

中药质量研究

ZHONGYAO FENXI

中药 电泳 技术

主编 李 锋 张振秋



辽宁大学出版社

· 中药质量研究 ·

中药电泳技术

主 编 李 锋 张振秋

副主编 魏兆君 覃 芳 胡丽萍 张天骊

辽宁大学出版社

1996 年 · 沈阳

(辽)新登字第9号

图书在版编目(CIP)数据

中药分析技术 中药电泳技术. —沈阳:辽宁大学出版社,
1996.3

(中药质量研究)

ISBN 7-5610-3158-0

I. 中… I. 李… I. 中药化学成分分析(化学)②中药
化学成分-电泳-分离 N. R284

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (96) 第 05039 号

中药电泳技术

主编 李 锋 张振秋

辽宁大学出版社出版发行(沈阳市崇山中路66号)

中国科学院沈阳分院印刷厂印刷

开本:787×1092 1/32 印张:13.85 字数:330千

1996年3月第1版 1996年3月第1次印刷

印数:1—1000

责任编辑:董晋骞 封面设计:邹本忠

责任校对:合力

ISBN 7-5610-3158-0

R·53 定价:18.00元

序

自 1937 年由 Tiselius 建立电泳技术以来,由于方法简便,分辨率高,选择性强等优点,在生化研究及临床研究等方面得到了广泛的应用。

中药是祖国医药宝库中的瑰宝,但由于中药品种的繁多和混杂,其质量的判断一直是影响中医药发展的重要课题。近年利用电泳技术鉴别中药真、伪、优、劣的研究日益增多,特别是对种子类、动物类中药的鉴别更具特色,这无疑是将中药传统经验鉴别和现代科学手段的结合,对中医药学术发展有很大的推动作用。

我的学生李锋等一批中青年药学工作者,他们注意总结自己的科研经验,参阅大量资料,编成《中药电泳技术》一书。初稿完成后我先睹为快。全书资料丰富,科学性强,图文并茂,实用价值大,是一本理论和实践两方面均具有可读性的参考书,相信对广大从事中药鉴别的专业人员,均有一定的参考价值,欣喜之余,写下以上的读后感,并为之序。

袁昌鲁 教授

1996 年 3 月于辽宁中医学院

目 录

上篇 基本理论

第一章 电泳分类及原理.....	(1)
第一节 电泳的分类.....	(1)
第二节 电泳的基本原理.....	(4)
第三节 聚丙烯酰胺凝胶电泳(简称 PAGE)	(6)
第四节 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (简称 SDS-PAGE)	(25)
第五节 等电聚焦(简称 IFE)	(31)
第六节 等速电泳(简称 ITP)	(52)
第七节 其他电泳技术	(69)
参考文献	(85)
第二章 仪器、试剂与溶液配制.....	(86)
第一节 仪器、设备及其他材料.....	(86)
第二节 试剂性质与用途.....	(106)
第三节 溶液及配制.....	(118)
参考文献.....	(151)
第三章 各种电泳操作方法.....	(152)
第一节 聚丙烯酰胺凝胶电泳法.....	(152)

第二节	SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法	(172)
第三节	聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦法	(182)
第四节	等速电泳法	(190)
第五节	纸电泳和高压纸电泳法	(199)
第六节	醋酸纤维素膜电泳法	(208)
第七节	对流免疫电泳法	(213)
参考文献		(217)

下篇 电泳在中药分析中应用实例

第四章	聚丙烯酰胺凝胶电泳法在中药定性分析中应用	(218)
第一节	不连续系统聚丙烯酰胺凝胶电泳 的应用实例	(218)
第二节	连续系统聚丙烯酰胺凝胶电泳的 应用实例	(318)
参考文献		(336)
第五章	SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳的应用实例	(340)
第一节	不连续系统的 SDS-聚丙烯酰胺 凝胶电泳分析应用	(340)
第二节	连续系统的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶 电泳分析应用	(356)
参考文献		(370)

