**电泳**

电泳是带电颗粒在电场作用下，向着与其电荷相反的电极移动的现象。

在一定pH条件下，每一种分子都具有特定的电荷（种类和数量）、大小和形状，在一定时间内它们在相同电场中泳动速度不同，各自集中到特定的位置上而形成紧密的泳动带。这就是带电粒子可以用电泳技术进行分离、分析和鉴定的基本原理。



带电颗粒在电场中泳动的速度称迁移率或泳动度。

 电泳时，带电颗粒（球形）在介质中受力平衡匀速运动，则有：

*v = F*阻/*f = FE*/*f = E·q*/*f = E·q*/(*6π·r·η*)

 *v* — 泳动度 F阻 — 颗粒所受阻力

 E — 电场强度 q — 颗粒所带电荷

 r — 颗粒半径 η — 介质黏度

 *FE* — 颗粒所受电场力 *f* — 摩擦系数

由上式可见：泳动度与球形分子半径、介质粘度、颗粒所带电荷以及电场强度有关。

非球形分子（如线状DNA）在电泳过程中受到更大的阻力，即粒子的泳动度与粒子形状有关。

**影响泳动度的因子**

电场强度

溶液的性质

颗粒的性质

电渗

焦耳热

支持物

1. 电场强度：

电场强度是指每厘米的电位降，也称电位梯度(电势梯度)。电场强度越高，则带电颗粒泳动越快。根据电场强度的不同，电泳可分为：

* + 常压(100-500V)电泳。其电场强度为2-10V/cm。分离时间较长，从数小时到数十小时 ，适合于分离蛋白质等大分子物质。
	+ 高压(2000-10000V)电泳。其电场强度为50-200V/cm，电泳时间很短，有时只需几分钟。多用于分离氨基酸、多肽、核苷酸、糖类等小分子物质。

2 溶液的性质

1)PH值

溶液的PH决定带电颗粒的解离程度，也即决定其带静电荷的量。对蛋白质而言，溶液pH值离等电点越远，则颗粒所带的净电荷越多，泳动速度也越快；反之，则越慢。因此分离某种蛋白质混合液时，应选择合适的pH,使欲分离的各种蛋白质所带的电荷数量有较大的差异

2)离子强度

溶液的离子强度一般在0.02-0.2之间，电泳较合适。若离子强度过高，则会降低颗粒泳动速度；若离子强度过低，则缓冲能力差，往往会因为溶液PH值的变化而影响泳动度的速率

3)溶液黏度

泳动度与溶液黏度是成反比关系

3 颗粒性质

颗粒直径、形状以及所带静电荷量对泳动度有较大的影响。一般来说，颗粒的静电荷量越大，或其直径越小，或其形状越接近球形，在电场中的泳动速度就越快。反之，则越慢

4 电渗

电泳缓冲液相对于固体支持物的移动称电渗。当支持物不是绝对惰性物质时，常会因为支持物上存在的离子基团如羧基、羟基等吸附电极溶液中的正离子，使靠近支持物的溶液层相对带电，向负极移动，反之，若支持物的离子基团吸附溶液中的负离子，则溶液层向正极移动。电渗作用会影响颗粒的泳动度，



5 焦耳热

 电泳时会产生焦耳热，使介质粘度下降，分子运动加快，迁移率增加，同时温度过高会使样品中的生物大分子变性失活，因此电泳时，要控制电压或电流，也可安装冷却散热装置。如我厂生产的DYCZ-24EN,DYCZ-24F,均具有冷却循环装置,可与WD-9412A型恒温循环器配套使用

 Q=I2Rt

Q-释放出的热量，I-电流强度，R-电阻，t-电泳时间

6.支持物

 现代电泳多在固体支持物上进行，使样品中的不同组分形成不同的区带，称区带电泳。电泳结束后，支持物可以方便地进行染色等后续处理。

 对支持物的一般要求是均匀，吸附力和电渗小，机械性能好，便于染色或紫外光下检测，故最好透明，无紫外吸收。常用支持物有滤纸，醋酸纤维素薄膜，淀粉凝胶，聚丙烯酰胺凝胶，琼脂糖凝胶等

 支持物性质不同也会影响泳动速率，如琼脂糖和聚丙烯酰胺凝胶都有大小不同的筛孔，在筛孔大的凝胶中溶质颗粒的泳动速率快，反之则慢。

 **琼脂糖凝胶电泳**

对于分子量大的样品，如大分子核酸、病毒等，一般采用孔径较大的琼脂糖凝胶进行电泳分离。

琼脂糖是由半乳糖及其衍生物构成的中性物质，不带电荷。琼脂糖是直链多糖，它由D-半乳糖和3,6-脱水-L-半乳糖的残基交替排列组成

**琼脂糖与琼脂的区别**

琼脂是由琼脂糖（agarose）和琼脂果胶（agaropectin）组成的。琼脂糖的结构单元是 D-半乳糖和3.6-脱水-L-半乳糖；琼脂果胶是由许多更小的分子组成的异质混合物。它们的结构相似，但琼脂果胶带硫酸根和羧基组分，凝胶能力差。

