

供临床医学、口腔医学和相关医学专业使用

细胞与分子生物学 实验教程

主 编 卢 健

副主编 李伟毅 孙岳平

倪紫音 程 枫



人民卫生出版社

普通高等教育“十一五”国家级规划教材
教育部《生物化学与分子生物学》专业教学指导委员会推荐教材

细胞与分子生物学 实验教程

主 编 王 健
副主编 曹晓风 曹晓红
参 编 曹晓波 曹晓燕
曹晓娟 曹晓霞

人民卫生出版社

供临床医学、口腔医学和相关医学专业使用

细胞与分子生物学 实验教程

主 编 卢 健

副主编 李伟毅 孙岳平 倪萦音 程 枫

编 者 (按姓氏笔画为序)

于丽莉 王保国 许伟榕 余奇文

沈文红 张怡平 张惠民 徐 洪

蒋黎华

人民卫生出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

细胞与分子生物学实验教程/卢健主编. —北京:
人民卫生出版社, 2010. 6
ISBN 978 - 7 - 117 - 12750 - 9

I. ①细… II. ①卢… III. ①细胞生物学 - 实验 - 医
学院校 - 教材②分子生物学 - 实验 - 医学院校 - 教材
IV. ①Q2 - 33②Q7 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2010)第 066697 号

门户网: www.pmph.com	出版物查询、网上书店
卫人网: www.ipmph.com	护士、医师、药师、中医 师、卫生资格考试培训

版权所有, 侵权必究!

细胞与分子生物学实验教程

主 编: 卢 健
出版发行: 人民卫生出版社 (中继线 010 - 59780011)
地 址: 北京市朝阳区潘家园南里 19 号
邮 编: 100021
E - mail: pmph@pmph.com
购书热线: 010 - 67605754 010 - 65264830
010 - 59787586 010 - 59787592
印 刷: 北京蓝迪彩色印务有限公司
经 销: 新华书店
开 本: 787 × 1092 1/16 印张: 12
字 数: 292 千字
版 次: 2010 年 6 月第 1 版 2010 年 6 月第 1 版第 1 次印刷
标准书号: ISBN 978 - 7 - 117 - 12750 - 9/R · 12751
定 价: 26.00 元
打击盗版举报电话: 010-59787491 E-mail: WQ@pmph.com
(凡属印装质量问题请与本社销售中心联系退换)

前言

当前,学科的发展、交叉及相互渗透已成为基础医学实验教学的特点,实验教学体系与方法也在不断地发展与进步,培养学生严谨的科研思维及创新能力应全面渗入到实验教学中。

细胞与分子生物学实验技术是生命科学研究的基础,不仅具有完整而系统的知识体系,而且已经渗透到基础医学和临床医学的各个领域。将生物化学与分子生物学技术、细胞生物学技术,医学免疫学技术和医学遗传学技术作为学科群,已成为现代医学生物学实验教学改革的重要内容之一,这有利于学生进行实验技术的系统训练,使基础验证性实验教学向适应社会发展的整合式实验教学转变。

本书是在自编教材《细胞与分子生物学实验指导》的基础上编写而成的。整合了细胞生物学、医学免疫学、医学遗传学、生物化学与分子生物学这些学科的实验教学,以独立设置的课程适应现代医学基础实验教学的进步与需要。

本书经过不同学制学生的试用,课程教师、同学肯定了书目的编排和内容的需求,使用中也提出了不少建设性的建议。现经整理后以《细胞与分子生物学实验教程》为书名出版。本书分成基础实验、其他基本实验技术、综合实验和设计性实验引导四个部分。以电泳技术、层析技术、离心技术、蛋白质技术、PCR 技术、免疫学分析基本技术、遗传学的染色体制备分析技术和细胞学的细胞培养、显微镜使用作为基础实验,辅以教师的讲授和新技术的演示,形成新的细胞与分子生物学实验教学特色。综合实验将给予学生比较实用、连贯的实验技术训练。设计性实验引导将注重学生科研设计、综合分析和创新能力的培养。