第六章 等电聚焦与等速电泳的应用实例	(371)
第一节 聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦的应用.....	(371)
第二节 等速电泳的应用.....	(376)
参考文献.....	(386)

第七章 纸电泳 醋酸纤维素膜电泳及

对流免疫电泳的应用实例	(387)
第一节 纸电泳分析应用.....	(387)
第二节 醋酸纤维素膜电泳分析应用.....	(393)
第三节 对流免疫电泳分析应用.....	(407)
参考文献.....	(412)

附篇 一些重要数据及索引

一、常用缓冲溶液的配制	(413)
二、药材名称索引	(421)
三、动物、植物学名索引.....	(424)

上篇 基本原理

第一章 电泳分类及原理

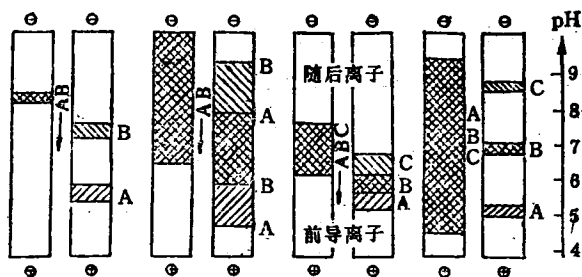
电泳(Electrophoresis)是指带电荷的粒子在直流电场中移动的现象,它是分离和鉴别混合物中带电粒子的有效方法。电泳技术自 1937 年由 Tiselius 建立至今已有 60 年历史,其方法也从最初的移界电泳,发展成各种支持物电泳(如纸电泳,醋酸纤维薄膜电泳,聚丙烯酰胺凝胶电泳,等速电泳等)。这些方法不仅设备简单、操作方便、有很高的分辨率和选择性,同时所分离的成分还可通过染色,紫外吸收,放射性测定,生物活性测定等方法进行定性、定量分析。从而使电泳技术不仅应用于生化研究,临床检验等领域,并已在植物分类、中药鉴定等方面发挥了巨大作用。

第一节 电泳的分类

电泳的分类大体上有三种,即按分离原理、有无固体支持物及综合分类。

一、按分离的原理区分

在此分类方法中,电泳可分为:区带电泳、移界电泳、等速电泳及等电聚焦,各种电泳分离原理见示意图 1-1。



a 区带电泳 b 移动界面电泳 c 等速电泳 d 等电聚焦

图 1-1 不同电泳法的分离原理示意图

1. 区带电泳 如图 1-1a 所示,不同的离子成分在均一的缓冲液(或称载体电解质)系统中分离成独立的区带,可以用染色等方法显示出来,如果用光密度计扫描可得出一个个互相分离的峰。电泳的区带随时间延长和距离加大则扩散严重,影响分辨率。加不同的介质可以减少扩散,特别是在凝胶中进行,它兼具分子筛作用,分辨率可大大提高,是应用最广泛的电泳技术。

2. 移界电泳 如图 1-1b 所示,它只能起到部分分离的作用,如将浓度对距离作图,则得出一个个台阶状的图形。最前面的成份有部分是纯的,其它则互相重叠。各界面可用光学方法显示,这就是 Tiselius 最早建立的电泳方法。

3. 等速电泳 如图 1-1c,在电泳达成平衡后,各区带相随,分成清晰的界面,以等速移动。按浓度对距离作图也是台阶状,但不同移界电泳的是,它的区带无重叠,而是分别保持。

4. 等电聚焦 从分离图形 1-1d 来看象区带电泳,但原理不同。它是由多种具有不同等电点的载体两性电解质在电场中自动形成 pH 梯度,从而使被分离物各自移动到其等电点而聚成很窄的区带,因此它的分辨率很高。

