

" 十一五 " 国家重点图书

蛋 | 白 | 质 | 科 | 学 | 与 | 技 | 术 | 丛 | 书

「蛋白质 电泳技术指南」

夏其昌 张祥民 周仲驹 阮宏强 编

电泳史

蛋白质和多肽的凝胶电泳及检测

毛细管电泳

自由流电泳

毛细管电泳多维分离检测新技术



化学工业出版社
生物·医药出版分社

" 十一五 " 国家重点图书

蛋 | 白 | 质 | 科 | 学 | 与 | 技 | 术 | 丛 | 书

「蛋白质 电泳技术指南」

夏其昌 张祥民 周仲驹 阮宏强 编

藏书



化学工业出版社
生物·医药出版分社

· 北京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

蛋白质电泳技术指南/夏其昌等编. —北京: 化学工业出版社, 2007. 6

“十一五”国家重点图书

(蛋白质科学与技术丛书)

ISBN 978-7-5025-9157-1

I. 蛋… II. 夏… III. 蛋白质-凝胶电泳-指南
IV. Q510.3-62

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2006) 第 087218 号

责任编辑: 郎红旗 周旭 傅四周

责任校对: 郑捷

装帧设计: 关飞

出版发行: 化学工业出版社 生物·医药出版分社

(北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印刷: 北京市振南印刷有限责任公司

装订: 三河市宇新装订厂

720mm×1000mm 1/16 印张 13¼ 字数 244 千字 2007 年 7 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

定 价: 32.00 元

版权所有 违者必究

编写人员名单

(以姓名拼音排序)

- 刘 韜 Biological System Analysis and Mass Spectrometry, Pacific Northwest National Laboratory, USA
- 阮宏强 上海中科新生命科技有限公司
- 夏其昌 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所
- 张祥民 复旦大学化学系, 复旦大学蛋白质组研究中心
- 周仲驹 Beckman-Coulter 公司中国市场部

序 言

生命科学在 21 世纪已从基因组的研究进入功能基因组或结构基因组的研究,也就是说要在蛋白质结构的基础上研究基因编码的各种蛋白质的功能,并从传统的单个蛋白质的研究走向细胞内蛋白质群体的研究,从而更加深入地揭示生命活动的奥秘。这方面的工作构成了当今生命科学研究的前沿,即蛋白质科学。

人类对蛋白质重要性的认识源远流长。1878 年恩格斯在《反杜林论》中就指出“生命是蛋白体的存在形式”。不过当时对蛋白质的本质和结构还知之甚少。不久,瑞典的 Theodor Svedberg 利用他首创的超离心技术才知道蛋白质分子是均一的并具有固定的分子量。此后,剑桥大学的 Frederick Sanger 利用纸电泳和纸层析测出了第一个蛋白质——胰岛素的一级结构;Max Perutz 和 John Kendrew 利用他们首创的重原子同晶置换技术测出了第一个蛋白质——肌红蛋白晶体的三维结构。我国对蛋白质的研究起步也不晚。20 世纪二三十年代,北京协和医学院吴宪领导的实验室对蛋白质的变性作用进行了深入系统的研究,提出蛋白质变性的实质是蛋白质分子从紧密而有序的结构变为散漫而无序的结构。吴宪的蛋白质变性学说对当前蛋白质分子折叠的研究仍然具有现实意义。及至上世纪五六十年代,中国科学院生物化学研究所、有机化学研究所和北京大学又通过社会主义大协作合成了胰岛素,而且得到了晶体。这不仅是世界上第一次在实验室合成了具有天然构象的蛋白质,而且彻底证明了“一级结构决定高级结构”这一重要原理。随后,我国又独立测出了胰岛素晶体的三维结构。正是由于国内外这些开创性的工作,才有了当前蛋白质科学的蓬勃发展。

回顾蛋白质科学发展的历程,我们可以看到先进技术对科学发展的无比重要性。除了上述的超离心、层析、电泳、重原子同晶置换等技术以外,后来涌现的高效液相色谱、二维凝胶电泳、毛细管电泳、质谱、生物芯片等技术又引领了蛋白质组学的研究,使我们有可能对细胞内的大量蛋白质群体进行综合研究。由此看来,科学与技术是相辅相成的,相互促进的,二者缺一不可。

在人类基因组已被基本破译的基础上,成千上万的蛋白质的结构与功能及其相互作用亟待阐明。蛋白质科学的研究成果将有助于阐明生命现象的本质和活动规律,为多种疾病的致病机理和防治提供理论依据。因此,蛋白质科学是发达国家激烈争夺的制高点,成为近年来生命科学不断取得重大突破的热点领域。我国对蛋白质科学也给予了高度重视,《国家中长期科学和技术发展规划纲要(2006~2020年)》将“蛋白质研究”列为四项重大科学研究计划之一。在广大科研人员的共同努力下,我国在蛋白质研究领域已开始出现与国际先进水平基本同步的良好发展态势,取得了一些重要的理论和应用成果,陆续在“Nature”、“Science”、“Cell”等重要期刊上发表了一批有影响的论文。

正是在这样的背景下,化学工业出版社及时出版的这套《蛋白质科学与技术丛书》很有现实意义。丛书由相互独立而又彼此联系的各分册组成,主题包括“理论”和“技术”两个层面,现阶段以“技术”为主。归纳起来,这套丛书具有以下一些特色。

1. 选题涉及的范围较为广泛。从蛋白质的基础理论,到研究的各种技术方法,以至于前沿的蛋白质组研究,在丛书中都有体现,以满足不同方向、不同层次的科研和教学需要。

2. 编写队伍具有较高水准,由中国科学院、军事医学科学院、北京大学、南京大学等单位活跃在第一线的学术骨干为主编写。

3. 编写人员分布在国内外各研究机构,因而能扬各家之长,并体现国际化的学术合作。

值得欣慰的是,目前这套丛书已通过立项成为国家“十一五”重点图书出版项目,其编写计划也得到了学术界的大力支持,进展顺利。计划两年内陆续出版的的第一批书目包括:

蛋白质化学

蛋白质组学原理

蛋白质电泳技术

重组蛋白质制备技术

蛋白质质谱技术

蛋白质物理学

蛋白质化学分析技术

蛋白质色谱分离技术

蛋白质光谱技术

蛋白质芯片技术

蛋白质科学的研究方兴未艾,今后的发展任重而道远。面对这一挑战,《蛋白质科学与技术丛书》的出版必将促进我国的蛋白质科学在已有的基础上进一步发扬光大。同时,随着这一领域的飞速发展,也希望这套丛书能不断推出后续的新篇和新人新作。

中国科学院院士

张友尚

2007年4月26日

前 言

电泳的历史和美国的历史相当,约有 200 年,蛋白质电泳也有 100 年的历史。1937 年瑞典的 Tiselius 因对电泳定量方面的贡献而获得诺贝尔奖。以后琼脂电泳和纸电泳技术进一步发展,并与医学广泛结合。在 20 世纪 60 年代凝胶电泳的兴起,树立了电泳史上的一个里程碑,蛋白质电泳普及到生物学和医学的大部分实验室。30 年前,现代双向电泳的出现,奠定了目前蓬勃发展的蛋白质组学的基础;15 年前,商品化的毛细管电泳突飞猛进的发展,使电泳操作实现了自动化。

电泳对仪器设备要求不高,目前可算是已经进入千家万户。尤其是现在生物学和医学实验室中应用最普及的凝胶电泳,即使在同一实验室中,不同工作者的操作程序也可能不同。看上去,一些习惯性的细微差别对分离图谱影响不大,导致我们放松了对细节的重视。很多人认为电泳是一门技术,满足于能用就行,忽视了理论方面的重要性,以至于难以提高。经验固然重要,它是一种“量”的积累;而电泳受很多因素影响,如果一些基本概念清楚,能在脑海中经常思索和融会贯通,那么就有可能抓住一瞬间出现的灵感和火花,使你的实验出现一个“质”的飞跃!