本实验教程可依据医学院各层次学生的培养要求不同进行取舍和组合。

由于细胞与分子生物学技术发展迅速,编者水平有限,本实验教程难免存在不足之处或错误,敬请使用本教材者批评指正,以期逐步完善。

卢健

上海交通大学医学院细胞与分子生物学教学实验室

2010年3月

目 录

第一章 绪论	1
第一节 概述	1
第二节 课程设置与要求	1
第三节 实验的基本要求	2
一、实验室的要求	2
二、实验课的要求	2
三、实验记录的要求	3
第四节 实验报告的撰写	3
第二章 基础实验	5
第一节 电泳技术	5
实验一 血清蛋白醋酸纤维薄膜电泳	14
实验二 聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳分离蛋白质	16
实验三 血清脂蛋白琼脂糖电泳	19
实验四 免疫电泳与对流免疫电泳	20
第二节 层析技术	23
实验五 凝胶柱层析分离鉴定蛋白质	30
实验六 DNS-氨基酸的双向聚酰胺薄膜层析	32
实验七 离子交换层析分离氨基酸	35
第三节 离心技术	37
实验八 差速离心法从鼠肝中提取核糖核蛋白体和核蛋白体 RNA	43
一、提取核糖核蛋白体	43
二、提取核蛋白体 RNA	44
实验九 蔗糖梯度离心法分步离心核糖核酸	44
实验十 小鼠脾单个核细胞的分离——密度梯度离心法	45
第四节 蛋白质技术	47
实验十一 血清免疫球蛋白的分离、纯化与定量	49
实验十二 细胞总蛋白的提取	50
实验十三 蛋白质定量测定方法——标准曲线法测定蛋白质含量	52
实验十四 Western 印迹法检测表达蛋白	55
第五节 多聚酶链体外扩增技术(PCR)	58

实验十五 聚合酶链反应(PCR)	59
一、PCR 技术检测 β -actin 基因	59
二、琼脂糖凝胶电泳分离 DNA 片段	61
实验十六 逆转录 PCR	64
一、Trizol 法抽提总 RNA	65
二、逆转录(RT)-PCR	67
实验十七 PCR 单链构象多态性分析(示教)	68
第六节 免疫技术	71
实验十八 直接凝集试验——血型鉴定实验(玻片法)	72
实验十九 双向免疫扩散实验	74
实验二十 酶联免疫吸附实验(ELISA)——双抗体夹心法	75
实验二十一 细胞膜表面抗原检测——补体依赖的微量淋巴细胞毒实验	77
第七节 细胞分析技术	80
实验二十二 显微镜使用、细胞的基本形态与结构及细胞的化学成分分析	80
一、光学显微镜的使用方法	80
二、过氧化氢酶分解过氧化氢实验	81
三、蟾蜍血细胞内 DNA 的显示	82
四、几种特殊显微镜的基本原理和用途	82
实验二十三 动物原代细胞的培养	84
实验二十四 培养细胞的存活率检测	86
实验二十五 蟾蜍血细胞的体外融合	87
实验二十六 细胞有丝分裂及细胞骨架的显微观察	91
实验二十七 动物染色体的制备	92
第八节 染色体分析技术	93
实验二十八 外周血培养染色体制备技术	93
实验二十九 染色体标本 G 显带制备	96
实验三十 染色体 C 显带技术	98
实验三十一 人类染色体非显带核型分析	99
实验三十二 人类染色体 G 显带核型分析	100
第三章 其他基本实验技术	101
实验一 葡萄糖定量方法——标准管法测定葡萄糖含量	101
实验二 流式细胞术(示教)	102
实验三 图像分析/电镜观察(示教)	105
一、图像分析	105
二、电子显微镜观察	107
第四章 综合实验	109
实验一 基因组 DNA 分析	109
一、高分子量 DNA 的提取与纯化	109
二、DNA 的酶解	114