在琼脂糖制备过程中需要把琼脂果胶尽量去除，否则琼脂糖有可能存在极微量硫酸根和丙酮酸取代电离基团，就会造成电内渗，电内渗对质点的移动产生影响。质量较好的琼脂糖硫酸根含量比较低，通常在0.2%以下，电内渗比较小，通常在0.13%以下。

简言之，琼脂糖是从琼脂中精细提取的，有自身独特的性质，所以琼脂糖要比琼脂贵得多。

**琼脂糖凝胶电泳：实验原理**

1.DNA分子在碱性缓冲液中带负电荷，在外加电场作用下向正极泳动。

2.DNA分子在琼脂糖凝胶中泳动时，有电荷效应与分子筛效应。不同DNA的分子量大小及构型不同，电泳时的泳动率就不同，从而分出不同的区带。

3.DNA 分子的迁移速度与相对分子质量的对数值成反比关系。凝胶电泳不仅可分离不同相对分子质量的DNA ，也可以分离相对分子质量相同，但构型不同的DNA 分子。

**琼脂糖凝胶电泳**

1. 根据电泳需要，配置合适浓度的电泳及制胶缓冲液。一般为 1× TAE或0.5×TBE。
注意：用于电泳的缓冲液和用于制胶的缓冲液必须是相同的。

2. 根据制胶量及凝胶浓度，在加有一定量的电泳缓冲液的三角锥瓶中，加入准确称量的琼脂糖粉。

注意：总液体量不宜超过三角锥瓶的50%容量。

3. 在微波炉中加热溶解琼脂糖
注意：必须保证琼脂糖充分完全溶解，否则，会造成电泳图像模糊不清。加热时如胶液剧烈沸腾发泡，停止加热。微波炉中加热时间不宜过长。

4.使溶液冷却至60℃左右，如需要可在此时加入溴化乙锭(EB)溶液使其终浓度为0.5ug/ml，并充分混匀——不提倡使用。
注意：溴化乙锭是一种致癌物质。使用含有溴化乙锭的溶液时，请戴用手套。溴化乙锭在可见光下会分解。

5.将琼脂糖溶液倒入制胶模中，然后在适当位置处插上梳子。凝胶厚度一般在5－8 mm 之间。

注意：不要产生气泡，溶液温度太高(>60℃)，会使得水分

过分蒸发，改变凝胶离子浓度，影响电泳效果。

6.在室温下使胶凝固（大约30 分钟），然后放置于电泳槽中进行电泳。
注意：凝胶不立即使用时，用保鲜膜将凝胶包好在4℃下保存，或者放在制胶的缓冲液中，一般可保存2～5 天。

**琼脂糖凝胶电泳配套试剂：**

 （1）介 质：琼脂糖凝胶

 （2）缓冲液：TAE缓冲溶液（Tris碱、乙二胺四乙酸

 二钠二水、冰乙酸）

 TBE缓冲溶液（ Tris碱、乙二胺四乙酸

 二钠二水、硼酸）

 （3）上样缓冲液： 6×DNA Loading Buffer（DNA样

 品专用包含：EDTA、甘油、二甲苯青

 、溴酚蓝）

（4）染 料：

 EB\ Gelred \ goldview \ GenGreen \ GenView

 \SYBRGreen等荧光染料

（5）耗材：

 灭菌的白枪头、黄枪头、蓝枪头、200ul\500ul\1.5ml离

 心管等

（6）DNA Marker

 根据待测物分子量来定

**琼脂糖凝胶电泳缓冲液**

有几种缓冲液适用于天然双链DNA的电泳

 Tris-乙酸盐和EDTA缓冲液（TAE)

 Tris-硼酸盐缓冲液(TBE)

 Tris-磷酸盐缓冲液(TPE)

三者之中，TAE的缓冲能力最低，双链线状DNA片段在TAE中比在TBE或TPE中迁移快10%,对于高分子量的DNA，TAE的分辨率略高于TBE或TPE，对于低分子质量的DNA，TAE要差些。用于分析复杂基因组的Southern印迹均用TAE电泳缓冲液制备凝胶和电泳。超螺旋DNA在TAE中的电泳分辨率要好于TBE。

