

电 泳

M. 比 尔 主 編

电 泳
理論、方法和应用

M. 比 尔 主 编

姚 侃 等 译

科 学 出 版 社

1 9 6 6

Edited by
MILAN BIER
ELECTROPHORESIS
THEORY, METHODS, AND APPLICATIONS
Academic Press
1959

内 容 简 介

本书是由 Milan Bier 编辑并由许多有关方面的著名学者分章撰写而成。

全书分为三部分:第一部分讨论电泳的理论,包括:胶体体系的电势;蛋白质的酸碱平衡;自由电泳的理论等。第二部分讨论电泳的方法,包括:移界电泳(自由电泳)的实用;纸上电泳;在不同支持介质上的区带电泳;无支持介质的制备电泳等。第三部分讨论电泳的应用,包括:移界电泳在蛋白质系统上的应用;电泳在生理及临床上的应用;病毒、细菌、细胞的电泳及显微电泳方法;区带电泳的应用等。

本书供生物、生物化学、生理、医学等方面的科学工作者及有关的高等院校师生或某些轻工业生产企业的技术人员阅读或参考。对于要掌握电泳技术的人员是一本比较全面而切合实用的参考书。

电 泳

M. 比 尔 主 编

姚 侃 等 译

*

科学出版社出版

北京朝阳门内大街117号

北京市书刊出版业营业许可证出字第061号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1966年2月第一版 开本:850×1168 1/32

1966年2月第一次印刷 印张:17 1/4

印数:0001—2,400 字数:455,000

统一书号:13031·2227

本社书号:3380·13-10

定价:[科七] 2.90 元

序

电泳对我们关于蛋白质的知识的助益不亚于其他方法。在生物化学、生理学和医学中均可看到它的促进作用。

近年来已经看到许多新实验技术的广泛发展以及它们在许多其他物质方面的应用。因此出版一本权威的著述,讨论其理论、方法及其正确的应用,将可弥补现存文献中的这种空白。希望这本由许多人共同努力而编成的书能完成上述任务,同时希望这里所收集的文章不仅对从事这个领域工作的实验工作者和理论工作者有价值,并且对所有从事蛋白质、聚合电解质和一般的胶体化学等各个方面的研究人员也有所裨益。

本书着重地阐释关于电泳的基本原理,及其中所遇到的问题以及解决的方法。只要详细的实验操作步骤可以用来说明这些问题的时候也尽可能包括进去。所有应用电泳技术的重要领域,如临床医学、蛋白质、病毒、细菌和其他生物物质的研究,在有机化学和无机化学中的分析应用,制备的和工业的应用等都包括进去了。

M. 比尔

纽约
1958.12.

目 录

序	iii
绪论 (Arne Tiselius)	1
第一章 胶体系统内的电势 (J. Th. G. Overbeek 和 J. Lijklema)	7
一、绪言	7
二、关于界面层结构的一般概念	8
三、双电层内的电荷和电势	9
四、离子的双电层	14
五、电动电势	33
参考文献	35
第二章 蛋白质的酸碱平衡 (K. Linderstrøm-Lang 和 Sigurd O. Nielsen)	39
一、绪言	39
二、离子的稀溶液的静电理论	40
三、简单的酸碱平衡 pH	45
四、蛋白质的酸性基和碱性基	50
五、多元酸中的静电相互作用	56
六、蛋白质酸碱平衡的热力学处理	62
七、蛋白质酸碱平衡的分子的解释	70
八、实验的滴定曲线	84
参考文献	93
第三章 移界电泳——理论 (L. G. Longsworth)	98
一、电泳方法	98
二、强电解质形成的移动界面	102
三、蛋白质的电泳	113
四、弱电解质移界系统	121
五、蛋白质-离子的相互作用	126

