

# 丙烯酰胺凝胶电泳

聚丙烯酰胺凝胶电泳是以聚丙烯酰胺凝胶作为支持介质的电泳方法。在这种支持介质上可根据被分离物质分子大小和分子电荷多少来分离。

聚丙烯酰胺凝胶有以下优点：

①聚丙烯酰胺凝胶是由丙烯酰胺和 N, N' 甲叉双丙烯酰胺聚合而成的大分子。凝胶有格子是带有酰胺侧链的碳-碳聚合物，没有或很少带有离子的侧基，因而电渗作用比较小，不易和样品相互作用。

②由于聚丙烯酰胺凝胶是一种人工合成的物质，在聚合前可调节单体的浓度比，形成不同程度交链结构，其空隙度可在一个较广的范围内变化，可以根据要分离物质分子的大小，选择合适的凝胶成分，使之既有适宜的空隙度，又有比较好的机械性质。一般说来，含丙烯酰胺 7-7.5% 的凝胶，机械性能适用于分离分子量范围不 1 万至 100 万物质，1 万以下的蛋白质则采用含丙烯酰胺 15-30% 的凝胶，而分子量特别大的可采用含丙烯酰胺 4% 的凝胶，大孔胶易碎，小孔胶则难从管中取出，因此当丙烯酰胺的浓度增加时可以减少双含丙烯酰胺，以改进凝胶的机械性能。

③在一定浓度范围聚丙烯酰胺对热稳定。凝胶无色透明，易观察，可用检测仪直接测定。

④丙烯酰胺是比较纯的化合物，可以精制，减少污染。合成聚丙烯酰胺凝胶的原料是丙烯酰胺和甲撑双丙烯酰胺。丙烯酰胺称单体，甲撑双丙烯酰胺称交联剂，在水溶液中，单体和交联剂通过自由基引发的聚合反应形成凝胶。

在聚丙烯酰胺凝胶形成的反应过程中，需要有催化剂参加，催化剂包括引发剂和另速剂两部分。引发剂在凝胶形成中提供始自由基，通过自由基的传递，使丙烯酰胺成为自由基，发动聚合反应，加速剂则可加快引发剂放自由基的速度。常用的引发剂和加速剂的配伍如下表：

聚合反应催化剂配伍

引发剂	加速剂
$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	TEMED
$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	DMAPN

核 黄 素	TEMED
-------	-------

注：(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>，过硫酸铵 TEMED：N, N, N, N';四甲基乙二胺 DMAP  
 N: β-二甲基氨基丙晴 用过硫酸铵引发的反应称化学聚合反应；用核黄素  
 引发，需要强光照射反应液，称光聚合反应。聚丙烯酰胺聚合反应可受下列因  
 素影响： 1、大气中氧能淬灭自由基，使聚合反应终止，所以在聚合过程中要使  
 反应液与空气 隔绝。 2、某些材料如有机玻璃，能抑制聚合反应。 3、某些化  
 学药物可以减慢反应速度，如赤血盐。 4、温度高聚合快，温度低聚合慢。 以  
 上几点在制备凝胶时必须加以注意。凝胶的筛孔，机械强度及透明度等很大程  
 度上由凝胶的浓度和交联决定。每 100 毫升 凝胶溶液中含有单体和交联剂的总  
 克数称凝胶浓度，常用 T%表达；凝胶溶液中交联剂 占单体和交联体总量的百  
 分数称为交联度，常用 C%表示，可用下式计算：

公 式

a: 丙烯酰胺克数； b: 甲撑双丙烯酰胺克数； m: 缓冲液体积（毫升） 凝胶浓  
 度过高时，凝胶硬而脆，容易破碎；凝胶浓度太低时，凝胶稀软，不易操作。

交联度过高，胶不透明并缺乏弹性；交联度过低，凝胶呈糊状。聚丙烯酰  
 胺凝胶具有较高的粘度，它不防止对流减低扩散的能力，而且因为它具有三 度  
 空间网状结构，某分子通过这种网孔的能力将取决于凝胶孔隙和分离物质颗粒的  
 大 小和形状，这是凝胶的分子筛作用。由于这种分子筛作用，这里的凝胶并不  
 仅是单纯 的支持物，因此，在电泳过程中除了注意电泳的基本原理以外，还必  
 须注意与凝胶本 身有关的各种性质（网孔的大小和形状等）。可通过下式计算  
 来选择适当的凝胶网 孔。