二、按有无固体支持物区分

根据电泳是在溶液中还是在固体支持物上进行,电泳又可以分为自由电泳和支持物电泳。

1. 自由电泳 还可分为:(1)显微电泳(也称细胞电泳),即在显微镜下直接观察细胞的电泳行为;(2)移界电泳;(3)柱电泳,用密度梯度保持分离区带不再混合,如在配以 pH 梯度则称为等电聚集;(4)自由流动幕电泳,即一种制备用的连续电泳装置,溶液自上流下形成一层薄的液膜,两个电极与液流方向垂直加在液层的左右两边。被分离物则经电泳分离后,由下面分管收集;(5)等速电泳。

2. 有支持物的电泳(即区带电泳) 多种多样,电泳过程可以是连续的或分批的,支持物可以用滤纸(如纸电泳),薄膜(如醋酸纤维素薄膜电泳),粉末(如生淀粉粒电泳),凝胶(如聚丙烯酰胺凝胶及琼脂糖凝胶电泳)等。仪器可以用小的湿室,水平或直立的槽、柱、小管和毛细管;也可以用幕,此外也可配合免疫扩散(称免疫电泳),使用高压的高压电泳及配合 pH 梯度的等电聚焦等。

三、综合分类

在上述的分类方法中,尤其是在第二种分类中,有些电泳没有适当的位置,较全面的考虑多种因素,可以得出更为系统的电泳分类。

1. 热对流的控制

A. 泳动槽形状(冷却效果):(1)矩形称移界电泳;(2)毛细管称毛细管电泳;(3)薄层称连续自由流动幕电泳。

B. 支持物:(1)海砂、玻璃珠、淀粉粒称区带电泳;(2)滤纸

称纸电泳；(3)醋酸纤维素膜称醋酸纤维素薄膜电泳。

2. 阻力的控制

A. 溶液粘度：(1)甘油、蔗糖、尿素、甲基纤维素；(2)浓度变化，均称密度梯度电泳。

B. 凝胶：(1)琼脂或琼脂糖称琼脂(糖)凝胶电泳(免疫电泳)；(2)淀粉称淀粉凝胶电泳；(3)聚丙烯酰胺称聚丙烯酰胺凝胶电泳；(4)梯度孔径凝胶称梯度凝胶电泳。

3. 趋动力力的控制

A. 均一电压：(1)低电压(2~10)称低压电泳；(2)高电压(50~200V/cm)；(3)超高电压(100~1500V/cm)均称高压电泳。

B. 不均一电压：(1)pH 梯度称等电聚焦；(2)不连续离子强度称等速电泳。

第二节 电泳的基本原理

一、电泳迁移率(U)

在直流电场中，带电荷的粒子向带符号相反的电极移动，称电泳。恒量带电粒子的这种移动能力的常数叫电泳迁移率。

根据推动粒子运动的力(F)与粒子净电荷(Q)及电场电强(E)的关系；即

$$F = QE \quad (1)$$

而粒子在运动时又受到一定的阻力(F')，对于球形粒子，此阻力F'应服从下列公式：

$$F' = 6\pi\eta r v \quad (2)$$

式中r为粒子半径， η 为介质粘度，v为泳动速度。

当粒子以稳态运动时,其推动力与阻力相等,即

$$F=F'$$

因此 $QE=6\pi r\eta v$ (3)

电泳迁移率是指在单位电场强度(1v/cm)时的泳动速度即

$$\text{电泳迁移率 } U=V/E \quad (4)$$

将(4)代入(3)得

$$U=Q/6\pi r\eta \quad (5)$$

实际中这种理想的状况是很难达到的,尤其在区带电泳中,干扰的因素很多。由(4)式可以得出迁移率的单位为

$$U=V/E=d/t \cdot E = \frac{\text{cm}}{\text{s} \cdot \text{v/cm}} = \frac{\text{cm}^2}{\text{v} \cdot \text{s}} \quad (6)$$

d = 粒子运动距离以(cm)计, t = 时间以秒计(s), E = 电泳梯度 = (v/cm)