• ▼ •

六、蛋白质-蛋白质的相互作用	129
七、反应界面	132
八、可逆的界面散开	138
参考文献	141
第四章 移界电泳——实用 (L. G. Longsworth)	144
一、绪言	144
二、Tiselius 仪器	145
三、界面的观察和照象	148
四、电泳图形的分析	163
五、用于电泳的溶液的制备	169
六、导电率的测量	173
七、对流的控制	174
八、电极和电极室	177
九、制备自由电泳	180
十、结论	182
参考文献	182
第五章 纸上电泳 (Ch. Wunderly)	185
一、绪言	185
二、理论基础	187
三、方法	194
四、结论	222
参考文献	222
第六章 在不同形式支持介质中的区带电泳 (Henry G. Kunkel 和 Rodas Trautman)	230
一、绪言	230
二、方法	231
三、不同支持介质的比较	242
四、特殊应用	246
五、因支持介质所致的理论上的复杂性	250
参考文献	266
第七章 无支持介质的制备电泳 (M. Bier)	270
一、绪言	270

二、密度梯度电泳	273
三、电渗作用	278
四、电泳-对流	288
五、压力-流注电泳	299
参考文献	314
附录——非水溶剂	318
附录的参考文献	319
第八章 移界电泳在蛋白质系统上的应用 (R. A. Brown 和 S. N. Timasheff)	321
一、绪言	321
二、缓冲液对电泳的影响	322
三、蛋白质的多相性	331
四、蛋白质系统中的相互作用	342
五、蛋白质的变型	362
参考文献	366
第九章 电泳在临床和生理学中的应用 (Dan H. Moore) ...	372
一、血浆	372
二、体液及相关物质	408
参考文献	421
第十章 病毒、细菌和细胞的电泳及电泳的显微镜方法 (Charles C. Brinton, Jr. 和 Wax A. Lauffer)	427
一、绪言	428
二、关于病毒和细胞水悬浮液的理论 and 计算	429
三、显微镜方法	438
四、由电泳法所得有关病毒、细菌和细胞的知识	454
五、研究结果	465
参考文献	486
第十一章 区带电泳的应用 (Theodor Wieland)	493
一、一般的实验条件	493
二、可以电泳分离的混合物	501
参考文献	527
内容索引	532

緒 論

“电泳”(electrophoresis)或“阳离子电泳”(cataphoresis)一词原来提出的时候,意思是指荷电的胶体颗粒在电场中的移动。正如胶体的定义一样(此定义相当含糊),特别象胶体系统与分子系统间的区别一样,关于“电泳”一词应当使用的广度还有些不同的意见。在化学(特别是在生物化学),关于物质在电场中移动的许多应用方面,这种含糊不清显得特别突出。某些作者显然喜欢将“离子电泳作用”(ionophoresis)一词应用于低分子量的物质,特别是当实验是在稳定的介质如凝胶和粉末中进行的时候。这个名词有时用来区别这种稳定化了的移动作用和 在自由溶液中的移动,但是似乎是不尽合乎逻辑的。

最近十年来关于这类方法的应用发展得特别快,概括了从最大的蛋白质分子直到如氨基酸,糖,嘌呤,嘧啶甚至简单的无机离子等整个领域,应用了在本质上是同一类型的仪器和操作方法,而不管所研究的物质分子的大小。由于这种原因——可能也是由于历史的原因——大多数这方面的研究工作者好象喜欢用已经公认了的名词“电泳”作为所有这种操作方法的共同名称,特别是当研究的主要目的是关于分离问题的时候。这种情况与层析法一词的应用有些相似,层析法一词现在肯定已不局限于专指有色物质的分离了。

在小离子移动的物理化学理论中,按照 Debye-Hückel 的理论,有一种“电泳的”因子,它决定于环绕每个离子的离子雾中的扩散双电层。当离子的大小越大,溶液的离子强度越高时,此因子的作用就变得愈明显。因此从自由的离子移动到电泳现象其间是逐渐