三、琼脂糖凝胶电泳分离 DNA 片段	115
四、DNA 转移	116
五、探针标记	118
六、核酸分子杂交	120
实验二 兔肝碱性磷酸酶(AKP)的纯化及 K_m 的测定	123
一、有机溶剂法部分纯化兔肝 AKP	123
二、AKP 比活性测定	127
三、DEAE 纤维素(DE-52)离子交换层析进一步纯化 AKP	129
四、AKP K_m 测定	133
五、结果	135
实验三 细胞凋亡检测	135
一、细胞凋亡诱导	136
二、琼脂糖凝胶检测凋亡细胞 DNA ladder	138
三、TUNEL 法检测凋亡细胞	140
实验四 临床标本处理、核酸、蛋白质表达和染色体定位	143
一、常见组织细胞的培养方法	143
二、肿瘤细胞的培养方法	147
三、细胞的冻存、解冻和计数方法	150
四、细胞与组织核酸的非放射性标记原位杂交检测技术	152
五、免疫细胞和组织异常蛋白表达的检测	158
六、基因的染色体定位	163
七、FISH 技术与检测	169
第五章 设计性实验引导	173
第一节 设计性实验概述	173
第二节 设计性实验	174
实验一 选一种 miRNA 研究其与临床的关系	174
实验二 肿瘤细胞或组织相关细胞因子检测分析实验设计	175
实验三 培养环境中的葡萄糖浓度对细胞的影响	175
实验四 人体肿瘤小鼠移植瘤的建立和实验	176
实验五 糖代谢与肿瘤诊断和治疗	176
实验六 中药提取物对人类疾病的治疗作用	177
实验七 免疫细胞亚群分离与鉴定	178
实验八 细胞因子的测定	178
实验九 外环境对免疫功能影响的实验设计	179
实验十 免疫学快速检测方法的实验设计	180
实验十一 三体综合征的产前诊断方法	181
实验十二 镰形红细胞贫血的诊断方法	181
附录	183
附录一 实验误差及其产生原因与纠正	183
附录二 实验室注意事项及应急处理	185

第一章 绪 论

第一节 概 述

基础医学很大程度上是一门实践科学,其基本知识和理论来源于科学实验。实验教学是强化理论课的重要方式,是培养医学生实验科学概念和实验技能的重要途径。更重要的是,实验教学是培养学生综合分析能力、解决问题能力以及科学创新能力的重要方式。

基础医学实验课的改革是促进医学课程教学与国际接轨的一个重要尝试。实验课程与理论课程在教学方式上的差异体现为:实验课程有一定比例的实验教学环节,而理论课程一般不集中组织也不强调要有实验环节。在教学理念和教学内容方面,理论课程专注于理论知识的传授和理论逻辑的训练,而实验课程在为学生搭建一个理论框架的同时,通过实验环节来强化学生对理论的深入理解和实际运用。实验课是实现理论联系实际,培养学生创新能力、应用能力的重要方式。通过实验教学,一方面使学生巩固所学理论,另一方面培养学生实践操作技能和方法,同时也训练了学生运用综合技能的能力。培训学生这方面的能力,有利于增强课程的实践针对性,提高学生的竞争力。

第二节 课程设置与要求

根据“加强基础、注重素质、整体优化、面向临床”的原则,为了强化学生基本技能和动手能力的培养,提高学生综合运用知识的能力,激发学生的创新思维和能力,本课程将基础医学的公共医学实验分成基础实验和综合实验两部分。基础实验以电泳技术、层析技术、离心技术、PCR 体外扩增技术和其他基本实验技术等作为主要内容。对各项技术的基本理论作了较系统的阐明,涵盖本学科最基本的实验操作和技能,包括基本仪器使用、实验操作、实验报告的基本要求、指标、数据和图形的记录、采集和处理。其中还包括一些传统的经典验证性实验,主要目的是体会科学实验的一般规律。围绕这些技术安排一些经典的、结合临床的及较新的科研技术。综合性实验以蛋白质和核酸为出发点选择及重组实验,其中有传统经典的分子生物学实验,使学生从多角度、多学科、多层次研究一个问题,建立整体的概念,强调实验现象的观察与思考,实验结果的讨论和解释,引导鼓励和培养学生对基础医学的兴趣、对医学科学研究的兴趣以及培养学生对一个事物整体研究和创新思维的能力。公共医学实验对不同专业和不同年制的学生,将以不同的模块组合和模块选择相结合,达到培养目标的基本要求。

第三节 实验的基本要求

一、实验室的要求

在科学飞速发展的今天,无论从事哪个领域的研究,除了良好的理论设计之外,重要的是依赖于先进的技术和优良的仪器设备以及良好的研究环境。对于医学学生的训练而言,实验室环境的设计以及设备的置放,对完成实验以及撰写研究论文是非常重要的。比如,分子生物学实验中 PCR 技术的实验应用,学生使用 PCR 技术如果不了解技术应用环境的规范,有可能得不到实验的正确结果,甚至可能误导实验结果。

1975 年,DNA 重组技术刚诞生两年,美国国立卫生研究院(NIH)成立了一个专门委员会,于 1976 年制定了“通用重组 DNA 分子研究准则”。这个准则还通过两个方面对相关实验室加以约束。第一类是生物学的约束:对研究的对象及采用的生物材料严格加以限制。第二类是物理学的约束:根据实验室的特殊建筑设施(如空气过滤)、实验装备及安全防护、实验环境以及操作规则等方面,保护实验操作人员和外部环境。

一个标准的细胞与分子生物学实验室大致可以分为:实验操作室、仪器分析室、离心机室、细胞培养室、放射性核素操作室、冷室、暗室、消毒室、洗涤室等。虽然供学生用的实验室做不到层次如此细的程度,但是作为训练学生的实验思维和操作技术,学生也应该对此有比较充分的认识和了解。

二、实验课的要求

细胞与分子生物学实验是建立在对细胞和生物组织有相当了解的基础上,通过实验环节来强化学生对理论的深入理解和实际运用。实验课是实现理论联系实际,培养学生创新能力和应用能力的重要方式。通过实验教学,一方面使学生巩固所学理论,另一方面培养学生实践操作技能和方法,同时也训练了学生运用综合技能的能力。因此,学生必须了解实验课的特殊要求。

(一) 实验前

1. 预习相关的实验课内容,特别注意建立实验的策略和技术运用。
2. 复习与实验有关的理论知识。
3. 理解实验的原理,了解实验的目的、要求、方法和实验程序。了解试剂与器材在实验中的作用。
4. 对实验的疑问予以加注。

(二) 实验课

1. 学生应遵守教学实验室规则、实验室的注意事项(附录二)。保持良好的实验课秩序,是安全完成实验课内容的保障。
2. 尊重教师的指导,提倡学生积极与教师进行交流、讨论。
3. 学生在实验中应具有严格、严谨、实事求是的科学态度,正规、准确地进行技术操作。
4. 学生在实验中应仔细观察实验过程中的每一个步骤及相应结果,并及时、客观地记录,适时联系理论课内容进行思维,力求理解每一技术操作步骤和现象、结果间的相关意义。

在综合实验和平台融合性实验中,学生必须建立提前、连贯、预测的思维方法。

5. 爱护实验器材、节约试剂、保护环境、减少浪费。特别是在使用试剂时,切勿方便自己,影响他人。

(三) 实验课结束

1. 实验器材与试剂放置整齐、有序、稳当,应清洗的物品及时清洗干净。保持实验台面的整洁。

2. 认真整理和分析实验结果。

3. 完成实验报告,交老师评阅。

三、实验记录的要求

(一) 实验记录的基本要求

实验记录是涉及实验工作能否得到真实、可靠的结果,能否顺利持续地进行。实验记录不求完美,但求完整。

1. 必须实验者自己记录,不能让他人代记。

2. 及时记录 随着实验步骤的进行随时记录,一般不做回忆性记录,如有回忆性记录,应注明。

3. 凡实验时用的记录草稿,保存粘贴在实验记录的相应部位。

4. 实验记录的修改不采用完全遮盖的方式,保留原始记录字样。

5. 实验记录用笔应用水性笔,使其笔迹能长期保留。

6. 实验记录是记录实验的过程和结果,但对每项实验,必须先记录实验设计的各项内容(包括关键步骤及试剂的配制方法和来源),每次实验结束时,应有分析性小结或总结。

(二) 实验记录的具体内容

1. 实验目的、实验原理、材料与方法、实验结果和实验结果讨论。

2. 实验日期、时间和地点以及实验合作人。

3. 使用仪器的名称和编号、测试所得的所有数据。

4. 实验中的意外情况,如仪器故障、器材损坏、步骤出错等。

第四节 实验报告的撰写

实验报告的撰写是一项重要的基本技能训练,是科研论文写作的基础。参加实验的每位同学均应按课程要求写出实验报告。实验报告应文字简练、语句通顺,使用专业性词汇,具有较强的逻辑性和科学性,字迹清楚。

1. 实验报告 实验报告的内容有:

(1) 一般项目:姓名、学号、实验日期。

(2) 实验序号与题目。

(3) 实验合作人的姓名。

(4) 实验目的、实验原理、材料与方法、实验结果和实验结果讨论。

2. 实验结果 包含有:实验观察指标及其结果记录,根据实验的目的将原始记录系统化、条理化。一般可用叙述式、表格式和简图式表达。

(1) 叙述式:用文字将观察到的、与实验目的有关的现象客观地加以描述,注意时间与顺序。

(2) 表格式:能够较为清楚地反映观察内容,有利于相互对比。每一个图表应说明一定的中心内容。注意项目说明和计量单位。

(3) 简图式:用直方图表示实验数据和结果。

3. 实验结果的分析与讨论 实验结果的分析与讨论是根据已知的理论知识对结果进行解释和分析,是作出结论前的逻辑论证。①以实验结果为论据,论证实验目的,即判断实验结果是否为预期的结果。②实验结果提示了哪些新问题?是否出现了非预期结果,即“异常现象”?对此应分析其可能的原因。③实验结果的意义。

4. 实验结论 实验的结论是从实验结果中归纳出的一般的概括性判断,是实验所能验证的概念、原则或理论的简明总结。

细胞与分子生物学教学实验内容较多,安排紧凑,由于有时间限制,不可能反复多次进行同一实验,特别是在综合实验和平台融合性实验时由于学生对实验认识程度的差异、实验操作的个体化差异以及技术熟练情况的差异,都可对实验结果产生直接的明显影响,甚至完全失败。因此,进入实验室做实验的学生须做到:①在实验前必须熟悉每一实验的相关理论和实验方法;②认真进行实验操作,做好实验记录;③对实验结果客观分析,特别要总结经验与失误。

(卢健)

第二章 基础实验

第一节 电泳技术

【教学内容】

1. 电泳技术是检测、鉴定各种生物大分子的纯度、含量及描述它们的特征,甚至还是分离、纯化、回收和浓缩样品的主要工具之一。

2. 电泳技术的发展及电泳技术的基本原理。电泳是指带电颗粒在电场的作用下发生迁移的过程。许多重要的生物分子,如氨基酸、多肽、蛋白质、核苷酸、核酸等都具有可电离的基团,它们在某个特定的 pH 下可以带正电或负电,在电场的作用下,这些带电分子会向着与其所带电荷极性相反的电极方向移动。电泳技术就是利用在电场的作用下,由于待分离样品中各种分子带电性质以及分子本身大小、形状等性质的差异,使带电分子产生不同的迁移速度,从而对样品进行分离、鉴定或提纯的技术。

3. 电泳技术的分类及影响电泳的因素。

4. 电泳的泳动率公式计算。

5. 电泳技术在医学生物领域的应用。

【目的要求】

掌握:

1. 电泳技术的基本原理和影响因素。

2. 电泳技术的应用及其分类应用。

3. 在医学实验中电泳技术对生物材料的分离和分析作用。

熟悉:

1. 在电泳技术中各类电泳方法的局限性。

2. 电泳技术所用的载体,电泳仪的应用。

【电泳技术】

带电粒子在电场中向与自身带相反电荷的电极移动的现象称为电泳 (electrophoresis), 电泳技术是生物化学与分子生物学中的重要研究方法之一。利用电泳技术可以分离许多生物物质,包括氨基酸、多肽、蛋白质、脂类、核苷酸及核酸等,并可用于分析物质的纯度和分子量的测定等。

电泳按介质状态来分,有自由电泳法和区带电泳法两大类。前者以溶液为介质,在溶液中将蛋白质分离开来。两者相比较,自由电泳过程中扩散严重,分辨率有限,而且设备昂贵,操作繁琐,现在已基本上被区带电泳法所取代。所谓区带电泳法,就是在固体支持物上所进

行的电泳。20 世纪 50 年代以来,常用的固体支持物有滤纸、醋酸纤维薄膜、淀粉凝胶、琼脂糖凝胶和聚丙烯酰胺凝胶等。区带电泳法分辨率很高,而且设备简单,操作方便,已经成为生物化学及分子生物学领域中极为有用的技术。

一、电泳技术的基本原理

在 pH 小于等电点的酸性溶液中,蛋白质分子带正电,而在 pH 大于等电点的碱性溶液中,蛋白质分子带负电。但是这并不是实际的电动单位,从物理化学的原理来分析,带电分子的周围由相反电荷的离子形成扩散双电层,它由紧密层和扩散层两部分构成。紧密层中相反电荷的离子被束缚在大分子周围,它在电场中是随大分子一起泳动的,而扩散层中相反电荷的离子虽然也受到大分子的静电引力,但在电场中却会向另一极移动。紧密层表面相对于溶液本体的电位差称之为电动电位即 ζ (Zeta) 电位,由它决定了蛋白质分子在电场中的运动速度。

蛋白质泳动分子在电场中受到电动力 F 的驱动,其大小等于净电荷 Q 和电场强度 E 的乘积:

$$F = QE$$

如果假设泳动分子为球体,它在电场中泳动时也受到一定的阻力 F' ,按 Stoke 定律,其大小与球体半径 r ,介质黏度 η 以及泳动速度 v 成正比:

$$F' = 6\pi r\eta v$$

当恒速泳动时,电动力 F 与阻力 F' 相等,即 $QE = 6\pi r\eta v$

带电粒子在单位电场强度下的泳动速度,称为迁移率(mobility)或泳动度,以 μ 表示,

即:

$$\mu = v/E$$

所以

$$\mu = Q/6\pi r\eta$$

可见,一个带电粒子的迁移率不仅取决于其本身所带的电荷,还与带电粒子的大小、介质的黏度等多种因素有关。在具体实验中,

$$\mu = v/E = (d/t)/(V/l) = dl/Vt$$

式中: v 为粒子的泳动速度(cm/s 或 min); E 为电场强度或电势梯度(V/cm); d 为粒子移动距离(cm); l 为支持物的有效长度(cm); V 为加在支持物两端的实际电压(V); t 为通电时间(s 或 min)。故迁移率(或泳动度)的单位为 cm^2/sV 。

假设物质 1 和物质 2 在同一电场中移动距离分别为:

$$d_1 = \mu_1 \times Vt/l$$

$$d_2 = \mu_2 \times Vt/l \quad (V \text{ 为电压})$$

经过时间 t 之后,两物质(带电粒子)移动的距离之差为:

$$\Delta\mu d = d_1 - d_2 = (\mu_1 - \mu_2) \times Vt/l$$

这就是说,物质 1 和物质 2 能否分离开来,取决于两者的迁移率。若它们的迁移率相同则不能分离,有差别才能分离,差别越大,分离越好。当然,也与其他实验条件有关。

二、影响电泳的因素

电泳结果可受到多种因素的影响,但通常认为以下4个方面更为重要。

(一) 电泳介质的 pH

当氨基酸为被分离物质时,各种氨基酸有不同的等电点,当介质的 pH 等于某氨基酸的等电点时,则该氨基酸处于等电状态,即不向正极或负极移动,当介质 pH 小于等电点时,氨基酸呈阳离子状态,向负极移动;反之当介质 pH 大于等电点时,氨基酸呈阴离子状态,向正极移动。当20种氨基酸的混合物置于 pH 5.5 左右的介质中电泳时,可以将它们分离为三组。蛋白质由氨基酸组成,也具有两性电离的性质,所以介质的 pH 也影响蛋白质的电离情况,即决定蛋白质的带电量(Q)。为了保持介质 pH 的稳定性,常用一定 pH 的缓冲液,如分离血清蛋白质常用 pH 8.6 的巴比妥缓冲液或三羟甲基氨基甲烷(Tris)缓冲液。