公 式

式中：P 为网孔平均直径，C 为多聚体浓度，d 为该多聚体分子直径（若不  
 是卷曲的分子应为 5A），K 为常数，K 值取决于凝胶的几何构型，假如多聚体  
 的链是以近似于直角 交联的，则约为 1.5 根据此式，我们可以通过多聚体浓度  
 C 近似地计算出网孔直径，例 如已知多聚体浓度为 5%，其网孔平均直径应为：

公 式

这样的计算是粗略的，与实际情况有一定距离，有人测定了总浓度（T）为  
 20%的丙烯酰胺液，在六种不同比例的双丙烯酰胺存在 下，聚合后的网孔大小，

发现孔径与总浓度有关，总浓度愈大，孔径相应变小，机械强度增强，与总浓度不变时，甲叉双丙烯酰胺 (Bis) 的浓度在 5% 时孔径最小，高于或低于此值时，聚合物孔径都相对变大，凝胶孔径在凝胶电泳中是一个重要的参数，它往往决定了电泳的分离效果。经过不断的实践，得到了如表 3 所示的经验值，在一般情况下，大多数生物体内的蛋白质采用 7.5% 浓度的凝胶，所得电泳结果往往是满意的，因此称由此浓度组成的凝胶为“标准凝胶”。

对那些用于重要研究的凝胶，最好是通过采用 10% 的一系列凝胶浓度梯进行预先试验，以选出最适凝胶浓度。

表 3 不同分子量范围的蛋白质和核酸在凝胶电泳中所选用的凝胶浓度百分率

物质	分子量范围	适用的凝胶浓度 (%)
蛋白质	<10 1-4×10 <sup>4</sup> 4×10 <sup>4</sup> -1×10 <sup>5</sup> 1-5×10 <sup>5</sup> >5×10 <sup>5</sup>	20-30 15-20 10-15 5-10 2-5
核酸	<10 <sup>4</sup> 10 <sup>4</sup> -10 <sup>5</sup> 10 <sup>5</sup> -2×10 <sup>6</sup>	10-20 5-10 2-3.6

聚丙烯酰胺凝胶电泳可分为连续的和连续的两类，前者指整个电泳系统中所用缓冲液，pH 值和凝胶网孔都是相同的，后者是指在电泳系统中采用了两种或两种以上的缓冲液，pH 值和孔径，不连续电泳能使稀的样品在电泳过程中浓缩成层，从而提高分辨能力。

蛋白质在聚丙烯酰胺凝胶中电泳时，它的迁移率取决于它所带净电荷以及分子的大小和形状等因素。如果加入一种试剂使电荷因素消除，那电泳迁移率就取决于分子的大小，就可以用电泳技术测定蛋白质的分子量。1967 年，Shapiro 等发现阴离子去污剂十二烷基硫酸钠 (SDS) 具有这种作用。当向蛋白质溶液中加入足够量 SDS 和巯基乙醇，SDS 可使蛋白质分子中的二硫键还原。由于十二烷基硫酸根带负电，使各种蛋白质—SDS 复合物都带上相同密度的负电荷，它的量大大超过了蛋白质分子原的电荷量，因而掩盖了不同种蛋白质间原有的电荷差别，SDS 与蛋白质结合后，还可引起构象改变，蛋白质—SDS 复合物形成近似“雪茄烟”形的长椭圆棒，不同蛋白质的 SDS 复合物的短轴长度都

不一样，约为 18A，这样的蛋白质—SDS 复合物，在凝胶中的迁移率，不再受蛋白质原的电荷和形状的影响，而取决于分子量的大小，因而 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳可以用于测定蛋白质的分子量。

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)