地连续地转变的，而在电泳现象中表面电势和双电层的因素起着决定性的作用。

从对胶体的电泳研究的起始，对于淌度与表面电荷或表面电势间的关系即归入重要的地位。可以用相对的简单的方法研究电泳移动作用并有适宜的方法去测定这些性质，而这些性质对于许多胶体系统，特别是疏水胶体的稳定性是有根本的重要性的。Picton 和 Linder^[1,2]、Hardy^[3,4,5]、Ellis^[6] 和 Powis 等^[7]的早期研究是这种类型工作的例子。Hardy 发现，许多生物胶体如蛋白质、酶等表现特殊的电泳淌度，此淌度在很大程度上决定于溶液的 pH，这种现象大大地引起了在电泳研究工作^[3,4,5]上的兴趣。现在用电泳性质，特别是它们的等电点，作为对这些物质的鉴定，开始吸引着人们的兴趣。

一个早期的例子是 Michaelis^[8] 的经典性的工作，他用在不同 pH 值下的移动性实验测定酶的等电点。有意义的是这种鉴定在尚未获得纯酶之前即可进行：Michaelis 在通电流之后，分析 U 形管两臂内容物中的酶活性，以确定其移动的方向。

在那个时候关于蛋白质和酶的化学本质与物理性质知道的很少。它们的电泳性质引起注意是很自然的，因为这些性质在一定程度上内显得是特征性的，并适于定量的研究，虽然准确的测定看来是难于做到的。

自此以后电泳方法已经继续改良。建立了界面无扰动的移动的条件，对大量的生物学上的重要物质（特别是蛋白质）在不同介质中的移动速度做了准确的定量测量。一种重要的方法是依靠对界面移动的研究，此界面系由溶于具有准确的 pH 值的缓冲液与其下一层具有同样组分的缓冲液中的蛋白质构成的（即“移界方法”）。关于用高度灵敏的光学方法以观察界面移动以及它们在复杂系统中分开为几种组分的采用，不仅便于准确地测量淌度，同样也开辟了关于混合物的“电泳分析”的可能性。这样的混合物系统在生物化学工作中是常常碰到的，因为生物化学中许多物质都是从生物材料的提取中取得的。改良了的方法逐渐导致一些结果，

这些结果证明电泳性质的高度的特异性。一些物质过去用一般的标准衡量,如结晶作用,相信它已相当确定,可是有时在电泳分析中却发现它分成两个或更多的组分,现在当用其他方法难以确定的时候,电泳方法就被广泛地用作物质纯度的一种重要标准。

考虑到电泳方法的温和性,可以认为在这种情况下由电泳研究所获得的知识是特别可靠的。其他分离手续的应用包括沉淀或非水溶剂的应用或其他攻击性试剂的应用,很容易引起物质的破坏,因为许多生物胶体是不稳定的。此外当将大分子量的物质进行结晶或沉淀时,用这些方法,共沉淀和吸附现象容易干扰分离工作。在电泳分离中(如同在超速离心作用中以及相似的“转输方法”中一样),在整个过程中,移动的物质处于同一介质中,并且观察方法的本身易于对伴随分离作用而出现的最终的不可逆变化给以预示。

在许多生物化学上重要的物质中,其电泳行为上的不同对分离作用是很有用的。如果有两种不同的蛋白质,在所有可进行研究的pH范围中具有相同的淌度,这显然是不常见的事,甚至在移动性上很小的差别,也可用于这种现代化的研究方法。

因此关于分离的研究已经在更广泛的范围内处于显著地位。应用移界方法的电泳分析,采用折射率的观察,可以有很高的分辨力,并且适于借其淌度对被观察的组分进行鉴定,而淌度是可以在规定好的条件下测定的。然而这种方法只能使界面分开,并且在实验终了时各组分只是部分地分开。只有一些速度最快的和最慢的组分可以从电泳管中取出。因此,这种形式的电泳分析对于研究者可作为一种用其他方法进行分离的指导,而它本身不能作为一种分离手段。在某种程度上它和金属纯化作用中光谱分析的用途相似。

因此关于真正的将混合物电泳分开成为“个别物质”的问题即成为一个重要的议题。非常希望利用在移界方法中能够用光学方法观察到的有效的分离,目的在于分离这些组分以进一步研究它们的化学的和生物化学的性质,并最后建立适于制备规模的方法。