(二) 缓冲液的离子强度

缓冲液的离子强度如果过低,缓冲液的缓冲容量小,不易维持 pH 的恒定;缓冲液的离子强度过高,则降低蛋白质的带电量(压缩双电层降低 Zeta 电势),使电泳速度减慢,所以常用的离子强度为 0.02 ~ 0.2 之间。溶液中离子强度的计算方法如下:

$$I = \sum C_i Z_i^2 / 2$$

C_i = 离子的摩尔浓度

Z_i = 离子的价数

例1,两个一价离子化合物(如 NaCl)的离子强度等于它的摩尔浓度,如 0.54mol/L NaCl 溶液的离子强度为:

$$I = (0.54 \times 1^2 + 0.54 \times 1^2) / 2 = 0.54$$

例2,两个二价离子化合物(如 $ZnSO_4$)的离子强度等于它的摩尔浓度的4倍,如 0.1mol/L $ZnSO_4$ 溶液的离子强度为:

$$I = (0.1 \times 2^2 + 0.1 \times 2^2) / 2 = 0.4$$

由上述例子可以看出多价离子会使离子强度增高,所以电泳缓冲液常用一价离子的化合物配制。

(三) 电场强度

实验所用电场强度对移动距离起正比作用。电场强度以每1厘米的电势差计算,也称电势梯度。以滤纸电泳为例,滤纸长15厘米,两端电势差为150伏特,则电场强度为10V/cm。电场强度愈高,则带电粒子的移动愈快。但电压愈高,电流也随之增高,产生的热量也增加。所以在高压电泳(电场强度大于50V/cm)时常需加用冷却装置,否则热量可引起蛋白质等物质的变性而不能分离,还可因发热引起缓冲液中水分蒸发过多,使支持物(滤纸、薄膜或凝胶等)上的离子强度增加,甚至引起虹吸现象(电泳缸内液体被吸到支持物上)等,都会影响物质的分离。

(四) 电渗

在电场中,液体对于固体的固定相的相对移动,称为电渗(图2-1)。如滤纸中含有羟基而带负电荷,与纸相接触的水溶液带正电荷,液体便向负极移动。由于电渗现象往往与电泳

同时存在,所以带电粒子的移动距离也受电渗影响。如果电泳方向与电渗相反,则实际电泳的距离等于电泳距离减去电渗的距离;如方向相同,则实际电泳距离等于电泳距离加上电渗的距离。琼脂中含有琼脂果胶(agaropectin),其中含有较多的硫酸根,所以在琼脂电泳时电渗现象很明显,许多球蛋白均向负极移动。除去了琼脂果胶后的琼脂糖用作凝胶电泳时,电渗大为减弱。电渗所造成的移动距离可用不带电的有色染料或有色葡聚糖点的支持物的中心,以观察电渗的方向和距离。

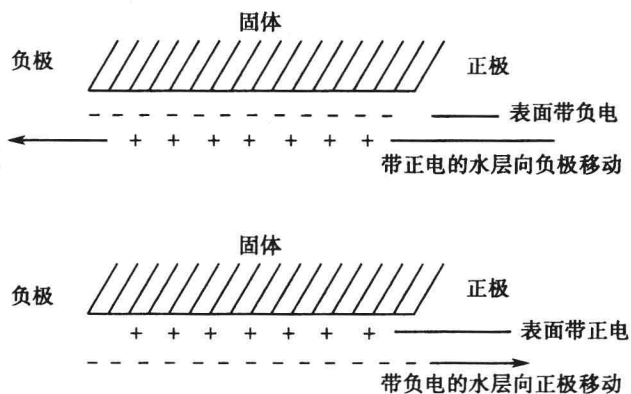


图 2-1 电渗示意图

三、区带电泳法的分类

区带电泳法的形式繁多,分类比较困难,仅按某一特点分类似乎都不全面。这里基于支持物的物理性状、装置形式、pH 的连续性等不同来分类。

(一) 按支持物的物理性状不同,区带电泳法可分为:

1. 滤纸及其他纤维(如醋酸纤维素、玻璃纤维、聚氯乙烯纤维)薄膜电泳。
2. 粉末电泳,如纤维素粉、淀粉、玻璃粉电泳。
3. 凝胶电泳,如琼脂、琼脂糖、硅胶、淀粉胶、聚丙烯酰胺凝胶电泳。
4. 丝线电泳,如尼龙丝、人造丝电泳。

(二) 按支持物的装置形式不同,区带电泳法可分为:

1. 平板式电泳,支持物水平放置,是最常用的电泳方式。
2. 垂直板式电泳,板状支持物在电泳时按垂直方向进行,聚丙烯酰胺凝胶常做成垂直板式电泳。
3. 连续液动电泳,首先应用于纸电泳,将滤纸垂直竖立,两边各放一电极,溶液自顶端向下流,与电泳方向垂直,以后有用淀粉、纤维素粉、玻璃粉等代替滤纸分离血清蛋白质,分离量较大。
4. 圆盘电泳(disc electrophoresis)。电泳支持物灌注在两头通的玻璃管中,被分离的物质在其中泳动后,区带呈圆盘状。

目前认为比较先进的毛细管电泳技术,是用石英玻璃制成内径为 25 或 50 μm 、长 50 ~ 100cm 的管状,管中注入聚丙烯酰胺凝胶(特殊技术),也是区带电泳法的一种。它集电泳与分析检测系统于一身。因管细、散热快,电压可达 2 万 ~ 3 万伏,故具有量微、快速、重复性

好、分辨率高及可自动化等优点,但价格很高。

(三) 按 pH 的连续性不同,区带电泳法可分为:

1. 连续 pH 电泳,即整个电泳过程中 pH 保持不变,常用的纸电泳,醋酸纤维薄膜电泳等属于此类。

2. 非连续 pH 电泳,缓冲液和电泳支持物间有不同的 pH,如聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳分离血清蛋白质时常用这种形式,它的优点是易在不同 pH 之间形成高的电位梯度区,使蛋白质移动加速压缩为一极狭小的区带而达到浓缩的作用。但聚丙烯酰胺凝胶电泳分离核酸则采取连续 pH 装置。

近年来发明的等电聚焦(isoelectric focusing)电泳可称为非连续 pH 电泳,它利用人工合成的两性电解质(商品名 Ampholine,一类脂肪族多胺基多羧基化合物)在通电后形成一定的 pH 梯度。被分离的蛋白质停留在各自的等电点位置而形成分离的区带,电极两端,一端是酸,另一端是碱。

等速电泳(isotachopheresis)也属于非连续 pH 电泳,它的原理是将分离物质夹在先行离子和随后离子之间,通电后与被分离物质的电泳速度相同,所以叫等速电泳。近年发明的塑料细管等速电泳仪,可以进行毫微量物质的分离,该仪器采用数千伏的高电压,几分钟内即完成分离,用自动记录仪进行检测,它的出现是电泳技术的革新。

四、电泳技术的应用

电泳技术主要用于分离各种有机物(如氨基酸、多肽、蛋白质、酶、脂类、核苷、核苷酸、核酸等)和无机盐。也可用于分析某种物质的纯度,还可用于分子量的测定。电泳技术与其他分离技术(如层析法)结合,可用于蛋白质结构的分析,“指纹法”就是电泳法与层析法的结合产物。用免疫原理测试电泳结果,提高了对蛋白质的鉴别能力。电泳与酶学技术的结合发现了同工酶,对于酶的催化和调节功能有了更深入的了解,所以电泳技术是医学科学中的重要研究技术。

下面介绍几个在生化实验工作中常用的电泳技术。

(一) 纸电泳

是以滤纸为支持物进行电泳,它常与其他层析方法配合使用,以提高分析效果,纸电泳一般用于物质分离分析、测定等电点、鉴别颗粒电荷的符号和判断样品的纯度等方面。

由于纸电泳具有设备简单、花费少以及操作方便等优点,所以目前仍为实验室常用电泳技术之一。然而,纸电泳所用滤纸有较大的吸附力和电渗作用,使样品颗粒的泳动容易受影响,所以不适用于测定迁移率。

(二) 醋酸纤维素膜电泳

醋酸纤维素膜是 Kohn(1975)首先用于区带电泳的,它是由高纯度的醋酸纤维素制成的一种细密而又薄的微孔膜。醋酸纤维素膜电泳的原理基本上和纸电泳原理相同,但由于作为支持物的醋酸纤维素膜对样品的吸附力较滤纸小得多,因此,少量的样品或者大分子物质都能得到较高的分辨率。又由于醋酸纤维素膜亲水性较小,故而电渗作用较滤纸小,并且它所容纳的缓冲液也较少,因此电泳的大部分由样品传导,可以加速样品分离,大大节约电泳时间。

虽然醋酸纤维素膜电泳的分辨能力比聚丙烯酰胺凝胶电泳和淀粉胶电泳等要低,但它