TBE可以使用2-3次左右，而TAE用1-2次就要更换。电泳缓冲液多次使用后，离子强度降低，pH值上升，缓冲性能下降，可能使DNA条带模糊或不规则DNA带迁移。

电泳缓冲液刚好没过凝胶1-2mm为好，太多则电流加大，凝胶发热。

**琼脂糖凝胶上样缓冲液**

上样缓冲液是上样时与样品一起加入泳道的。上样缓冲液有三个作用：

1）增加样品密度以保证DNA沉入加样孔内；

2）使样品带有颜色，便于上样操作；

3）其中的指示剂在电场中以可以预测的泳动速率

 向阳极迁移。

上样缓冲液有几种，但使用的指示剂基本都包括溴酚蓝和二甲苯氰FF。

溴酚蓝在琼脂糖凝胶中迁移速率是二甲苯氰FF的2.2倍，这一特性与琼脂糖凝胶的浓度无关；

在0.5×TBE琼脂糖凝胶电泳中溴酚蓝的速率约与长约300bp的线性双链DNA相同，在0.5%-1.4%浓度的琼脂糖凝胶中基本不会变化。

含有的甘油可以加大样品的密度，使其大于TAE的浓度而沉降到点样孔中，防止样品飘出点样孔

1，DNA分子大小迁移速率V与logN成反比（N为碱基对数目）。分子越大，摩擦阻力越大，同时大分子通过凝胶孔径的效率也低于较小的分子，所以分子大的迁移慢。 等量的空间结构，紧密的电泳快（超螺旋>线性DNA）。

2，一般来说，分子带的电荷量越大、直径越小、形状越接近球形，则其电泳迁移速度越快。

简言之，浓度越大，分子孔径就越小，DNA迁移速率就越低，反之，迁移速率就大。

另外，浓度也跟凝胶的分辨率有关，浓度越大，分辨率越高。



3，一般迁移速率超螺旋环状>线状DNA>单链开环。

4， 低电压时，线状DNA片段的迁移速率与所加电压成正比。使分辨效果好，凝胶上所加电压不应超过5-8V/cm。

5， 包括标准琼脂糖和低熔点琼脂糖以及正在研制的介于二者之间的琼脂糖。其分辨率等各有不同。

6，溶液pH值距离其等电点愈远，其所带净电荷量就越大，电泳的速度也就越大，尤其对于蛋白质等两性分子，缓冲液pH还会影响到其电泳方向。

溶液的离子强度过低，会使电导率降低，DNA不是全然不动就是迁移极慢；而离子过强时，电导率上升，会产生大量热能，使凝胶变化甚至熔化，也会使DNA变性。

7，染色剂溴化乙锭插入双链DNA造成其负电荷减少、刚性和长度增加，因此，线性DNA-染料复合物在凝胶中的迁移率约降低15%。

**研究结果表明：在低浓度、低电压下，分离效果较好。在低电压条件下，线性DNA分子的电泳迁移率与所用的电压呈正比。但是，在电场强度增加时，较大的DNA片段迁移率的增加相对较小。因此随着电压的增高，电泳分辨率反而下降，为了获得电泳分离DNA片段的最大分辨率，电场强度不宜高于15V/cm。一般在5-10v之间。**