因为迁移率数值极小,通常以迁移率单位表示,

$$1 \text{ 迁移率单位} = 10^{-5}(\text{cm}^2/\text{v} \cdot \text{s})$$

在确定的条件下,某物质的迁移率为常数,是该物质的物化特性常数。

二、离子强度对电泳的影响

在电泳液中的离子增加时会使电泳迁移率降低,原因是带电的粒子会吸引相反符号的离子聚集在其周围形成一个与运动粒子符号相反的离子氛(ionic atmosphere),它和该粒子向相反的方向运动,从而降低了该粒子的迁移率。离子的这种阻碍效应是与其浓度和价数相关的。当电泳时缓冲液的离子强度较低时,泳动速度快,生热少;反之则泳动慢,生热多,但区带较窄。

因此可根据实际需要调整缓冲液中的离子强度或 pH 值(控制离子的解离),以得到较多的电泳分辨率。

三、电泳时生热问题

热对电泳有很大的影响,温度升高时,迁移率和自由扩散增加,介质的粘度降低。电泳时因所受外加的电压,会不断产生热量,因此在电泳装置中如何散热是一重要问题,目前已生产具有冷却设备的电泳槽,以解决电泳时的生热问题。

由此可见,电泳的实质即带电粒子在电场的迁移过程,而影响其迁移的因子即影响电泳结果的因子,综上所述,可分为以下三大类:

(a)与泳动离子(或粒子)本身的特性有关的因子,如:电荷符号及大小,本身大小和形状,水化程度,解离趋势,两性行为等。

(b)环境因素,如:缓冲液浓度,离子强度,介电性质,化学性质,pH,温度,粘性,有无极性分子存在(因为它可以影响粘性和介电性)等。在有支持物的情况下,则因素更多,如支持物的吸附作用,不均一性,离子交换能力,热和蒸发作用等等。

(c)所加电场的特性,如:强度和纯度(是否有交流电)。

这些因素在实验过程中都应充分注意,尽量保持恒定不变,以获得可重复的结果。

第三节 聚丙烯酰胺凝胶电泳(简称 PAGE)

聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel eletrophoresis, PAGE),是一种利用人工合成的凝胶作支持介质的区带电泳方法。因为聚丙烯酰胺凝胶有一定的网状结构,并可以人为控制其聚合,使其形成具有一定大小孔径的凝胶。如果形成的孔径大小,接近所分离样品分子的大小,那么在电泳过程中,各样品分

子在通过凝胶孔洞时,所受到的阻力就会和样品分子的大小和形状密切相关。这样,就为净电荷很相近的物质的分离,又提供了一种可变的分离因素,通常称这种有利因素为分子筛作用。

用聚丙烯酰胺凝胶作区带电泳的支持物,有如下优点:

- (a)样品不易扩散。
- (b)可随意控制凝胶浓度,按照需要制成不同孔径的凝胶。
- (c)把分子筛效应和电荷效应结合在同一方法中,使其比任何一种单一效应达到更高的分辨能力。
- (d)只要合成用的原料(单体)纯净,制成的多聚物的再现性高,因此对样品分离的重复性也比较高。
- (e)在一定浓度范围内是透明的,机械强度好有弹性。
- (f)需要样品量少,1~100 μ g已足够。
- (g)需要设备简单,时间短。
- (h)用途广泛,对蛋白质,核酸等生物高分子可进行分离、定性、定量、分子量测定及小量制备等等。

聚丙烯酰胺凝胶电泳的方式基本有二种:圆盘电泳(disc electrophoresis)和平板电泳(slab electrophoresis)。这二种形式的电泳,各具特点和用途。如前者设备简单,操作方便,需样量少,分辨率高,主要用于分析鉴定复杂混合样品中的某一个组分,即使是一个很大分子的比较微小的差异,也可以把它们区分开来。因此圆盘电泳的应用非常广泛,几乎分子生物学的各个领域,都用它来作为分析鉴定的有效而可靠的方法。平板电泳的特点是可以同时进行多个样品的比较分析,可以作双向电泳,更可以提高分辨率。

