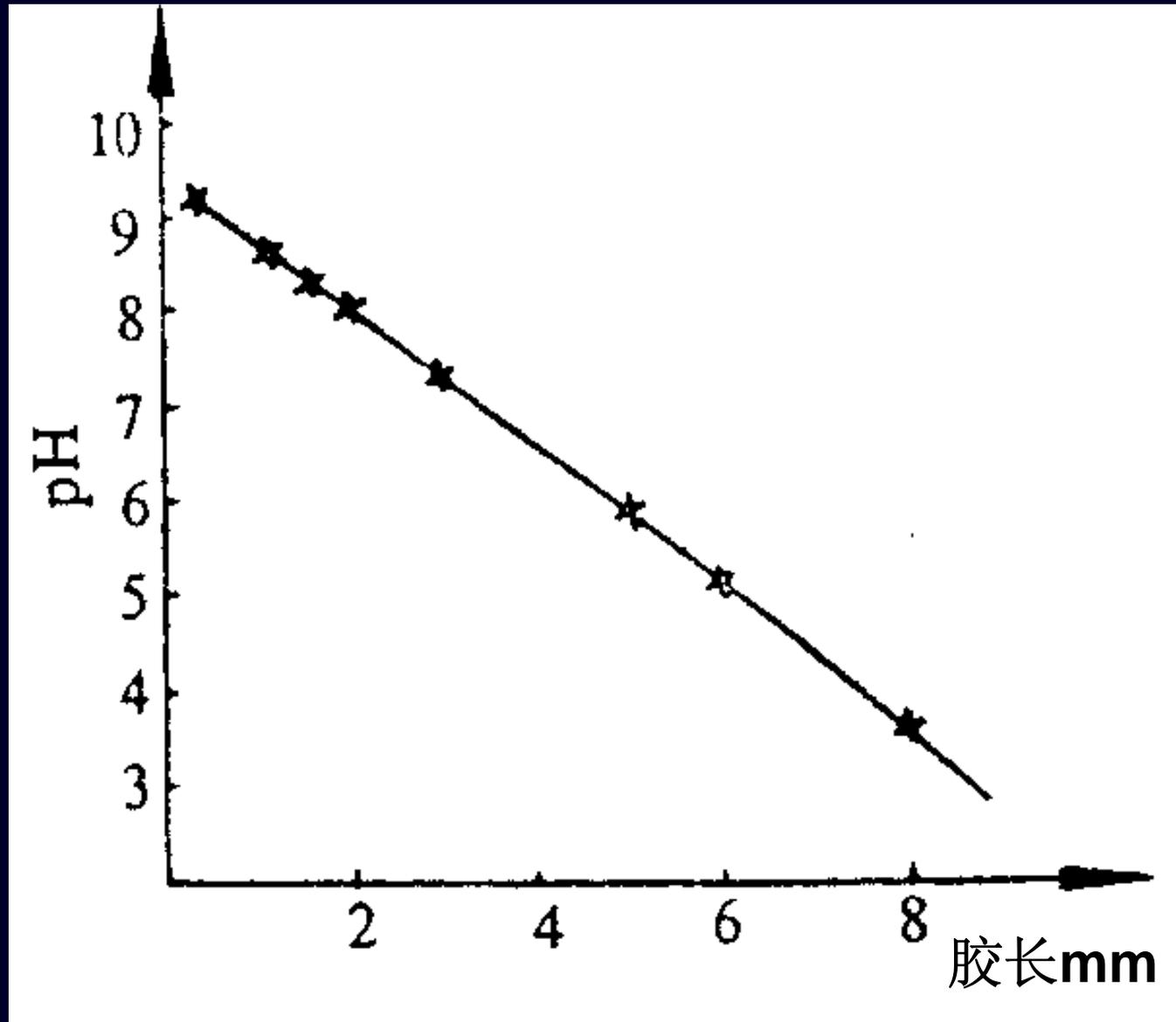
2
Protein sample added

3
Electric field applied



4
Proteins move to their specific isoelectric points (pI). Proteins with the same pI can be separated further by gel electrophoresis.

IEF-PAGE分离蛋白质并测定pI



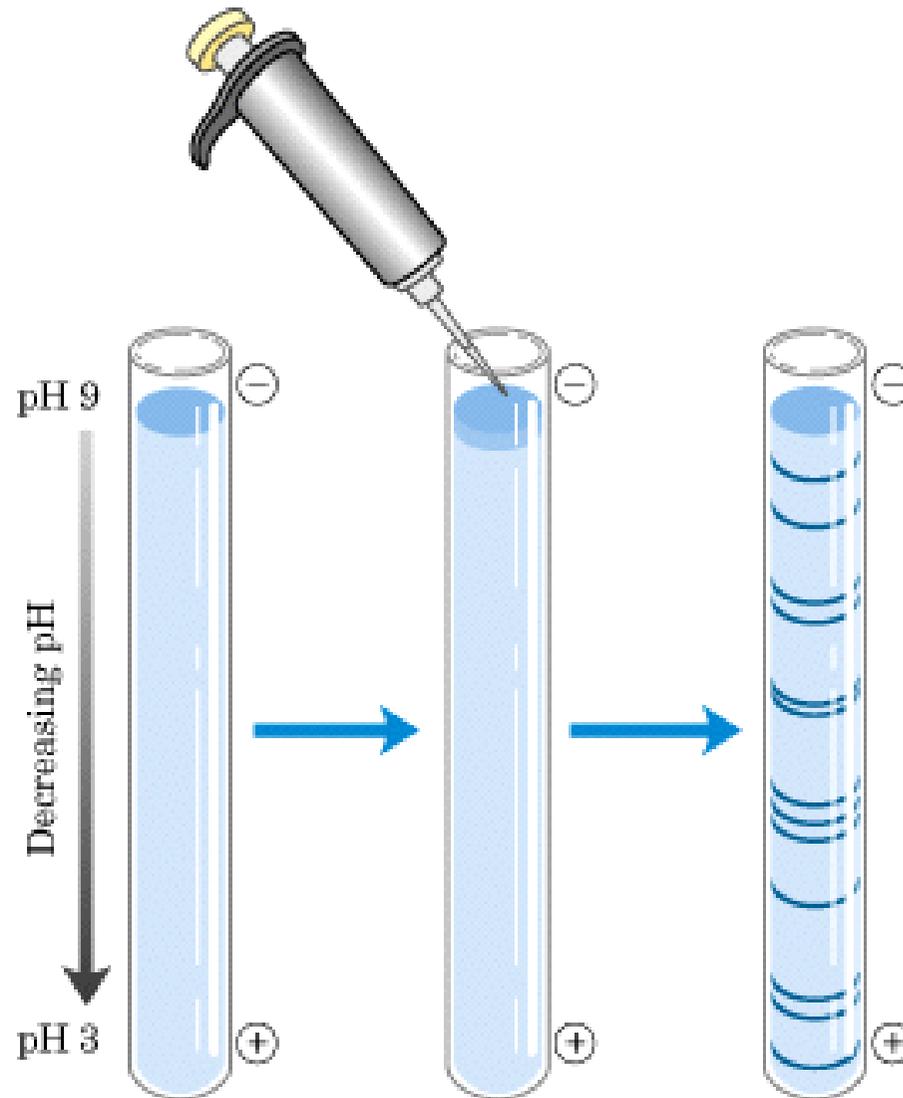
测定pH梯度的主要方法

- 胶条切段、水浸、精密试纸测定
- 表面pH微电极直接测定
- 一套已知pI蛋白作标准
- 胶条-70℃冰冻，1mm切片，0.5ml 0.01mol/L KCl，
微电极测pH

圆盘电泳装置



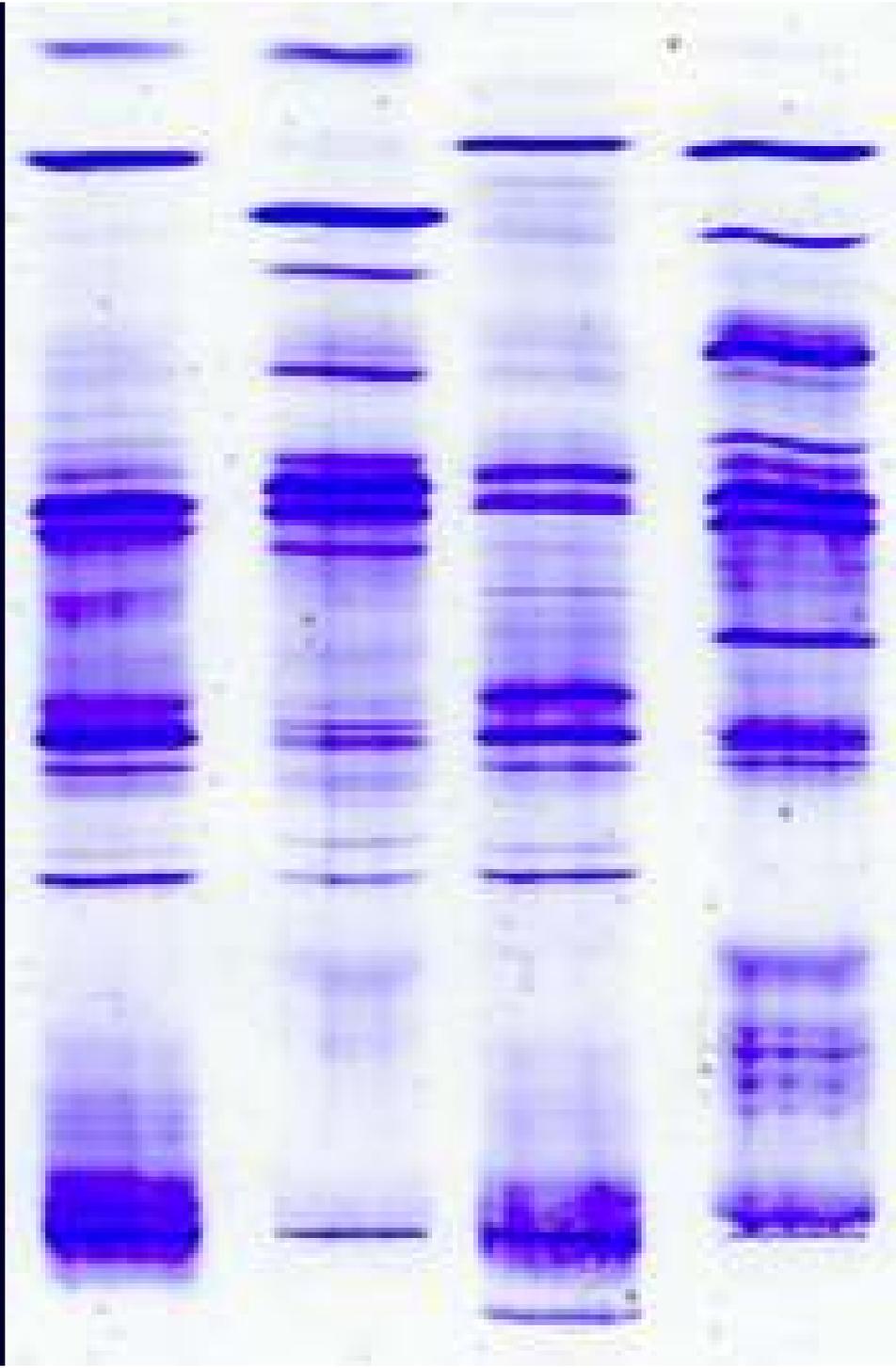
An ampholyte solution is incorporated into a gel.



A stable pH gradient is established in the gel after application of an electric field.

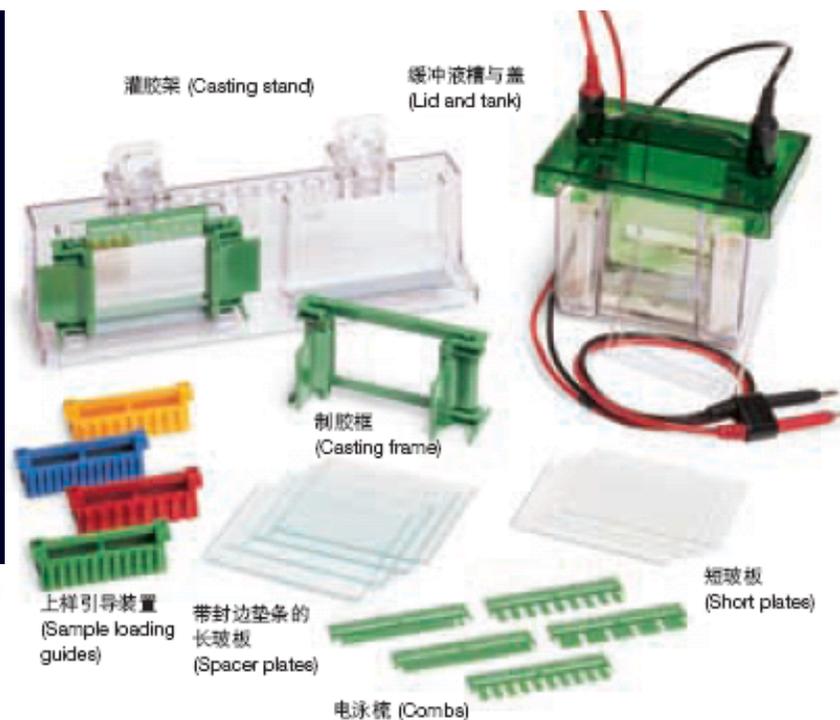
Protein solution is added and electric field is reapplied.

After staining, proteins are shown to be distributed along pH gradient according to their pI values.



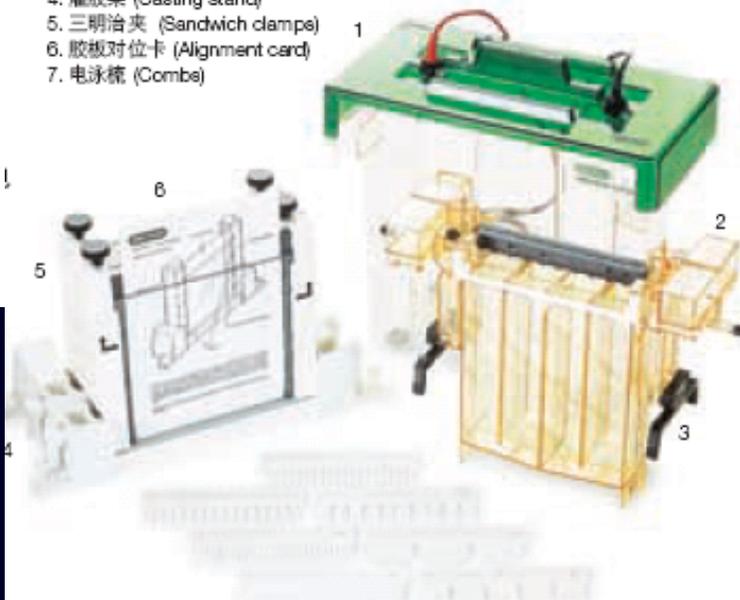
双向电泳

——蛋白质组学研究的重要技术



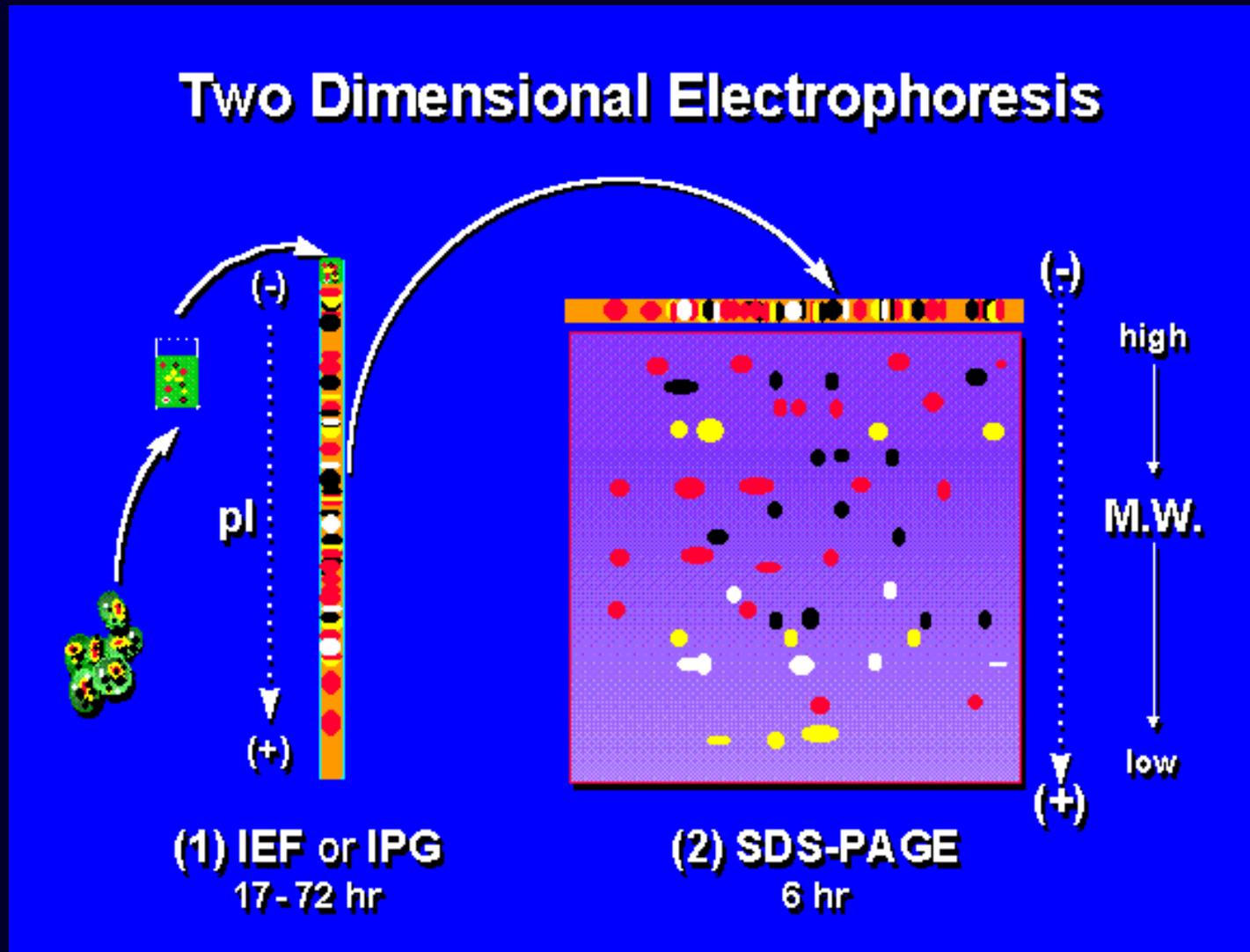
PROTEAN II xi 系统组件

1. 电泳槽及盖 (Tank and lid)
2. 中央制冷芯 (Central cooling core)
3. 托架 (黑色) (Latch (black))
4. 灌胶架 (Casting stand)
5. 三明治夹 (Sandwich clamps)
6. 胶板对位卡 (Alignment card)
7. 电泳梳 (Combs)



双向凝胶电泳two-dimensional electrophoresis

IEF——SDS-PAGE相结合的电泳技术





三、实验操作

➤ 装管（封底）

➤ 制胶（7.5ml）：

14%凝胶贮液 2.5ml

H₂O 4.6ml

Ampholyte（40%）pH3-10 0.38ml

10%Ap 0.03ml

TEMED 0.03ml

➤ 灌胶（水封）

- 移除封底胶管
- 加样：空白；牛血清白蛋白（10mg/ml, 30 μ l）；牛胰RNase（10mg/ml, 30 μ l）；混合（各30 μ l）
- 样品保护液
- 电泳：12mA 20min，恒压120V 至电流为0。
上槽——负极(NaOH)；下槽——正极 (H_3PO_4)
- 标记、取胶、测长
- 三氯醋酸固定
- 空白切段水浸（1ml H_2O /0.5cm）过夜
- 测定各管pH，绘制标准曲线
- 计算样品pI