**电泳系统的温度对于DNA在琼脂糖凝胶中的电泳行为没有显著的影响。通常在室温下进行电泳，只有当凝胶浓度低于0.5%时，为增加凝胶硬度，可在4℃，进行电泳。**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **问题**  | **原因**  | **解决办法**  |
| **不规则DNA带迁移** | **1) 对于λ/*Hin*d III片段*cos*位点复性** | **电泳前于65℃加热DNA 5分钟，然后在冰上冷却5分钟** |
| **2) 电泳条件不合适** | **电泳电压不超过20V/cm；温度＜30℃；经常更换电泳缓冲液** |
| **3) DNA变性** | **以20mM NaCl Buffer稀释DNA，电泳前勿加热** |
| **带弱或无DNA带** | **1) DNA的上样量不够** | **增加DNA的上样量；聚丙烯酰胺凝胶电泳比琼脂糖电泳灵敏度稍高，上样量可适当降低** |
| **2) DNA降解** | **避免DNA的核酸酶污染** |
| **3) DNA走出凝胶** | **缩短电泳时间，降低电压，增强凝胶浓度** |
| **4) 对于EB染色的DNA，所用光源不合适** | **应用短波长（254nm）的紫外光源** |
| **问题**  | **原因**  | **解决办法**  |
| **不规则DNA带迁移** | **1) 对于λ/Hind III片段cos位点复性** | **电泳前于65℃加热DNA 5分钟，然后在冰上冷却5分钟** |
| **2) 电泳条件不合适** | **电泳电压不超过20V/cm；温度＜30℃；经常更换电泳缓冲液** |
| **3) DNA变性** | **以20mM NaCl Buffer稀释DNA，电泳前勿加热** |
| **带弱或无DNA带** | **1) DNA的上样量不够** | **增加DNA的上样量；聚丙烯酰胺凝胶电泳比琼脂糖电泳灵敏度稍高，上样量可适当降低** |
| **2) DNA降解** | **避免DNA的核酸酶污染** |
| **3) DNA走出凝胶** | **缩短电泳时间，降低电压，增强凝胶浓度** |
| **4) 对于EB染色的DNA，所用光源不合适** | **应用短波长（254nm）的紫外光源** |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **问题**  | **原因**  | **解决办法**  |
| **不规则DNA带迁移** | **1) 对于λ/*Hin*d III片段*cos*位点复性** | **电泳前于65℃加热DNA 5分钟，然后在冰上冷却5分钟** |
| **2) 电泳条件不合适** | **电泳电压不超过20V/cm；温度＜30℃；经常更换电泳缓冲液** |
| **3) DNA变性** | **以20mM NaCl Buffer稀释DNA，电泳前勿加热** |
| **带弱或无DNA带** | **1) DNA的上样量不够** | **增加DNA的上样量；聚丙烯酰胺凝胶电泳比琼脂糖电泳灵敏度稍高，上样量可适当降低** |
| **2) DNA降解** | **避免DNA的核酸酶污染** |
| **3) DNA走出凝胶** | **缩短电泳时间，降低电压，增强凝胶浓度** |
| **4) 对于EB染色的DNA，所用光源不合适** | **应用短波长（254nm）的紫外光源** |

**聚丙烯酰胺凝胶电泳**

聚丙烯酰胺凝胶是由单体丙烯酰胺（简称Acr）和交联剂N，N-甲叉双丙烯酰胺（简称Bis）在引发剂（eg.APS）和加速剂（eg.TEMED）的作用下聚合并联成三维网状结构的凝胶，以此凝胶为支持物的电泳称为聚丙烯酰胺凝胶电泳（简称PAGE）。

* 聚丙烯酰胺凝胶于琼脂糖凝胶的不同之处：
	1. 分离范围不同
		+ 琼脂糖凝胶电泳分离分子量比较大的物质，尤其是核酸；
		+ 聚丙烯酰胺凝胶分离分子量较小的物质，如蛋白质，氨基酸或小分子核酸等。
	2. 凝胶配置程序不同
		+ 琼脂糖凝胶在缓冲液中加热融化，在凝固前到入槽中即可；
		+ 聚丙烯酰胺凝胶在配置时还要加多种成分，并且对聚合温度也有一定的要求，否则会影响凝胶孔径的大小。
	3. 凝胶的厚度不同
		+ 琼脂糖凝胶最薄只能达到３ｍｍ；
		+ 聚丙烯酰胺凝胶可以制成0.2ｍｍ，分辨率高。
	4. 成本不同 琼脂糖价格便宜；聚丙烯酰胺凝胶价格较高
	5. 安全性不同 琼脂糖没有毒性；聚丙烯酰胺凝胶有毒性

**聚丙烯酰胺凝胶有下列优点：**

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，与被分离物不发生化学反应。

3 对pH和温度变化较稳定。

4 几乎无电渗作用，只要Acr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。

6 凝胶孔径可通过选择单体及交联剂的浓度调节。

7 分辨率高，尤其在不连续凝胶电泳中，集浓缩、分子筛和

 电荷效应为一体，因而较醋酸 纤维薄膜电泳、琼脂糖电

 泳等有更高的分辨率。

**聚丙烯酰胺凝胶聚合：**

**聚合原理：**

* 聚丙烯酰胺是由丙烯酰胺（Acr）和甲叉双丙烯酰胺（Bis）在催化剂作用下合成的，催化系统常用有两种：
1. 过硫酸氨—TEMED化学催化聚合系统
	* 此系统中，四甲基乙二胺（TEMED）称为加速剂，它能以自由基的形式存在。微量的TEMED的加入，可使过硫酸氨（APS，引发剂）形成自由基。这些自由基的产生可以引发丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺的交联反应，形成具有一定孔径的聚丙烯酰胺凝胶。
2. 核黄素—TEMED光聚合催化系统
	* 此系统中，核黄素经紫外线光解形成无色基，再被痕量氧氧化形成自由基，引发聚合反应。TEMED的存在，可以加速聚合，本催化系统主要用用于大孔浓缩胶的配置。

