

# 等电聚焦

等电点聚焦就是在电泳槽中放入载体两性电解质，当通以直流电时，两性电解质即形成一个由阳极到阴极逐步增加的 pH 梯度，当蛋白质放进此体系时，不同的蛋白质即移动到或聚焦于与其等电点相当的 pH 位置上，电聚焦的优点是：有很高的分辨率，可将等电点相差 0.01-0.02pH 单位的蛋白质分开；一般电泳由于受扩散作用的影响，随着时间和所走的距离加长，区带越走越宽，而电聚焦能抵消扩散作用，使区带越走越窄；由于这种电聚焦作用，不管样品加在什么部位，都可聚焦到其电点，很稀的样品也可进行分离；可直接测出蛋白质的等电点，其精确度可达 0.01pH 单位。电聚焦技术的缺点是：一是电聚焦要求用无盐溶液，而在无盐溶液中蛋白质可能发生沉淀，二是样品中的成分必需停留于其等电点，不适用在等电点不溶或发生变性的蛋白质。

电聚焦技术要求有稳定的 pH 梯度，要求极防止对流和防止已分离区带再混合的措施，其办法有三：密度梯度，聚丙烯酰胺凝胶和区带对流聚焦，以第一种方法为常用。

## 一、基本原理

(1) 人工 pH 梯度：在分离蛋白质时常用一个直立的性，以蔗糖密度梯度防止对流。当两个不同 pH 的缓冲液互相扩散时，在其混合区间即形成 pH 梯度，称为“人工 pH 梯度”。因为缓冲液是电解质，在电场中的它的离子移动会引起 pH 梯度的改变，所以不稳定。

(2) 天然 pH 梯度：这种梯度是由电流本身所引起并保持的，比较稳定，其形成过程是，当电解硫酸钠的稀溶液时，在阳极聚焦硫酸而在阴极聚焦氢氧化钠。若将一些两性电解质放入槽中，则它们在阳极的酸性介质中就会得到质子而带正电，在阴极的碱性介质中则失掉质子而带负电，这样就会受其附近的电极所排斥而向相反方向移动。设其中有一个酸性最强的两性电解质（甲），当它由阴极逐渐接近阳极的硫酸时，就会失去电荷而停止运动，（甲）所在的位置就是它的等电点，另有一个等电点稍高于（甲）的物质（乙），当向阳极运动靠近（甲）时，它不能超过（甲），因为那里低于它的等电点。于是（乙）将带正电荷而向阴极移动，它只能排要（甲）的阴极侧。假如有很多两性电解质，它们就会按照等电点由低到高的顺序依次排列，形成一个由阳极向阴极逐步升高的平稳的 pH 梯度，

此梯度的进程取决于两性电解质的 pH 值，浓度和缓冲性质。防止对流的情况下，只要电流稳定，这个 pH 梯度将保持不变。

(3) 两性电解质互相分离的条件：上述经验甲乙两物质形成两个相邻的不同 pH 的等电点层，因为在它们中间不能形成纯水层，所以它们不是完全分离开的，中间部分互相扩散，互相粘连。要使两物质完全分开，中间必须有一个介于其间 pH 值的物质，例如，当甲乙两物质的 pH 值正好一个在 7 以下，一个在 7 以上，即可以分开，因为中间形成了纯水层 (pH=7)，这时水是作为一个两性电解质而存在。

(4) 蛋白质的电聚焦分离：蛋白质及多肽是两性电解质，它们比氨基酸更适于电聚焦，因为它们在等电点附近仍有电荷而能进行电迁移，大部分中性氨基酸在接近等电点时就失去电荷而停止运动，不能过到真正的等电点。但在没有第三种居间两性电解质存在时也不能将两种蛋白质完全分开，必须有很多不同 pH 值的是电解质（载体两性电解质）才能解决这个问题。

## 二、载体两性电解质

(1) 载体两性电解质必需具备的条件：

(i) 在等电点处必需有足够的缓冲能力，以便能控制 pH 梯度，而不致被样品蛋白质或其他两性物质的缓冲能力改变 pH 梯度的进程。

(ii) 在等电点必需的足够高电导，以便使一定的电流通过，而且要求具备不同 pH 值的载体有相同的电导系数，使整个体系中的电导均匀，如果有局部电导过小，就会产生极大的电位降，从而其他部分电压就会太小，以致不能保持梯度，也不能使应聚焦的成分进行电迁移，达到聚焦。

(iii) 分子量要小，便于与被分离的高分子物质用透析或凝胶过滤法分开。

(iv) 化学组成应不同于被分离物质，不干扰测定。

(v) 应不与分离物质反应或使之变性。总起来说，当一个两性电解质的等电点介于两个很近的 pK 值之间时，它在等电点的解离度大，缓冲能力强，而且电导系数高，这就是好的载体两性电解质。

(2) 理想的载体两性电解质的合成：

用具有几个 pH 值很相近的多乙烯多胺（如五乙烯六胺）为原料，与不饱和酸（如丙烯酸）发生加合反应：加合反应优先加在  $\alpha$ 、 $\beta$  饱和酸的  $\beta$  碳原子上，调节胺和酸的比例可以加上一个或多个羧基，这种合成方法与一般有机会合成不同，有机合成一般要求合成的产物愈纯愈好，而这里要求合成出的产物愈复杂愈好，要有多异构物和同系物，以保证的很多具有不同而又互相接近的 pK 值和 pI

值，从而得到平滑的 pH 梯度。载体两性电解质的等电点在 pH3-10 的范围，分子量在 300-1000 之间，它们的缓冲能力等于或优于组氨酸，电导性能良好，可以使电场强度分布较均匀，它们的水溶性良好，在 1%水溶液中的紫外吸收值（260 $\mu$ m）很低。

### 三、密度梯度等电点聚焦

#### （一）密度梯度

密度梯度是用以防止对流保持 pH 梯度，避免已分离物质再混合的重要措施则由重溶液和轻溶液以梯度混合形成。用做密度梯度的溶质应具有以下条件：溶解度高，粘度低；密度大，得到的密度差不低于 0.12 克/厘米<sup>3</sup>，不与样品蛋白质起反应，不解离。最常用的是蔗糖（分析纯），它对蛋白质不仅无害还有保护作用。重溶液含蔗糖 50%（W/V），这时柱上和柱下最大密度差为 0.2 克/厘米<sup>3</sup>，浓度太高则粘度过大适用。蔗糖在高 pH 值时会分解，影响 pH 梯度及 pI 值测定，这种情况下可改用甘油，也可用甘露醇，山梨醇，右旋糖酐等。

#### （二）pH 梯度的选择

在测定未知蛋白时，可先采用 pH3-10 的载体，经初步测定后改用较窄的以提高分辨率，在使用 pH7 以上或以下范围时，因缺少中性载体，在聚焦过程中载体与电极之间在 pH7 部位就会形成纯水区带，纯水的电导极低，必须避免此现象。凡使用离开中性的 pH 范围的载体时应加入相当于 0.1 载体量的 pH6-8 或 pH3-10 的载体。在用 pH 低于 3 的范围时，可加有机酸如一氯醋酸，二氯醋酸，甲酸，乙酸，pH 离于 10 时，可补加胺使 pH 增加到 11。载体在 pH6 附近电导较低，可以与蔗糖密度梯度互相补偿，蔗糖浓度高时电导低，所以可把 pH6 电导低部位放在柱上部，也就是用 pH6 以下范围时，阴极在上，而用 pH6 以上范围时，阳极在上方。

#### （三）蛋白质样品及分离容量

电聚焦有高的分辨力，一般样品不需提纯，分析上可用来测定混合物中某一成分的相对比例：如大量提纯蛋白质，则应预先初步提纯。有些物质（如核酸）聚焦时会沉淀，应预先除去。蛋白质应不含盐，因盐浓度高电流大，易发热，而且盐离子迁移至两极产生酸碱，占据了分离的有效部位。加样体积不受限制，最高可达 80-85 毫升。等电点聚焦的分离容量受下列几个因素影响：聚焦后每一区带的蛋白量取决于密度梯度所能支持的蛋白质，提高密度可以提高分离容量；容量与区带高度的平方成正比，降低电压可使区带变宽，提高容量，但分辨

率降低，聚焦时间长，用窄的 pH 梯长范围可以使区带变宽，提高分辨率。用 10 毫升柱时，每一区带蛋白质含量最高可达 20-25 毫克，由于粗蛋白样品可分为很多区带，所以总量可以加至几百毫克；分离的容量与柱的横截面成正比，用 440 毫克柱时，可加粗蛋白质 5 克，每一区带可达一克。

地址：杭州市西湖科技园西园八路 11 号

邮编：310030

售后服务专线：400-672-1817

销售电话：0571-86056609 86059660

86054117 86055117

传真：0571-86059660 86823529

网址：[www.top17.net](http://www.top17.net)