因此重迭的“界面分离”就为“区带分离”所代替,后者使每一组分能形成带状与其他组分借空白区域分开。然而这就需要在方法上作一些根本的改变。这种区带在重力上是不稳定的,并且在一般的电泳管内会引起对流。为避免这种现象,管中必须填充某些稳定的介质,如淀粉、纤维素、或玻璃粉、或者实验必须在凝胶中或滤纸条中进行。

然而不只是由于要完全的分开才引起这种发展的。早期一些成功了尝试是,在凝胶或滤纸条中进行电泳实验时,只需要很简单的仪器并且需要的研究样品很少。纸条电泳的发展显然是接受了来自下列两方面的刺激:纸上层析的巨大成功以及为满足临床血清电泳分析所要求的简单而微量方法的日益增长的需要。

我们在 Uppsala 曾建议以“区带电泳”作为此类方法的名称,以与前述“界面电泳”区别。区带电泳可以在不同种类的稳定介质中(或在密度梯度中),在不同形式的管柱或槽中进行,也有能连续分离大量样品的装置。纸上电泳与这些方法的密切关系正如纸上层析与柱上层析的关系一样。

经验证明,区带电泳也能应用于低分子量物质如多肽、氨基酸和核苷酸,这些物质用界面电泳方法是不易研究的。因此电泳分析的应用已有相当的发展,并且这种方法常可与层析法相竞争,例如对蛋白质水解产物的部分分离。然而由于引入一种载体系统,此载体系统在区带电泳中是区带的稳定所必需的,所以不可避免地必须牺牲某些定量测定准确的可能性。起稳定作用的物质在量上大大地超过被研究物质,并且那些影响准确度的相互作用处于一种极难避免的不可控制的情况,虽然曾经企图尽可能地寻找一种惰性的填充物。纸上电泳也碰到其他一些复杂的情况,例如由于电流通过纸条而升温所致的蒸发作用。在这些情况下,必须参考同时进行的平行实验中所观察到的已知物质的准确度。

当实验的目的单纯地在于制备或分离时,人们常常准备放弃某些定量的解释,特别是在能达到高度的分辨力的时候,那是很自然的。然而借准确度来鉴定新的组分的可能性也常常是电泳方法引

人注意的特点,此新组分作为界面或区带常是可以看见的。因此希望对这样的一些操作方法也能了解到它的全部细节,以便合理地预知在这样的系统中所能达到的分离效率,在这些操作中常有其他现象干扰,这些干扰甚至是有助于提高分离效率的。

在电泳的早期历史中就想创造具有相当容量的分离仪器。具有膜的多室仪器已经成功地应用了,并且还有其他形式的仪器利用适宜的分析方法研究移动作用。其他形式的操作步骤——电泳对流——已为 Kirkwood 及其合作者建立起来,它对于大量材料的制备分离是很有效的。

在研究有关控制电泳现象的基本的物理化学定律中,显微镜方法起了重要的作用,这种方法是用显微镜直接观察胶体颗粒的移动。这种方法也能鉴定生物材料,最近用这种方法鉴定细菌的表面也得到了非常有意义的结果。

本章绪论主要讨论了电泳应用于水溶液中的生物化学物质,这通常是在一定 pH 的缓冲介质中进行的,无疑的这样的工作今天在此领域中占据着主要地位。然而不能忘记介质中其他成分影响电泳性质的可能,例如除 H^+ 离子外的其他离子和不同的复合物-生成剂等的影响。糖类和多糖类在含硼酸盐的介质中的分离是应用这一原理的一个很好的例子。

关于在非水溶剂中的电泳研究得很少。当然在这种介质中电导所遵守的定律与在水溶液中有效的定律不同,其电导常是很低的。另一方面可以采用高电压来补偿,由于电流很小则不会引起很大的热效应。对这样的系统的研究无疑是值得进行的。

电泳方法的发展及其应用是物理方法在生物化学和生物学问题的应用中一个具有成果的不平常的范例。希望将来的发展——很多工作仍待进行——由不同科学领域间密切合作而获得益处。

(姚 佩译)

参 考 文 献

- [1] H. Picton and S. E. Linder, *J. Chem. Soc.* 61, 148 (1892).