此外,聚丙烯酰胺凝胶电泳还有制备电泳,浓度梯度电泳及特殊形式的电泳,如:双向圆盘电泳,活组织圆盘电泳及微量电泳等。

合程度和交联度决定凝胶的浓度、粘度、弹性和机械强度。

凝胶强度可以用二个字母 C 和 T 来定义。T 表示两个单体的总百分浓度,即

$$T = (a+b)/m \times 100\%$$

C 表示交联剂 Bis 重量对总单体重量的百分数

$$C = b/(a+b) \times 100\%$$

这里 a 为 Aca 的量(g), b 为 Bis 的量(g), m 为缓冲液体积(ml)。

a/b 的值是有临界线的。如果 $a/b < 10$, 制成的凝胶脆而易碎, 坚硬而不透明。如果 $a/b > 100$, 即使 5% 的丙烯酰胺也是糊状的, 容易破碎。a/b 的值接近 30 时(其中丙烯酰胺的量必须大于 3%), 可以制成既有弹性又完全透明的凝胶。

在 5~20% 浓度范围内, T 和 C 的数值可按下列式选择

$$c = 6.5 - 0.3T$$

决定凝胶孔径大小的主要是凝胶浓度, 如: 7.5% 的凝胶平均孔径为 50 Å, 30% 的凝胶平均孔径为 20 Å。但交联剂也有一定的影响, 如当 Bis:Aca 的比值由 1:15 改变到 1:60, 显著地改变了凝胶的“分子筛”性质。

2. 凝胶的催化聚合过程

凝胶的聚合作用通常是使用能提供游离基(free radicals)的一些催化—氧化还原体系(catalyst—redox systems)来完成的, 其催化体系有二种:

(1) 化学聚合: 化学聚合的催化剂通常用过硫酸铵, 此外还需一种脂肪族叔胺作加速剂。最有效的加速剂为 N,N,N',N', 一四甲基乙二胺(简称 TEMEM), 其次为三乙醇胺及二甲胺基丙晴(简称 DMPN)。在叔胺的催化下, 由过硫酸铵形成氧的自由基, 后者又使单体形成自由基, 从而引发聚合作用。叔胺

要在处于自由碱基状态下才有效。所以在低 pH 时常会延迟聚合作用。分子氧阻止链的延长,妨碍聚合作用,一些金属也能抑制聚合,冷却也可以使聚合变慢。因此应控制这些因素,使聚合在 30~60 分钟内完成,以便凝胶的性质稳定。

(2)光聚合:光聚合通常用核黄素为催化剂。在此过程中常需有痕量氧存在,核黄素经光解形成无色基。后者被氧再氧化形成自由基,从而引发聚合作用。但过量的氧会阻止链长增加,应避免。在光聚合中,不加 TEMED 也能进行,但加入可以加速聚合。

光聚合以日光灯为光源或日光以及其它光源均可。光聚合的优点是:a 催化剂用量低,不致有破坏作用;b 通过光照可以预定聚合时间。但光聚合的凝胶孔径较大,且随时间延长而渐渐变小,不稳定,故多用它制大孔凝胶,(即浓缩胶)。而化学聚合多用于制备小孔凝胶(即分离胶),因为它的凝胶孔径较小,各次制备的重复性好。

3. 凝胶的分子筛效应

由于凝胶具有粘度和高摩擦阻力,它不仅阻止对流使扩散减低到最小程度,而且,它具有网络结构,直接参与了移动颗粒的分离过程,而这种作用依赖于移动颗粒的分子大小,因此,这种凝胶中,移动颗粒的分离依赖于净电荷的性质和分子大小二个因素。这种区别不同大小分子种类的能力,就是凝胶具有的一种筛分大小的能力即分子筛效应。

4. 凝胶浓度的选择

聚丙烯酰胺凝胶区带电泳中蛋白质区带的分离,与区带之间的距离有关,而与区带的宽度无关;分辨率则指与区带宽度有关的区带间隔。两种组分间的分辨率受各种影响区带清晰程度因素的影响,如为防止过度负载,采用少量蛋白质样品,及从样