**凝胶孔径的可调性及性质：**

1）聚丙烯酰胺凝胶的孔径的大小是由单体和双体在凝胶中的总浓度（T），以及双体占总浓度的百分含量（C）即交联度决定的。通常凝胶的筛孔、透明度和弹性是随着凝胶浓度的增加而降低的，而机械强度却随着凝胶浓度的增加而增加。





a/b(W/W)与凝胶的机械性能密切相关。当a/b＜10时，凝胶脆而易碎，坚硬呈乳白色；a/b＞100时，即使5%的凝胶也呈糊状，易于断裂。欲制备完全透明而又有弹性的凝胶，应控制a/b=30左右。

2）凝胶浓度与孔径的关系：

 T与C不仅与凝胶的机械性能有关，还与凝胶的孔径关

 系极为密切。一般讲，T浓度大，孔径小，移动颗粒

 穿过网孔阻力大。此外，孔径还同Acr与Bis的比例有

 关，Bis占Acr总浓度5%时，孔径最小。

3）凝胶浓度与被分离物相对分子量质的关系：

由于凝胶浓度不同，平均孔径不同，能通过可移动颗粒的相对分子质量也不同。

在操作时，可根据被分离物相对分子质量大小选择所需凝胶的浓度范围。也可先选用7.5%凝胶(标准胶)，因为生物体内大多数蛋白质在此范围内电泳均可取得较满意的结果。如分析未知样品时也可用4%-10%的梯度胶测试，根据分离情况选择适宜的浓度以取得理想的分离效果。

**影响凝胶聚合的因素：**

1） Acr及Bis的纯度：应选用分析纯的Acr及Bis，如试剂不纯，含有杂质或丙烯酸时，则凝胶聚合不均一，或聚合时间延长甚至不聚合， 因而需进一步纯化。

Acr和Bis贮液的pH值为4.9-5.2，当pH值的改变大于0.4pH单位则不能使用，因在偏酸或偏碱的环境中，它们可不断水解放出丙烯酸和NH4+ 而引起pH值改变，从而影响凝胶聚合。

因此，配制的Acr和Bis贮液应置棕色瓶中，4℃贮存 ，存放期一般不超过1-2个月为宜。

2）AP、核黄素、TEMED：增加AP和TEMED可加快聚合速率，但过量的AP和TEMED会引起电泳时烧胶和谱带变形。应选择合适的配方使聚合在40-60min内完成。

3）pH：碱性条件下聚合快，但碱性过强时胶硬而脆，需高pH时应减少AP和TEMED用量，制酸性胶可加AgNO3等促进聚合。

4）温度：温度高聚合快，但高浓度凝胶聚合时易产生小气泡，低温(5℃)聚合凝胶会变得脆而混浊，一般25-35℃聚合较好。

5）氧分子：氧分子阻碍凝胶聚合，故不含SDS的凝胶最好先抽真空脱气，再加引发剂。

**聚丙烯酰胺凝胶电泳：**

PAGE应用范围广，可用于蛋白质、酶、核酸等生物分子的分离、定性、定量及少量的制备，还可测定相对分子质量、等电点等。

 聚丙烯酰胺凝胶电泳又有以下几种：

* + 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳
	+ 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳
	+ 连续密度梯度电泳
	+ 聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳
	+ 聚丙烯酰胺凝胶双向电泳

**聚丙烯酰胺凝胶分为非变性凝胶和变性凝胶**

所谓**非变性凝胶**，即在凝胶中不加SDS和巯基乙醇等变性剂，这种凝胶中，蛋白质仍保持活性，其迁移率受它的静电荷与分子大小两个因素的影响。因此在非变性凝胶中进行电泳是不能测得分子量的，常用于酶的鉴定、同工酶分析和提纯。

所谓**变性凝胶**，即在凝胶中加入变性剂，如尿素、SDS(十二烷基磺酸钠)、巯基乙醇、DTT等。这些变性剂可以破坏或改变蛋白质的结构，把绝大部分蛋白质分离成组成它们的亚基。同时在蛋白质分子周围包围了大量负电荷。这种电荷基本上掩盖了无变性剂存在时正常就有的任何电荷。蛋白质在这种变性凝胶中的迁移率与它们分子量的对数成直线关系。因此利用变性凝胶进行电泳可以测得蛋白质的分子量。目前应用较多的变性剂为SDS。

**聚丙烯酰胺凝胶（蛋白类）**

非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳:

**1 仪器**：垂直系列电泳槽；低、中、高压电源；恒温循环器

**2 试剂：** 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、过硫酸铵、TEMED、

 考马斯亮蓝\硝酸银、凝胶缓冲液、非变性上样缓

 冲液、Tris碱、甘氨酸等

变性聚丙烯酰胺凝胶电泳

**1 仪器：**垂直系列电泳槽；低、中压电源、恒温循环器

2 **试剂：**

  丙烯酰胺、N,N’-甲叉双丙烯酰胺， SDS（ 十二烷基硫

 酸钠）溶液、1.5MTris-HCl(pH8.8）、0.5MTris-

 HCl(pH6.8）、TEMED、10%(w/v)过硫酸胺溶液、SDS-

 Page上样缓冲液:（ 0.5M Tris（ pH6.8）缓冲液、甘油、

 10%SDS 、二硫苏糖醇、溴酚蓝）、Tris、甘氨酸、SDS

 、考马斯亮蓝 \硝酸银等

**PAGE根据其有无浓缩效应，分为连续系统与不连续系统**

连续系统电泳体系中缓冲液pH值及凝胶浓度相同，带电颗粒在电场作用下，主要靠电荷及分子筛效应；

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性，带电颗粒在电场中泳动不仅有电荷效应、分子筛效应，还具有浓缩效应，故分离效果更好。

不连续的聚丙烯酰胺凝胶作为支持介质，利用凝胶层的不连续性、缓冲液离子的不连续性、PH的不连续性及电位梯度的不连续性，使样品在不连续的两相间积聚浓缩成很薄的起始区带，然后进行分离。

**分子筛效应**

大小和形状不同的蛋白质通过一定孔径分离胶时，受阻滞的程度不同而表现出不同的迁移率 ，这就是**分子筛效应。**

电荷效应

蛋白质样品在界面处被浓缩成一狭窄的高浓度蛋白质区，但由于每种蛋白质分子所带有效电荷不同，因而泳动率也不同，因此各种蛋白质就按泳动率快慢顺序排列成一个一个区带。在进入分离胶时，电荷效应仍起作用。

目前，PAGE连续体系应用也很广，虽然电泳过程中无浓缩效应，但利用分子筛及电荷效应也可使样品得到较好的分离，加之在温和的pH条件下，不致使蛋白质、酶、核酸等活性物质变性失活，也显示了它的优越性。

**PAGE电泳据电泳装置不同分为圆盘及垂直的板状两种**

前者凝胶是在玻璃管中聚合，样品分离区带染色后呈圆盘状，因而称为圆盘电泳；

后者凝胶是在两块间隔几毫米的平行玻璃板中聚合，故称为垂直板状电泳。两者电泳原理完全相同。

蛋白质进行PAGE时，常用垂直板电泳。

垂直板电泳的优越性有：

1. 表面积大而薄，便于通冷却水以降低热效应，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，还可用于印迹转移电泳及放射自显影。
3. 胶板制作方便，易剥离，样品用量少，分辨率高，不仅可用于分析，还可用于制备。
4. 胶板薄而透明，电泳染色后可制成干板，便于长期保存与扫描。
5. 可进行双向电泳。



**SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳**

电泳的条件：一般会选择恒流或恒压

缓冲液： SDS-Tris-Gly（SDS-Tris-甘氨酸）

开始时低电流低电压，之后再调高电压，直至溴酚蓝指示剂跑到凝胶底部

考马斯亮蓝染色之前



考马斯亮蓝染色之后



**印迹转移电泳**

**1 仪器：**转印电泳槽；低、中压电源、恒温循环器

**2**  **试剂：**

 超纯水、Tris、甘氨酸、甲醇

**3** **耗材**

 PVDF膜或NC膜、滤纸

**湿转与半干转印：**

湿 转：在转印过程中要控制温度 ，在低温或者冷循环条件下进行。

半干转：在转印过程前要对滤纸用缓冲液进行充分湿润并赶走气泡，对于分子量大于100KD的蛋白质大分子不用半干转。

膜在用之前都要活化，PVDF膜要先在甲醇中浸泡5S-30s，然后在转移缓冲液中平衡，目的是活化膜上的正电基团，NC膜直接在转移液中平衡即可。



**转印三明治结构的组成：**

**湿转：**

 恒压转印，100V，时间2h左右。

转印缓冲液，三明治结构 ，一般最下层海绵，往上依次是3-4层滤纸，凝胶，膜，3-4层滤纸，海绵。

**注意：**海绵和滤纸在使用前要用转移液浸泡，在制作三明治结构时一定要避免凝胶干燥，滤纸内的气泡要用玻璃棒赶走。

**免疫印迹**

**1 仪器**

 脱色摇床、封闭盒、抗体孵育盒、化学发

 光成像仪等。

**2 试剂**

 脱脂奶粉、TBST（Tris、NaCl、吐温-20）

 或PBST、BSA(牛血清白蛋白）、一抗抗体

 、二抗抗体、ECL发光液等。

 封闭：5%-10%的脱脂牛奶封闭，1h，如果预

 实验发现背景较强，则可以延长封闭

 时间或者适当增加牛奶的浓度

作用：结合膜上除电转上去的蛋白外的位点，

 从而阻止抗体非特异性地结合到膜上，

 使抗体只能与相应的抗原反应，减少抗

 体的非特异性结合的背景

抗原抗体反应的基础是是体内外抗原抗体可特异性的结合，这种特异性结合是通过氢键结合力、电荷吸引力、范德华力、疏水作用力等几种分子间引力相互作用的结果，这些力的合力，使在空间位置上的互补的抗原抗体可以相互结合在一起。