- [2] H. Picton and S. E. Linder, *J. Chem. Soc.* **71**, 568 (1897).
- [3] W. B. Hardy, *J. Physiol.* (London), **24**, 288 (1899).
- [4] W. B. Hardy, *Proc. Roy. Soc.* **66**, 110 (1900).
- [5] W. B. Hardy, *J. Physiol.* (London), **33**, 251 (1905).
- [6] R. Ellis, *Z. physik. Chem.* (Leipzig) **80**, 597 (1912).
- [7] F. Powis, *Z. physik. Chem.* (Leipzig) **89**, 186 (1915).
- [8] L. Michaelis, *Biochem. Z.* **16**, 81 (1909).

第一章 胶体系統內的电势

- 一、緒言
- 二、关于界面层结构的一般概念
- 三、双电层內的电荷和电势
 - 1. 电荷
 - 2. 电势
 - 3. 电化电势
 - 4. 自发电池
 - 5. Galvani 电势和 Volta 电势; χ -电势
 - 6. 决定电势的离子
 - 7. 油-水和气-水界面
- 四、离子的双电层
 - 1. 扩散双电层
 - 2. 离子的有限大小和特异性的影响以及 Gouy-Chapman 理论的其他校正
 - 3. 曲面上的双电层
 - 球面的界面
 - 圆柱形的对称
 - 4. 环绕聚合电解质的双电层
 - 在聚合电解质螺旋內的以及环绕螺旋的电荷和电势
 - 聚合电解质的滴定曲线
- 五、电动电势
- 参考文献

一、緒 言

电泳是混悬于液体中的荷电颗粒在外加电场的影响下的移动。电泳实验的一般目的在于获得关于围绕颗粒的双电层的知识,分析一个混合物或是将它们分开成各个组分。

为了前一目的就需要一种理论,此理论将电泳速度与和双电层有关的基本的量如电势、电荷及结构等联系起来。本章的目的在于讨论双电层的电荷、电势等概念的意义,指出与这些概念有关的可能产生的混乱,以及讨论它们与电泳及其它电动现象的内在关系。

双电层的理论处理决定于它的几何学。最简单的情况就是在平面界面的双电层,这将首先予以讨论。用这样的例子,已经可以解释与双电层有关的许多事实。随后,本章中将着重讨论更复杂的系统:球形颗粒,聚合电解质和蛋白质。

二、关于界面层结构的一般概念

两相间的界面不是一个数学平面,而是具有一定厚度的一层。两个相邻的相的性质经过一个相当距离逐渐改变。这些变化决定于两个因素:分子间的力(van der Waals' 力,纯粹的静电引力,氢键等)和几何因素(两个表面层的相互吻合)。甚至在一个单组分的系统中,分子的密度和定向作用也是逐渐变化的,例如当从液态进入气相的时候。这种现象已由 Bakker^[1] 在他的关于毛细现象的理论中广泛地研究过了。在多组分系统中界面层的浓度照例的与其本体内的浓度不同,这就是通常所谓的吸附作用。

在大多数的情况下,接近界面处的变化局限在很少的几层分子之内,但是在这里各相的所有的性质是改变了的,包括结构、密度、组成、介电常数、粘度等。假若一相中或两相中含有离子,则过渡层可能更宽。在这种情况下,由于短程力的作用常常发生某一形式的离子强烈地浓集在两相的界面的现象。具有一个相当大的疏水部分的离子,如去垢剂,虽然能溶于水,但有一种趋向使它从水相中被排斥到任何极性较小一相的界面上,因此它就浓集在特别是气-水或油-水的界面。同样, Ba^{++} 和 SO_4^{--} 离子比许多其他离子更容易吸附在 BaSO_4 的结晶上,因为它们适合于 BaSO_4 的晶格。还可举出许多其他的例子。

但是如果一种符号的离子被吸附在界面上,则具有相反符号的离子将被由此所引起的电场吸引并且也浓集在界面的附近。这种“抗衡离子”(Gegenions)的堆集当然会受到它们的布朗运动的反作用。其结果是生成在电性上总的说来是中性的双电层。此双电层的厚度可达数百埃($\text{\AA}$)或甚至更厚。这种双电层的结构将在下节中更详细地讨论。