美国 Diddings 研究了一种新型电泳,它是在正极和负极之间加上磁场,或者是利用高温和低温来分离蛋白质或带电胶体粒子,发表在 1993 年的“Science”上。后来虽然没有能形成一项能普及和广泛应用的技术,但它确是很有新意和原创性的工作。

电泳和色谱仍是生物学和医学中两项最重要和最有发展前景的分离分析技术,若本书能概括反映出电泳的过去和现在发展趋势,有助于初学者了解电泳的历史和入门性知识,对促进我国电泳的发展和提高起到一定的作用,编者将感到由衷的欣慰。

夏其昌

2006 年 12 月

目 录

第 1 章 电泳史	1
1.1 引言	1
1.2 电泳理论概要	1
1.3 电泳的发展和分类	3
1.3.1 界面移动电泳	3
1.3.2 区带电泳	6
1.3.3 第二代液相电泳	12
1.3.4 一些特殊的电泳分支	14
参考文献	17
第 2 章 蛋白质和多肽的凝胶电泳及检测	18
2.1 蛋白质和多肽的凝胶电泳技术	18
2.1.1 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳	19
2.1.2 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳	23
2.1.3 多肽的凝胶电泳	30
2.1.4 蛋白质的薄板等电聚焦	33
2.1.5 蛋白质的双向凝胶电泳	36
2.1.6 双向荧光差异凝胶电泳	43
2.2 蛋白质和多肽的凝胶电泳检测技术	47
2.2.1 蛋白质凝胶的考马斯亮蓝染色	48
2.2.2 银染	52
2.2.3 蛋白质凝胶的锌染	55
2.2.4 蛋白质凝胶电泳的荧光染色技术	57
2.2.5 翻译后修饰蛋白质的凝胶电泳检测	58
致谢	61
参考文献	61
第 3 章 毛细管电泳	63

3.1 毛细管电泳简介	63
3.1.1 毛细管电泳的定义、发展历史	63
3.1.2 毛细管电泳的若干相关名词	64
3.1.3 毛细管电泳的基本原理和基本参数	65
3.1.4 毛细管电泳的主要特点	70
3.1.5 毛细管电泳技术应用于蛋白质科学	71
3.2 用于蛋白质和多肽研究的毛细管电泳技术和方法	72
3.2.1 毛细管电泳中蛋白质和多肽的迁移行为	73
3.2.2 毛细管区带电泳	75
3.2.3 毛细管胶束电动色谱	78
3.2.4 毛细管凝胶电泳	79
3.2.5 毛细管等电聚焦	82
3.2.6 毛细管等速电泳	84
3.2.7 亲和毛细管电泳	87
3.2.8 毛细管电泳的联用检测技术	88
3.2.9 毛细管电泳的微量制备技术	90
3.2.10 发展中的毛细管电泳技术	92
3.3 蛋白质和多肽的毛细管电泳技术应用于分析生物技术	93
3.3.1 当代分析技术与生物制品	93
3.3.2 定性分析	94
3.3.3 定量分析	98
3.3.4 纯度分析	103
3.3.5 异质性分析	105
3.3.6 稳定性分析	106
3.3.7 过程的一致性和方法的验证	110
3.3.8 展望	110
3.4 毛细管电泳操作维护、常见问题和解决办法	111
3.4.1 毛细管电泳基本操作和维护	111
3.4.2 毛细管电泳实验中常见问题和解决办法	112
参考文献	115

第4章 自由流电泳..... 118

4.1 引言	118
4.2 自由流电泳理论	120
4.2.1 分离原理	120
4.2.2 影响因素	122
4.3 自由流电泳仪	129
4.3.1 自由流电泳仪的一般组成	129
4.3.2 一些商品化仪器	130
4.3.3 为克服一些影响因素所作的努力	132

4.3.4 为提高物料流通量所作的努力	135
4.4 自由流电泳操作	138
4.4.1 分离模式	138
4.4.2 分离缓冲液以及分离介质等的选择	141
4.4.3 缓冲液流速、上样速率和电压的选择	144
4.4.4 其他因素	145
4.4.5 自由流电泳的操作步骤	146
4.5 自由流电泳的应用	147
4.5.1 小分子	147
4.5.2 蛋白质	148
4.5.3 一些特殊物质	150
4.5.4 膜物质	150
4.5.5 细胞	151
4.5.6 在蛋白质组学中的应用	154
4.5.7 在空间微重力下分离蛋白质和细胞	155
4.6 结语	155
参考文献	155

第5章 毛细管电泳多维分离检测新技术————— 166

5.1 多维毛细管电泳方法概述	166
5.1.1 高效液相色谱-毛细管电泳多维分离技术	169
5.1.2 毛细管电泳-毛细管电泳多维分离技术	176
5.2 高效液相色谱-毛细管电泳二维分离技术	178
5.2.1 反相液相色谱-毛细管电泳-质谱联用系统	178
5.2.2 反相液相色谱-毛细管等电聚焦电泳-全柱成像系统	185
5.3 毛细管电泳-毛细管电泳二维分离技术	191
5.3.1 单细胞中蛋白质的二维毛细管电泳分离	191
5.3.2 芯片上二维电泳分离蛋白质酶解肽样品	195
参考文献	198

后记————— 200

第1章

电泳史

1.1 引言

在蛋白质分离、分析中，电泳是最重要和最普及的技术之一。

电泳最早指胶体带电粒子在电场中的迁移。俄国物理学家 Ренсе 于 1809 年在湿黏土中插上带玻璃管的正负极两个电极，加电压后发现正极玻璃管中原有的水层变浑浊，即带负电荷的黏土颗粒向正极移动，这就是电泳现象。1900 年前后，Pictonand Linder、Hardy、Ellis、Powis 等人研究发现，生物胶体，如蛋白质、酶等，都有一个特有的电泳淌度 (mobility)，它依赖于溶液的 pH，可以作为蛋白质的表征，这大大促进了电泳的研究^[1~3]。这一阶段经典工作的最好例子是 Michaelis 利用在不同 pH 缓冲液中蛋白质迁移的实验，测定了酶的等电点^[4]，并且正式提出电泳 (electrophoresis) 这一术语。当时，对蛋白质和酶的化学本质和物理性质知之甚少，从它们的电泳性质入手探讨问题，扩大对蛋白质表征和定量的研究，就很自然了。

电泳可以定义为带电的胶体粒子或大分子在外加直流电场中向带相反电荷的电极作定向移动的现象。显然，带电粒子的大小、形状、所带电荷的多少，以及介质的 pH、离子强度、黏度等都会影响到带电粒子的电泳速度。从电泳现象可以获得胶体粒子或大分子的结构、大小和形状等有关信息。

1.2 电泳理论概要

从化学角度来看，离子氛是指每个离子周围都有许多相反电荷的离子。离子的任何运动都被电的摩擦效应所阻滞，后者随着溶液的浓度增加而增加。换个角度看，在相当浓的溶液中，由于离子间的距离很近和形成可逆络合物的可能性大大增加，离子的运动很大程度上被电吸引力所阻滞。

从蛋白质化学来看，蛋白质是由成百上千个 20 种常见的氨基酸通过酰胺键连接而成的大分子，而且通过高级结构形成分子的卷曲和折叠。不同氨基酸残基有不同的侧链，所带的电荷也不同；蛋白质表面的表观净电荷也随环境 pH 的变化而变化。所以，蛋白质是一种带有电荷的胶体分子，它在缓冲液中形成离子氛，对电场内离子的运动有阻滞作用。而缓冲液在所处 pH 条件下，形成一定量电离和不电离的酸，互处于平衡状态，而且是一种完全可逆的平衡。

蛋白质在不同 pH 缓冲液中的离子化，以及缓冲液的电离和导电性，构成了电泳的理论基础。带电的蛋白质分子在电场中被电流所移动，泳动的程度的大小即为淌度 M (mobility)。泳动率与分子电荷净密度成正比，而与分子与介质间摩擦力成反比。

$$M = \frac{\text{电压(mV)} \times \text{电荷净密度}}{\text{分子与介质间摩擦力}}$$

摩擦力与分子大小（分子大，摩擦力大）、形状（例如，与球蛋白的摩擦力小，淌度则大）有关。

蛋白质的带电性：蛋白质的净电荷，取决于环境 pH 的高低，pH 高于 pI （等电点），蛋白质带负电荷，向正极泳动；pH 低于 pI ，蛋白质带正电荷，向负极泳动。在电泳系统中，电子由负极流向正极，带负电荷的分子向正极泳动，带正电荷的分子向负极泳动，不带电时则不泳动，即 pI 。

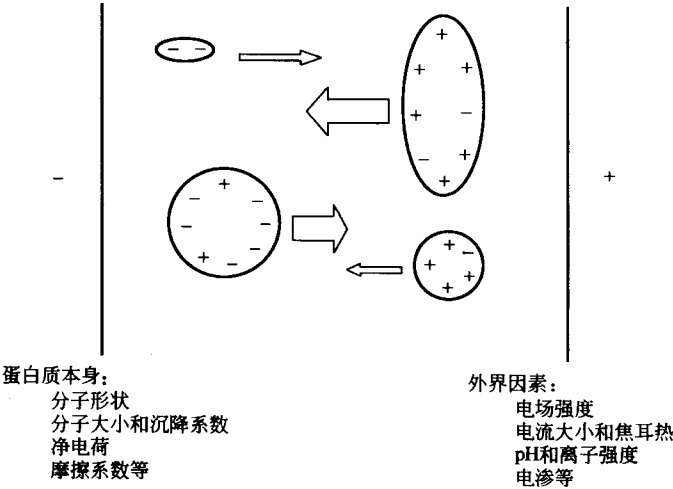


图 1-1 电泳原理和影响因素示意图

通过图 1-1 可以简单地讨论蛋白质的电泳。中间是电泳室内的带正负净电荷不同的蛋白质分子，它们的大小不同，形状也不同，这些都是蛋白质本身性质所决定的，影响着电泳。因此，蛋白质的电泳分离与蛋白质本身分子

的大小（电泳过程中的沉降力）和带电状态有关。

此外，我们注意到缓冲液的浓度直接影响到电泳的电流大小，因为随着溶液的稀释表观离解度变大，电导率增加。

温度增高，电导率随之增加，这种增加是由于溶液中离子运动加快的缘故；所以温度会影响电泳的结果和稳定性。

再则，可以注意到，在电泳过程中，正负电极附近的溶液成分会有差异，表现在 pH 上会有所差异，它们与中央部分不同。当缓冲液重复使用时，需要注意这一现象并加以纠正。

因此，除蛋白质本身因素外，电泳与所加电场的强度有关；与缓冲液的 pH、离子浓度有关；与温度（焦耳热）有关，一般而言，温度上升 1℃，介质黏度下降，分子运动加剧，扩散快，淌度上升 2.4%；与支撑介质的性质有关（电渗），在毛细管电泳中，更为突出；与外加的表面活性剂、有机溶剂等有关。

1.3 电泳的发展和分类

电泳最早是在溶液中进行，但溶液中待分离混合物容易因温差引起的对流而扩散。在 1950 年前后欧洲科学家用滤纸作为支撑介质分离蛋白质，但是又因为滤纸与待分离分子间的吸引力大，导致摩擦太大而发热（可以想象，人在纸浆中游泳的感觉一定不会好）。所以，如今多用含水量很高的凝胶体系作为支撑介质。

电泳原则上分为两大类，即没有支撑介质的液相电泳和有支撑介质的区带电泳。

(1) 液相电泳 界面移动电泳 (moving boundary electrophoresis, 又名 Tiselius 电泳)，毛细管电泳，自由流电泳。

(2) 区带电泳 (zone electrophoresis) 目前以纸电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳应用最为广泛。

区带电泳因为对仪器要求不高和价廉，被分离的样品能染色呈条带状、很直观，所以受到欢迎，发展趋势很好，但同时也牺牲了界面电泳的若干优点，因此近十多年来，毛细管电泳和自由流电泳得到迅速发展，被称为第二代液相电泳^[5]。电泳的详细分类参阅表 1-1。

1.3.1 界面移动电泳

人们一般认为 Tiselius 是电泳之父。但根据资料，200 多年前就有电泳的记载，术语电泳 (electrophoresis) 最早是 Michaelis 于 1909 年引入，描述胶体粒子在电场中的迁移。1923 年 Kendell 发展了分析电泳方法，1925 年

表 1-1 电泳的分类

界面移动电泳(Tiselius 电泳)		
区带电泳		
以介质分类		以形式和功能分类
纸电泳		水平电泳
醋酸纤维素电泳		垂直电泳
琼脂电泳		柱电泳
淀粉电泳		薄层电泳
淀粉凝胶电泳		免疫电泳
聚丙烯酰胺电泳		盘状电泳
等电聚焦		制备电泳
电印迹		双向电泳
第二代液相电泳		
毛细管电泳		
自由流电泳		

Tiselius 才继承前人工作，将移动界面的观察转变为一种分析方法。他的贡献是光学方法上的发展，能将一个无色移动界面的折射率变化定量地记录下来，并应用恒温装置来维持最适的温度（4℃）以防止扩散，结果获得一个能定量分析血清蛋白质的方法。完整的工作发表于 1937 年，1948 年 Tiselius 获得诺贝尔化学奖。

最广泛使用的 Tiselius 电泳池如图 1-2 所示，它由三部分组成（Ⅰ，Ⅱ，Ⅲ），电泳池呈 U 形，Ⅱ可以在Ⅰ和Ⅲ之间依赖硅脂封闭和滑动（图 1-2），在 A、B 状况下完成样品和缓冲液的注入，然后移动上下的滑板 a-a' 和 b-b'，使Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ部分贯通，开始电泳（图 1-2 C）。U 形管的体积约 11ml，通常需要 1% 的样品浓度。电泳池浸在大体积的 4℃ 冰水槽中以维持电泳池内蛋白质样品和缓冲液的温度恒定，防止电泳过程中产生的焦耳热引起温度梯度变化，导致液体对流而破坏电泳分离。因为 Tiselius 电泳是没有支持介质的全液相电泳，温度的恒定显得更为重要。

在电泳过程中，应用蛋白质胶体溶液与缓冲液之间折射率的差别，用光学系统观察电泳情况。图 1-2C 中可见，蛋白质在 U 形管中于所加电场下移动，左侧由下向上移动（上行），右侧由上向下移动（称之为下行）。在蛋白质和缓冲液的交界面上可以用光学系统检测到蛋白质的纯度和分离情况。值得指出的是，上行和下行的分辨率可能不同。

光学检测部分也有不同的组成部分，图 1-3 介绍一种直观的、可用照相机拍摄记录的系统。Tiselius 的贡献在于光学方法上的发展，这个方法能将一个无色移动界面的折射率变化定量地记录下来。

20 世纪五六十年代，Tiselius 电泳可是一件大型仪器。一天从早到晚只能做一次实验，因为样品和缓冲液在恒温槽中达到温度平衡需要很长时间，电泳开始到结束又需几个小时。

Tiselius 电泳可用于鉴定蛋白质样品的纯度，也可用它测定蛋白质的等

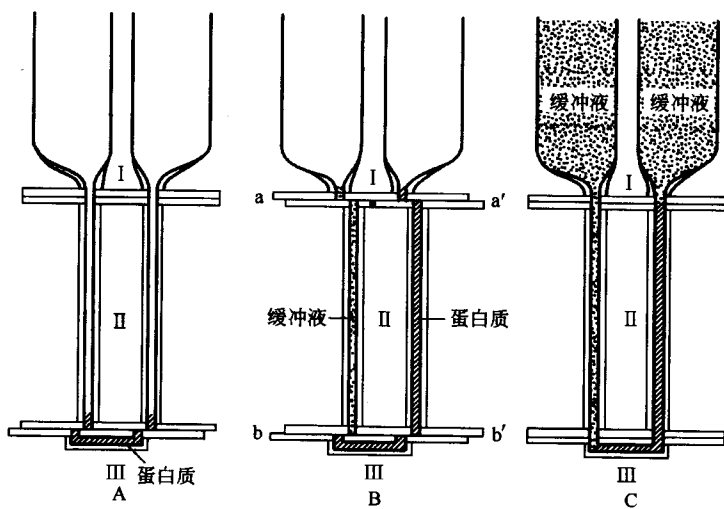
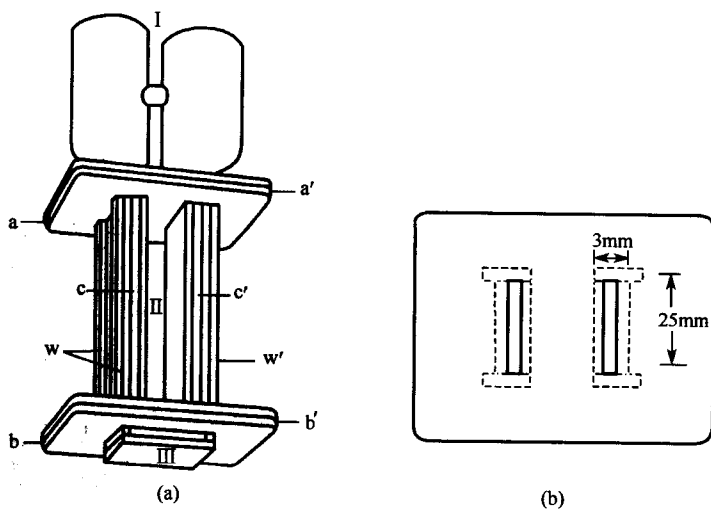


图 1-2 Tiselius 电泳原理图

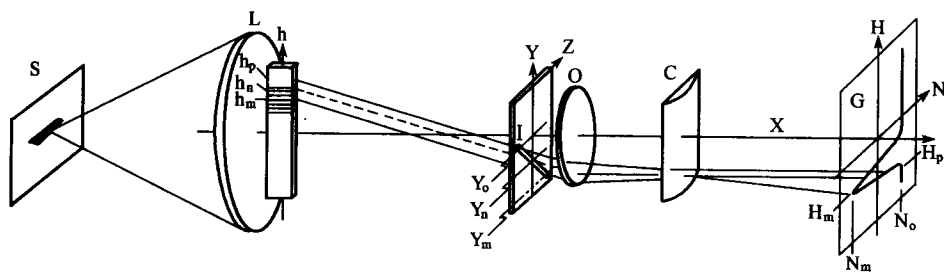


图 1-3 Tiselius 电泳光学系统

电点。后者是用同一样品对不同 pH 的缓冲液充分透析，然后在相应 pH 的缓冲液中实验，得到样品的淌度后，以淌度为纵坐标，pH 为横坐标作图，淌度为零时的 pH 即为该样品蛋白质的等电点（图 1-4）。

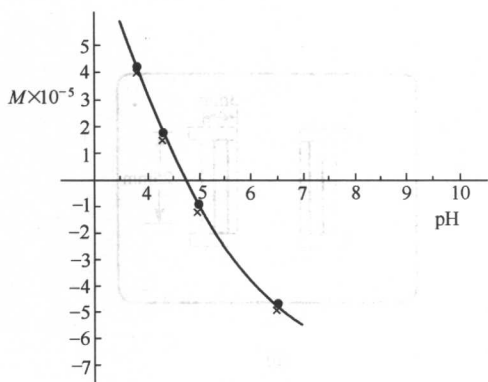


图 1-4 人血清白蛋白等电点的测定

图中 M 仅作示意，未提供单位

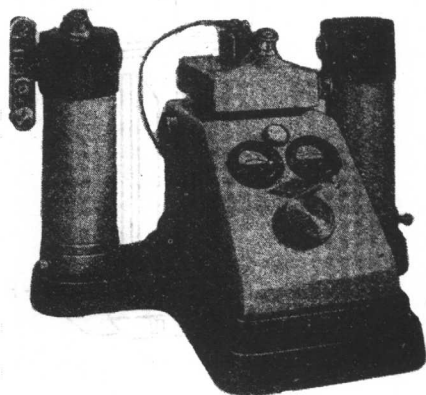


图 1-5 Antweiler 电泳仪

后来有一种微量的 Antweiler 仪器，在有些实验室俗称“小电泳”（图 1-5），以区别于“大电泳”（Tiselius 电泳）。小电泳只需 1ml 1% 的蛋白质样品。

1.3.2 区带电泳

有载体的区带电泳（如琼脂电泳、淀粉电泳、纸电泳等）的优点是被分离的蛋白质呈很窄的条带，非常直观，仅需少量样品，能用价廉而简单的设备快速进行分析；但也牺牲了界面法较高的准确性，不能进行淌度和等电点的测定。

区带电泳根据不同载体而分为琼脂电泳、纸电泳、淀粉电泳、淀粉凝胶电泳等，都起过很大的作用；从应用角度，又分为分析电泳、薄层电泳、制备电泳、柱电泳等；从功能角度，分为免疫电泳等。

在 20 世纪 60 年代中期出现的聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）起了很大作用，成为每个生物学实验室必备的常规仪器。近十多年来的双向电泳（以等电聚焦为第一向，SDS-PAGE 为第二向）也是家喻户晓。

（1）纸电泳 常规纸电泳。20 世纪 50 年代是蛋白质电泳分析发展的全盛时代，欧洲的科学家，以 Durrum 为代表^[6]，在蛋白质的纸电泳作出了很大的贡献，同年 Cremer 和 Tiselius 发表了定量测定的报道^[7]。最简单的纸电泳可以用一块玻璃搁在两个烧杯上进行。图 1-6 是典型的纸电泳仪器， E_1 和 E_2 分别是电极， F 是区带电泳的载体（纸）， G 代表玻璃盖板， R 是塑料搁架。注意，在电极室有隔离装置，防止电极上产生的气泡扰动电泳分离。血清蛋白质的分离在 pH 8.6、0.05mol/L 的巴比妥缓冲液中进行数小时，电压一般在 200V 左右。在电泳后和染色前，常用化学法或加热（110℃，

20min) 变性固定蛋白质在载体上, 以防失染色和脱色时蛋白质的流失。早期常用的蛋白质染色剂有氨黑 10B、溴酚蓝等。

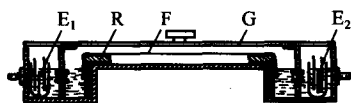


图 1-6 纸电泳仪器

E_1 和 E_2 —电极; F—滤纸条; G—盖板; R—塑料搁架

关于蛋白质的定量, 一种方法是滤纸条直接在光度计上读数测定, 另一种方法是将蛋白质条带浸泡在碳酸钠-甲醇溶液中, 抽提半小时后在 595nm 下测定光吸收值。各种蛋白质对染料的吸附能力并不相同, 白蛋白强于球蛋白, 需将光吸收值乘以校正因子来计算。

纸电泳与 Tiselius 的自由电泳相比有下列一些优点。

① 移动速度不同的物质能够完全分离成条带而并非仅是界面的分离。

② 在纸上区带电泳中所谓界面异常现象 (boundary anomalies) 干扰较少, 因此也可以用来研究低分子 (如氨基酸、肽等)。此外, 纸上区带电泳仅需少量样品, 并能用简单而价廉的设备进行。

但是, 在取得这些优点的同时, 也牺牲了界面电泳较高的准确性, 尤其是关于淌度和等电点的测定。区带电泳的支持介质也带入一些新的因素, 如纸电泳的滤纸是纤维素, 本身携带有电荷, 这些因素能以一种难以控制的方式影响电泳的结果。

影响电场中蛋白质移动的因素已有概述, 这里简单讨论有关纸电泳的特殊问题。

① 电渗。在常规的血液蛋白质纸电泳中采用 pH 8.8 的巴比妥缓冲液, 滤纸通常含有一定数量的羧基, 后者在 pH 8.8 时将有很大程度的电离, 即滤纸的负电荷而引起的电渗移动。通常厚滤纸 (Whatman 3MM 或新华 3 号) 比薄滤纸 (Whatman No. 1 或新华 1 号) 的电渗大。如何来校正电渗流, Kunkel 和 Tiselius^[8] 在滤纸旁放置一点葡聚糖 (dextran)。葡聚糖是一种中性的多糖, 它和蛋白质一样也可以用溴酚蓝染色并且它的移动被认为与电渗移动相一致。利用这个原理, 可以进行电渗的校正和测定离子的迁移率。

② 蛋白质会因发热而变性, 导致蛋白质拖尾现象。蛋白质因热变性的拖尾现象, 在其他载体的区带电泳, 如醋酸纤维素电泳、琼脂电泳、淀粉电泳、淀粉凝胶电泳, 直到目前普及应用的聚丙烯酰胺凝胶电泳, 已有很大改善, 同时大大增加了上样的体积。

以血清蛋白为例, 纸电泳和琼脂电泳一般分离成 5 个组分, 而醋酸纤维素电泳能分辨成 7~9 个组分, 淀粉凝胶电泳可分辨成 20 多个组分, 近代的聚丙烯酰胺凝胶电泳分辨率更高。