**抗原抗体反应的特点：特异性、比例性、可逆性**

**特异性：**由抗原决定簇和抗体分子的超变区之间空间结构的互补性确定的。

**比例性：**抗原与抗体发生反应需遵循一定的量比关系

**可逆性：**抗原抗体结合形成复合物后，在一定条件下又可解离恢复为抗原与抗体的特性。

**一抗孵育：**将抗体用稀释液稀释到适当的浓，在摇床上孵育2h（如果做过预实验后发现条带较淡，可以适当降低一抗稀释度或者延长一抗孵育时间）

**洗膜：**用PBST或者TBST洗膜5 X 5min，如果预实验中发现背景过高，可以增加洗膜时间

或洗膜次数

**二抗孵育：**二抗是辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗体, 摇床上孵育2h（如果做过预实验后发现条带较淡，可适当降低延长二抗孵育

时间）

**洗膜：**用PBST或者TBST洗膜3 X 10min

 T：Tween-20（去污剂）

***ECL化学发光***

ECL化学发光检测是基于鲁米喏(Luminol)的新一代增强型化学发光试剂，它有辣根过氧化酶（HRP）催化发生化学反应，发出荧光。

ECL化学发光试剂有溶液A和溶液B组成，溶液A主要成分是Luminol及特制发光增强剂，溶液B主要成分是H2O2及特殊稳定剂。

在ECL化学发光反应中，发光液A和B在辣根过氧化物酶（HRP）的催化下，Luminol与过氧化氢反应生成一种过氧化物，过氧化物不稳定随即分解，形成一种能发光的电子激发中间体，当电子中间体由激发态返回至基态，就会产生荧光。

ECL化学反应产生的荧光，结果可以通过X光片压片或者用化学发光仪检测。

**X光片压片：**

所有的过程需要在暗室内进行，可根据荧光的强弱调整曝光时间，然后显影定影。

化学发光免疫分析仪：

包括免疫反应系统和化学发光分析系统，利用化学发光物质经催化剂的催化和氧化剂的氧化, 形成一个激发态的中间体, 当这种激发态中间体回到稳定的基态时, 同时发射出光子(hM) , 利用发光信号测量仪器测量光量子产额。

1 噪声低，图像的质量高

2 灵敏度高，感光效果佳

3 体积小，消耗功能小

4 寿命长，故障率低

5 几何失真小

6 解析度稳定，补偿效果佳

7 耐震动，不易受电磁场干扰



**蛋白电泳中常出现的问题**

1.“ 微笑”(两边翘起中间凹下)形带原因?

 主要是由于凝胶的中间部分凝固不均匀所

 致，多出现于较厚的凝胶中。

 处理办法：待其充分凝固再作后续实验。

2. “皱眉”(两边向下中间鼓起)形带原因?

 主要出现在蛋白质垂直电泳槽中，一般是

 两板之间的底部间隙气泡未排除干净。

 处理办法：在两板间加入适量缓冲液，以

 排除气泡。

3.出现拖尾现象?

 主要是样品融解效果不佳、样品降解或分离胶

 浓度过大引起的。

 处理办法：加样前离心;选择适当的样品缓冲

 液，电泳缓冲液时间过长，重新配制

4.电泳的条带很粗?

 电泳中条带很粗是常见的事，主要是未浓缩

 的原因。

 处理办法：适当增加浓缩胶的长度;保证浓缩

 胶贮液的pH正确(6.8);适当降低电压

蛋白质是两性电解质，当pH＞pI时带负电荷，在电场向正

极移动；当pH＜pI时带正电荷，在电场中向负极移动；当

pH=pI时净电荷为零，在电场中既不向正极也不向负极移

动，此时的pH就是该蛋白质的等电点（pI）。

 聚丙烯酰胺凝胶中加入一种合成的两性电解质载体，在电场的作用下会自发形成一个连续pH梯度。蛋白质样品在电泳中被分离。运动到等电点胶层时就失去所带电荷而稳定停留在该处并聚焦成带，样品中不同蛋白质组分等电点不同，因而在等电聚焦中得到有效的分离。在等电聚焦中，利用各蛋白质组分等电点的差异，并不利用凝胶的分子筛作用。

两性电解质载体是IEF-PAGE中最关键的试剂，它直接影响pH梯度的形成及蛋白质的聚焦。载体两性电解质必须具备的条件：

* 1. 它的化学组成应不同于被分离物，不干扰被分离物的鉴定。
	2. 它的分子量要小，这样便于与被分离的物质分开。
	3. 具有化学惰性，不与被分离物质反应，也不能使被分离物质变性。
	4. 在等电点处必须具有足够的缓冲能力。
	5. 在等电点处必须具有足够高的电导，以使一定的电流通过。

**平板等电聚焦电泳**

**特点：**能够使多个不同的样品和PI Marker 在同一块凝胶板上聚焦，具有条件一致，分析方便等特点，且可在含有尿素的变性凝胶或非离子去垢剂凝胶系统中进行，以提高分辨率。但，由于等电聚焦发热量大，容易烧胶，一般需要恒温冷却循环水装置。

 **实验注意：**

 1、玻璃需硅化处理，玻璃板间距约为0.4—1mm

 2、灌胶不要有气泡

 3、滤纸裁剪宽度要与凝胶宽度相同，且电极桥滤纸的层数不

 要太多，太多容易使电流升高而烧胶，最好选用抗高温滤

 纸（1000V以上）

4、样品盐浓度要尽可能的低

5、接通电源，先用恒压60v，电泳15min，然后每隔5--10min增加一次电压，直至电压升至约550（或换以恒流8mA方式，此时电压会逐渐上升，待电压升至550v时，再改为恒压550v），电泳30min。打开安全罩，取出加样纸后，以580v恒压2小时。待电流降至恒定时，电泳结束。

**注：合适的操作电压或功率需要根据凝胶的厚度和宽度的选择。**

* **等电聚焦的优点**
	+ 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，随着时间和所走距离加长，区带越走越宽，而电聚焦能抵消扩散作用，使区带变窄；
	+ 由于这种电聚焦作用，不管样品加在什么部位，都可聚焦到其等电点处，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。
* **等电聚焦的缺点**
	+ 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，
	+ 样品中的成分必需停留于其等电点，不适用于在等电点时发生沉淀或变性的蛋白质
* **试剂：**
* MiLiQ超纯水、尿素(Urea)、硫脲(Thiourea)、二硫苏糖醇（Dithiothreitol，DTT）、CHAPS、Ampholine（PH 3-10或4-
* 7或 5-8）、溴酚蓝( Blue)、过硫酸铵(Ammonium Persulfate
* APS)、TEMED、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、剥离硅烷、
* 考马斯亮蓝等



胰岛素分子量5700KD，有AB两条链组成，A链有21个氨基酸，B链有30个氨基酸。A-B 链之间有两处二硫键相连，等电点5.3-5.4

**双向电泳**

**原理：**

* + 双向电泳是一种由任意两个单向电泳组合而成的，在第一向电泳后再在与第一向垂直的方向上进行第二向电泳的分离方法。
	+ 经过电荷和质量两次分离后，可以得到蛋白质分子的等电点和分子量信息。
	+ 第一向等电聚焦 第二向 SDS-PAGE。

第二向电泳时，先将SDS-PAG灌在垂直玻璃板之间，上部留2cm左右空间，待聚合后，将第一向胶条转移到第二向胶之上，用载玻片将胶条轻轻压直，加3μL 1%溴酚兰指示剂，用1%的琼脂糖(用电极缓冲液配制)密封胶条，琼脂糖凝固后即可电泳。待溴酚兰将至凝胶板下方边缘时，停止电泳。第二向电泳时，用梯度混合器将凝胶制成7.5%-15%的浓度梯度，可以提高电泳的分辨率。

**主要试剂：**

MiLiQ超纯水、尿素(Urea)、硫脲(Thiourea)、二硫苏糖醇（Dithiothreitol，DTT）、CHAPS、Ampholine（PH 3-10或4-7 5-8）碘乙酰胺(Iodoacetamide，IAA)、EDTA-Na2、十二烷基硫酸钠（Sodium Dodecylsulphate，SDS）、溴酚蓝(Bromophenol Blue)、低熔点琼脂糖、过硫酸铵(Ammonium Persulfate APS)、TEMED、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、Tris碱、甘氨酸、硝酸银、无水碳酸钠、无水乙酸钠、硫代硫酸钠、甲醛、无水乙醇、冰醋酸、氢氧化钠、磷酸、甘油、蛋白质marker、蛋白定量试剂盒等

**第二向：SDS-Page**