电泳意味着一个相对于另一相的一种正切运动。它只是当两相带有相反的自由电荷时才会发生。靠近界面层的偶极分子的定向作用,虽然在两相间造成电势差,但并不能引起电泳现象,因为偶极分子的电荷并不能被外加电场的作用永远地分开。所以电泳

现象与双电层的离子的部分是紧密相关的，并且任何对电泳的理论探讨必须从研究这种双电层开始。

三、双电层内的电荷和电势

1. 电 荷

如上所述，双电层的总电荷是零，但是离子和电子在其中因吸附作用可能被浓集起来。原则上，用分析方法可以测定吸附在界面的任何种类离子的量，然而实际上常常不是这样。并且这样测量并不能使我们得到关于这些电荷载体在空间分布上的任何知识。但是作一简单的理论上的考虑对我们很有帮助。例如，假定我们已经知道电子和钠离子在金属和盐溶液的界面浓集，显然电子存在于金属相，钠离子在水相中。这样我们认为金属相对水相来说为负性，电荷的量可由过剩的电子电荷或由具有相反符号的钠离子的电荷决定。关于电荷载体的空间分布的进一步知识则需要更精密的理论，这些将在第IV节离子的双电层一节中讨论。

2. 电 势

电荷在空间的分布当然是和某一种电势相关的。然而关于在界面层内和接近界面层的电势的正确本性问题，则是一个有着许多困难的问题。就空间中两点间的电势差而论，若规定为从一点到另一点转送一定数量电荷所需做的功，那么问题就来了，是否所做功的量与携带此电荷的物质无关？可以设想在溶液内从A点运输一个氢离子到B点，与在同样的两点间运输一个钠离子所需的功有同样的数量。但是，当它越过界面时，则所做功的量就不同了，因为除了纯粹的静电功以外，在改变环绕着钠离子（或氢离子）的外层时还要做构型的功，也叫化学功。对于 H^+ 和 Na^+ 这种构型的功是不同的。另外，没有方法很清楚的将化学功与电功分开，并且也没有更好的理由采用一种电荷载体而不采用其他的载体，看来如同我们还没有任何方法测定电功一样，因此也无法测定两个

不同相之间的电势差。对于测定两个具有不同组分的溶液间的电势差也有着同样的困难。

3. 电化电势

Guggenheim^[2] 曾重复地指出不可能将转移 i 离子所做的功的化学部分和电的部分分开,并且介绍了电化电势 η_i 的概念,它由化学势 μ_i 和另一项 $z_i e \varphi$ 构成,此处 z_i 是离子的电荷, φ 是电势

$$\eta_i = \mu_i + z_i e \varphi \quad (1-1)$$

在任何实际的运输过程中只有电中性的结合可被运输。在这种情况下 $z_i e \varphi$ 一项的总和为零,对于电中性的结合

$$\sum_i \eta_i = \sum_i \mu_i \quad (1-2)$$

习惯上仍然喜欢用“两相间的电势差”的名词标示,为了清楚地研究它的意义是什么,让我们简单地讨论一下自发电池 (galvanic cell)。

4. 自发电池

自发电池的电动势 (e. m. f.) 理论上已经很好的规定了;它与电池中的总的化学过程紧密相关^[3],并且可用很明确的方法,用测量连接电极的导线间的电势差的方法加以测量。这些导线是同一物质的,因此在它们之间所测的电势差与所用的电荷载体无关。

另一方面,电动势可以看作是电池内各相界面间所发生的电势陡变的总和,虽然,如上面已经证明了的,不可能分开地去测量每个单个的电势陡变,它们的总和是已经明确了的。但常常能改变电池中的一相,例如改变一个溶液的浓度,使得在各个交界面中只有一个界面的电压降受到严重的影响,在这种情况下电动势的变化直接地相应于这一单个的界面上电势陡变的变化。

用于测定 pH 的电池可以作为一个例子。这个电池包括五个界面,可描写如下: