

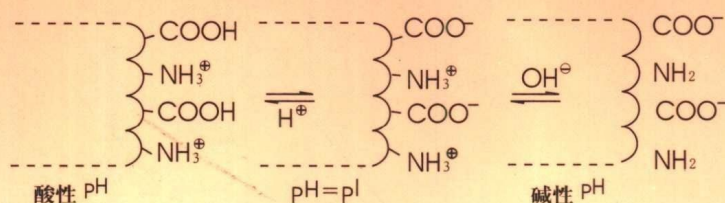
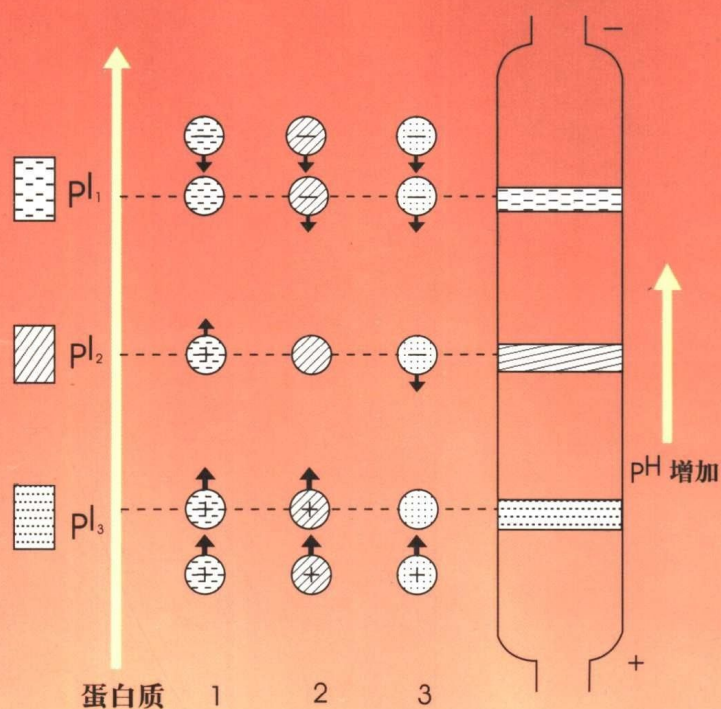


生物化学实验技术丛书

电泳

(第二版)

何忠效 张树政 主编



科学出版社

生物化学实验技术丛书

电 泳

(第二版)

何忠效 张树政 主编

科学出版社

1999

内 容 简 介

本书是一本关于电泳技术的综合性著作,全面而系统地阐述了各种电泳技术的原理、操作及实验中应注意的问题。其中包括:电泳概论、聚丙烯酰胺凝胶电泳、等电聚焦、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、双向电泳、印迹转移电泳、等速电泳及琼脂糖凝胶电泳和免疫电泳等。本书在原第一版的基础上,更新了内容,增加了电泳在农业、法医中的应用及电泳仪器设备3章。

本书适合于广大生物学及相关领域的工作者使用,既可作为高等院校师生的参考书,也可作为实验室常备工具书。

图书在版编目(CIP)数据

电泳/何忠效,张树政主编. -2版. -北京:科学出版社,1999
(生物化学实验技术丛书)

ISBN 7-03-006788-6

I. 电… II. ①何… ②张… III. 电泳 IV. O646.1

中国版本图书馆CIP数据核字(98)第14837号

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号
邮政编码:100717

新蕾印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

*

1990年3月第 一 版 开本:787×1092 1/16

1999年2月第 二 版 印张:23 1/4

1999年2月第二次印刷 字数:605 000

印数:901—5 300

定价:48.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈新欣〉)

再版前言

本书自 1990 年问世以来,受到相关专业的高等学校师生及科学工作者们的欢迎,在推动电泳技术的提高和普及过程中发挥了一定的作用。几年来的反映表明,随着该技术的广泛应用,读者们不仅需要理论上的系统阐述,更需要提供一些能直接帮助他们启动该工作的参考材料。鉴于这种情况,我们除对第一版的内容作了部分修改外,又在原有的基础上,请杨太兴(中国科学院遗传研究所)、常彩琴(公安部二所)及刘金龙、王晓平(北京六一电泳仪器厂)等补编了有关章节,并补充了一些国外实验室采用的较新技术,以增强该书的实用性,并推动仪器国产化进程。总之,我们希望再版的《电泳》一书,不仅仍是一部系统论述电泳技术的学术著作,也可供开展该工作的读者们作为参考工具书及技术手册来使用,以进一步推动电泳技术在我国的发展。

主编

1997 年 12 月

编者的话

在组织编写《生物化学实验技术丛书》10年之际,科学出版社于1986年底委托中国生物工程开发中心江门单细胞蛋白试验基地,在广东江门市主持召开了《生物化学实验技术丛书》第2次座谈会,出席的单位有中国科学院微生物研究所、中国科学院上海脑研究所、中国医学科学院基础医学研究所、中国军事医学科学院放射医学研究所、中山大学、中国科学技术大学、北京大学、北京师范大学、武汉大学、南开大学、南京大学、复旦大学和中国生物工程开发中心江门单细胞蛋白试验基地。

会上回顾了《生物化学实验技术丛书》的出版情况。在作者们的共同努力,已经出版的《生物物质常用化学分析法》、《色谱法(一)》、《色谱法(二)》、《离心沉降分析技术》、《生物化学制备技术》等册,成为了指导生化实验的重要参考书,起到了工具书的作用,深受广大读者的欢迎。但是,正如第一次座谈会已经预见到的,随着我国生化研究工作的迅速发展,国外新技术的引进,国内独创技术的开展,生物化学实验技术将不断出现新的内容。为此,除了对已出版的各册进行修订、增补准备再版之外,根据实际需要,对其他未出版的各册进行了调整,扩充成9册,即《电泳技术》、《免疫化学技术》、《生化常用光学分析》、《常用生化数据》、《同位素技术在生化中的应用》、《DNA重组技术》、《酶及细胞固定化技术》、《生物大分子及亚细胞颗粒液-液萃取技术》和《生物材料及细胞器分离》。另外,还增添了《医学生化实验技术》、《生化技术中微机的应用》、《生化技术在食品工业中的应用》和《生化技术在农业中的应用》等4册。

对各册内容的要求,仍力求做到:

- (1) 理论部分简洁明了,实验部分力求可重复性高;
- (2) 直接触及实验设计的各项要领;
- (3) 指出实验操作中应注意的地方;
- (4) 尽可能多的举例说明。

期望本丛书的出版能对读者有所裨益,为促进生物化学的发展,作出贡献。

1988年

前 言

电泳 (electrophoresis) 是一种带电分子在电场中泳动的现象。在生物化学及分子生物学中, 主要是根据生物大分子所带电荷的数量及其在分子表面排布的不同来对它们进行分离和鉴定。电泳现象发现得很早, 但将这种现象用于生物化学领域却是近几十年的事。而一旦将这种技术用于生化研究, 便显示出其巨大的生命力。由于它具有快速、简便及高分辨力等优点, 电泳技术的种类逐渐增加, 手段日趋完善, 以致现在它已成为生化及分子生物学教学和科研中不可缺少的“常规武器”了。各种电泳方法都是利用分子所带电荷这一基本特点, 但对于不同实验材料及不同的实验目的, 又派生出种种不同的电泳技术, 本书力图尽可能地覆盖这些技术, 尽管个别的已不常用了。由于国内这方面工作开展的深度和广度所限, 书内仍难免遗漏一些国外实验室已采用的电泳技术。对此, 我们只能寄希望于本书再版时进行追踪和充实。

参加本书编写的作者有 (按各章顺序): 张树政 (中国科学院微生物研究所); 张承圭、吕慧梅 (南京大学); 何忠效 (北京师范大学); 郭尧君 (中国科学院生物物理研究所); 李玉民、李育庆、陈军 (复旦大学); 竺安、陈义 (中国科学院化学研究所); 王秀奇 (北京师范大学)。由于我们水平有限及实验室经验的局限, 本书难免有一些缺点或错误, 欢迎读者批评指正。

何忠效 张树政

1988年8月

目 录

第 1 章 电泳概论	(1)
1.1 电泳的分类	(1)
1.2 电泳的基本原理	(4)
1.3 Tiselius 移界电泳法	(8)
1.4 区带电泳	(9)
参考文献	(10)
第 2 章 聚丙烯酰胺凝胶电泳	(11)
2.1 引言	(11)
2.2 聚丙烯酰胺凝胶 (以下简称凝胶)	(12)
2.3 不连续体系凝胶电泳基本原理	(24)
2.4 圆盘型聚丙烯酰胺凝胶电泳	(26)
2.5 平板型聚丙烯酰胺凝胶电泳	(35)
2.6 制备聚丙烯酰胺凝胶电泳	(39)
2.7 浓度梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳	(40)
2.8 几种特殊形式的聚丙烯酰胺凝胶电泳	(42)
2.9 聚丙烯酰胺凝胶电泳的应用	(46)
2.10 聚丙烯酰胺凝胶电泳的异常现象、可能原因及解决办法	(57)
第 3 章 等电聚焦	(59)
3.1 等电聚焦的基本原理	(59)
3.2 载体两性电解质	(63)
3.3 制备等电聚焦	(71)
3.4 薄层等电聚焦	(81)
3.5 等电聚焦中的一些需注意问题	(99)
3.6 等电聚焦的应用	(104)
参考文献	(123)
第 4 章 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳及双向电泳和印迹转移电泳	(127)
4.1 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)	(127)
4.2 聚丙烯酰胺凝胶双向电泳	(139)
4.3 聚丙烯酰胺凝胶印迹转移电泳	(151)
附录: 水稻种子谷蛋白 β 亚基抗血清的制备	(160)
参考文献	(161)
第 5 章 等速电泳	(162)
5.1 等速电泳的原理	(162)
5.2 等速电泳装置	(169)

5.3 条件选择	(173)
5.4 等速电泳在生化分析中的应用	(178)
参考文献	(195)
第6章 其他电泳技术	(196)
6.1 纸电泳和高压电泳	(196)
参考文献	(213)
6.2 淀粉凝胶电泳	(213)
参考文献	(219)
6.3 醋酸纤维素膜电泳	(219)
6.4 琼脂糖凝胶电泳	(227)
6.5 免疫电泳	(236)
第7章 电泳技术在农业科学中的应用	(258)
7.1 电泳技术在农业科研中的应用	(259)
7.2 电泳技术在农业生产中的应用	(270)
7.3 垂直平板聚丙烯酰胺凝胶电泳的同工酶分析	(281)
7.4 农业科研生产中常用的同工酶	(285)
参考文献	(308)
第8章 电泳技术在法医和临床上的应用	(313)
8.1 同工酶的分离和鉴定	(314)
8.2 酶谱技术	(316)
8.3 血清蛋白的多型性	(341)
8.4 DNA 指纹分析进行个人识别	(342)
8.5 DNA 探针技术诊断疾病	(343)
参考文献	(348)
第9章 电泳仪器设备	(349)
9.1 电泳装置和电泳设备	(350)
9.2 北京六一仪器厂和沃德生物医学仪器公司主要产品	(353)
参考文献	(362)

第1章 电泳概论

张 树 政

电泳也称阳离子电泳(cataphoresis),最初是指带电荷的胶体粒子在直流电场中移动的现象。低分子带电物质同样也有泳动现象,为了区别起见,有人建议称后者为离子电泳(ionophoresis)。由于这一技术发展很快,已广泛应用于蛋白质、氨基酸、核酸、嘌呤、嘧啶、其他有机化合物甚至无机离子等各领域,而且使用本质上相同的仪器和操作方法,因此现在统一使用“电泳”(简称EP)这一名称。电泳也是一种分离的方法或技术,就是分离和鉴定混合物中带电粒子(包括离子、高分子多电解质、胶体粒子、病毒颗粒以至活的细胞如细菌和红细胞等)的技术。

电泳现象虽然早在150多年以前就已发现,但直到1937年,瑞典的Tiselius才建立了“移界电泳法”(moving boundary EP),成功地将血清蛋白质分成5个主要成分,即清蛋白、 α_1 -、 α_2 -、 β -和 γ -球蛋白。

由于Tiselius电泳仪比较昂贵,而且分辨率也有限,同时因为自由溶液受热后发生密度变化,产生对流,使区带扰乱,故在50年代以后又发展了支持物电泳,如滤纸电泳、醋酸纤维素薄膜电泳、淀粉凝胶电泳、免疫电泳、聚丙烯酰胺凝胶电泳等技术。这些方法,设备简单、操作方便,有很高的分辨率和选择性,所分离成分的检出可利用染色、紫外吸收、放射性测定、生物活性测定等,有高的灵敏度又很方便,在生化研究和临床检验方面发挥了巨大作用。

1.1 电泳的分类

1.1.1 按分离的原理区分^[1]

正如色谱法按其展开方式可分为3个主要类型即洗脱或区带、前向分析和置换一样,电泳也有相应的3种即区带电泳(zone EP, ZEP)、移界电泳(moving boundary EP, MBEP)和等速电泳(isotachopheresis, ITP)。不过电泳还多出一种等电聚焦(isoelectric focusing, IEF),过去没有与它相应的色谱技术。近年来在等电聚焦的原理引导下,发展出一种相应的色谱技术,称为色谱聚焦(chromatofocusing)^[2],是利用特制的离子交换剂及缓冲系统^[3],使其在洗脱过程中自然形成pH梯度,使被分离物按其等电点的不同而依次洗脱分离开来。色谱与电泳的对应关系见表1-1。各种电泳分离原理示意图见图1-1。

(i) **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,与洗脱色谱的图形相似。电泳的区带随时间延长和距离加大而扩散严重,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,它兼具分子筛的作

用,分辨率大大提高,是应用最广泛的电泳技术。

表 1-1 色谱与电泳的对应关系

色 谱	电 泳
洗脱或区带(elution or zone)	区带(zone)
前向(frontal)	移界(moving boundary)
置换(displacement)	等速泳(isotachopheresis)
色谱聚焦(chromatofocusing)	等电聚焦(isoelectric focusing)

(ii) 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,正和色谱法前向分析的图形相似。最前面的成分有部分是纯的,其他则互相重叠。各界面可用光学方法显示,这就是 Tiselius 最早建立的电泳方法。

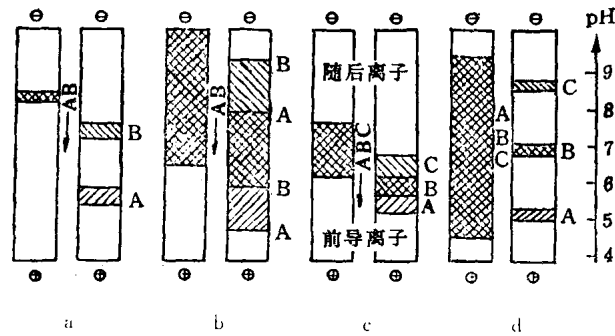


图 1-1 不同电泳法的分离原理示意图^[1]

a. 区带电泳; b. 移动界面电泳; c. 等速电泳; d. 等电聚焦。

(iii) 等速电泳 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,但不同于上述移界电泳,它的区带没有重叠,而是分别保持。

(iv) 等电聚焦 从分离图形(图 1-1d)来看像区带电泳,但原理不同,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。被分离物则各自移动到其等电点而聚成很窄的区带,分辨率很高。

1.1.2 按有无固体支持物区分^[4]

根据电泳是在溶液中进行还是在固体支持物上进行,又可以分为自由电泳和支持物电泳两大类。自由电泳(见表 1-2)又可分为:① 显微镜电泳(也称细胞电泳),即在显微镜下直接观察细胞如红细胞或细菌等的电泳行为;② 移界电泳;③ 柱电泳,用密度梯度保持

表 1-2 自由电泳的种类

显微镜电泳	密度梯度和 pH 梯度,等电聚焦
移界电泳	自由流动幕电泳
柱电泳(密度梯度)	等速电泳

分离区带不再混合,如果再配合以 pH 梯度则称为等电聚焦;④自由流动幕电泳,这是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,2个电极与液流方向垂直加在液层的左右两边。被分离的物质则经电泳分离后,由下面分管收集;⑤等速电泳,详见后述。

有支持物的电泳(即区带电泳)是多种多样的(见表 1-3)。电泳过程可以是连续的或分批的,支持物可用滤纸、薄膜、粉末、凝胶微粒、海绵等。仪器可以用小的湿室、水平或直立的槽、柱、小管或毛细管;也可以用幕,如滤纸连续电泳所用的纸幕;此外还可配合免疫扩散,称为免疫电泳;使用多孔的凝胶,起分子筛作用,称为凝胶电泳;配合 pH 梯度的等电聚焦以及使用高压的高压电泳等。

表 1-3 在支持物上进行的电泳

过 程	支 持 物	仪 器	其他特点
连续式	无阻滞的支持物	湿小室	免疫电泳
分批式	滤纸	槽(垂直水平)	等电聚焦
	醋酸纤维素膜	柱	高压电泳
	生淀粉粒	毛细管	等速电泳
	聚酰胺粉末	幕	
	凝胶颗粒		
	高密度凝胶		
	淀粉凝胶		
	聚丙烯酰胺凝胶		
	琼脂凝胶		
	琼脂糖凝胶		

1.1.3 较全面的综合分类^[5]

由上述表 1-2 及表 1-3 可以看出虽然简单明了,但有些电泳没有适当位置,较全面的考虑各种因素可以得出如表 1-4 的更为系统化的分类。

表 1-4 电泳的分类^[5]

1. 热对流的控制	电泳名称
A. 泳动槽形状(冷却效果)	
1. 矩形(Tiselius)	移界电泳(moving boundary EP)
2. 毛细管(Martin)	毛细管电泳(capillary EP)
3. 薄层(Hannig)	连续自由流动幕电泳(continuous free flow EP)
B. 支持物	
1. 海砂、玻璃珠、淀粉粒	区带电泳(zone EP)
2. 滤纸	滤纸电泳(paper EP)
3. 醋酸纤维素膜	醋酸纤维素膜电泳(cellulose acetate film EP)

Ⅱ. 阻力的控制	电泳名称
A. 溶液粘度	
1. 甘油、蔗糖、尿素、甲基纤维素	
2. 浓度变化	密度梯度电泳(density gradient EP)
B. 凝胶	
1. 琼脂或琼脂糖	琼脂(糖)凝胶电泳(agar(ose)gel EP)
2. 淀粉	免疫电泳(immuno EP)
3. 聚丙烯酰胺	淀粉凝胶电泳(starch gel EP)
4. 不连续凝胶	聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)
5. 梯度孔径凝胶	盘状电泳(disc EP)
	梯度凝胶电泳(gradient gel EP)
Ⅲ. 趋动电力的控制	
A. 均一电压	
1. 低电压(2~10V/cm)	低压电泳(low voltage EP)
2. 高电压(50~200V/cm)	高压电泳(High voltage EP)
3. 超高电压(100~1 500V/cm)	
B. 不均一电压	
1. pH 梯度	等电聚焦(electrofocussing)
2. 不连续离子强度	等速电泳(isotachopheresis)

1.2 电泳的基本原理^[6]

1.2.1 电荷的来源

固体和液体接触时,二者之间即有电位产生。固体表面带一种电荷、周围的液体带符号相反的电荷,这就叫做偶电层。胶体颗粒表面的电荷来源是:①吸附液体中的某离子,因而带电,液体失去该离子而带相反的电荷。通常阴离子易被吸附而使固体表面带负电。阳离子因水化程度较高,不易被吸附。碳氢化物小滴和气泡也有吸附现象。②作为胶体组成成分的相反符号的离子不等量的进入溶液,例如碘化银胶体在有过量碘离子的情况则带负电,在有过量银离子的情况则带正电。金属氧化物的胶体则受溶液中 H^+ 和 OH^- 的影响。③固体表面吸附液体分子,然后这些分子解离。

蛋白质或其他多电解质则由其本身所具有的功能团的解离而带电。蛋白质具有正负两类解离基,称为两性电解质,蛋白质在酸性介质中带正电,在碱性介质中则带负电。在某一 pH 值时,其正负电荷相等,此时的 pH 即称为该蛋白质的“等离子点”(isoionic point),它与“等电点”(isoelectric point)不一定完全相等。“等电点”是一个实验得来的数值,它的定义是该蛋白质在直流电场中移动为零的点,由于蛋白质也能吸附某些自由离子如 Na^+ 或 Cl^- 等,使它增加额外的正或负电荷,就使得表观上的等电点不是等离子点。

1.2.2 电 动 现 象

由于胶体粒子表面有偶电层,偶电层的固定层和可移动层之间形成电位,叫作电动电位或 Zeta-电位(ζ -电位)。电动电位的存在引起电动现象。在直流电场中,带电荷的粒子向带符号相反的电极移动,称为电泳。在一个 U 形管的底部装上一块素烧磁板(密封),管中装入液体,并在两端加入电极通电,就会看到负极的液面上升。因为磁板带有负电荷,液体相对地带有正电荷,因而向负极移动,此现象称为电渗(electroosmosis)。加压力于液体使它通过多孔磁片,即有电位产生,叫做流动电位(streaming potential),它是电渗的反现象,例如水渗入土壤或超滤时即产生流动电位。反过来如使液体固定,使固体粒子运动,如在胶体微粒下沉过程中,或气泡上升时有电位产生,叫做沉降电位(sedimentation potential),是电泳的反现象。这些现象产生的条件,引起的原因和其结果见表 1-5。

表 1-5 电动现象^[7]

现 象	条 件	原 因	结 果
电 渗	胶体粒子固定	电压	液体运动
电泳	液体固定	电压	粒子运动
流动电位	胶体粒子固定	液体运动	电位
沉降电位	液体固定	粒子运动	电位

1.2.3 电泳迁移率(u^1)

推动粒子运动的力(F)等于粒子的净电荷(Q)与电场强度(E)的乘积,即:

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

而粒子在运动时又受到一定的阻力(F'),对于球形粒子来说,此阻力服从 Stoke 定律。

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

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,电力与阻力相等,即:

$$F = F'$$

因此

$$QE = 6\pi r\eta v \quad (3)$$

电泳迁移率是指在单位电场强度(1V/cm)时的泳动速度,即

1) 也可以用 m 或 μ 表示。

$$\text{电泳迁移率 } u = \frac{v}{E} \quad (4)$$

代入(3)式得

$$u = \frac{Q}{6\pi r\eta} \quad (5)$$

实际上这样理想的状况是很难达到的,特别是在区带电泳的情况下,干扰的因素很多。

由(4)式可以导出迁移率的单位为:

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

d = 粒子运动距离,以厘米(cm)计;

t = 时间,以秒(s)计;

E = 电位梯度(V/cm)。

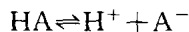
因为迁移率数值极小,通常以迁移率单位表示,

$$1 \text{ 迁移率单位} = 10^{-5} \left(\frac{\text{cm}^2}{\text{V} \cdot \text{s}} \right)$$

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。

1.2.4 解离强度与缓冲液 pH 的关系

设某弱酸 HA 的解离如下式:



其外观解离常数为 K_a 。

$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

$$\text{移项: } \frac{1}{[\text{H}^+]} = \frac{1}{K_a} \cdot \left[\frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \right]$$

$$\text{取对数: } \text{pH} = \text{p}K_a + \lg \left[\frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \right]$$

$$\text{解离度 } \alpha = \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA} + \text{A}^-]}$$

设 $[\text{A}^-] = \alpha$, 则 $[\text{HA}] = 1 - \alpha$ 代入上式则为

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \lg \frac{\alpha}{1 - \alpha} \quad (7)$$

此式即 Henderson-Hasselbalch 公式。这适用于阴离子,如果是阳离子,则等式后两项之间应为负号。

对于弱酸来说, α 的近似值如下:

pH < pK_a 2 个 pH 单位 $\alpha =$

$$\frac{1}{100}$$

pH < pK_a 1 个 pH 单位 $\alpha =$

$$\frac{10}{100}$$

pH = pK_a $\alpha = \frac{50}{100}$

pH > pK_a 1 个 pH 单位 $\alpha = \frac{90}{100}$

pH > pK_a 2 个 pH 单位 $\alpha = \frac{99}{100}$

就是说当缓冲液的 pH 等于弱酸的 pK_a 时, 50% 解离, 大于 pK_a 2 个 pH 单位接近 100% 解离。对于弱碱则情况正好相反, 利用计算图表则可以准确地算出 α 值(图 1-2), 在 pK_a 标尺上找出某电解质的 pK_a, 再在 pH 标尺上找出指定的 pH, 两点间连线并延长交于 α 标尺上, 交点即为相应的阴离子或阳离子的解离度 α 。设某离子成分的解离度为 α , 由于解离态与非解离态处在动态平衡之中, 所以每一个离子可以看成在 α 时间内是解离的, 在 $1-\alpha$ 时间内是非解离的, 因为只有在解离时才能泳动, 故有效迁移率为 $u\alpha$ 。

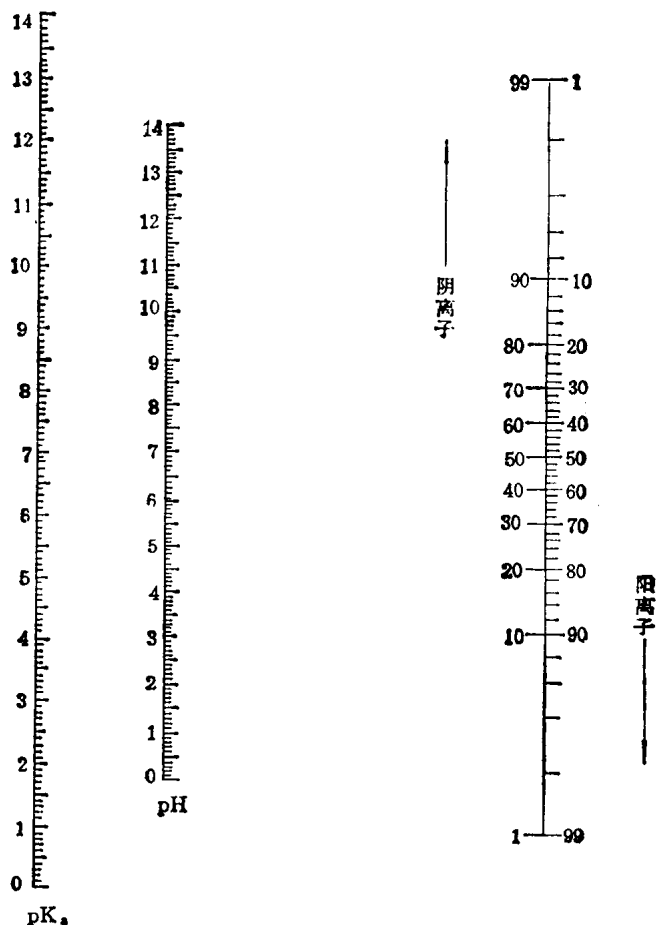


图 1-2 解离度 α 的计算图^[8]

1.2.5 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), 它使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。用离子强度(ionic strength)来表示, 它的数值如下式:

$$\text{离子强度} = \frac{1}{2} \sum_i C_i Z_i^2 \quad (8)$$

式中 s 表示共有 s 种离子, C_i 和 Z_i 分别代表每种离子的浓度(mol/L)和价数。价数愈高的离子, 离子强度愈高。如 1mol/L 的 KCl 离子强度为 1, 而 1mol/L 的 CaCl₂ 离子强度为 3。

在电泳时缓冲液的离子强度较低时, 泳动速度快, 生热少; 离子强度高时, 泳动慢, 生热多, 但区带较窄。

1.2.6 电泳时生热问题

所加之电压受所生焦耳热的限制,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,温度每升高一度,迁移率约增加 2.4%。在电泳装置中如何散热是一重要问题。

综上所述,可知影响电泳迁移率的因子很多,可以分为以下三大类:

(a) 与泳动离子(或粒子)本身的特性有关的因子,如电荷符号和大小、本身的大小和形状、水化程度、解离趋势、两性性质等。

(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、粘度、有无极性分子存在(因为它可以影响粘度或介电性)等。在有支持物的情况下,影响因素更多,如支持物的吸附作用,不均一性、离子交换能力、电渗现象、虹吸作用、热和蒸发作用等。

(c) 所加电场的特性,如强度和纯度(是否杂有交流电)。

这些因素在实验过程中要充分注意,尽量保持条件恒定不变,以便获得可重复的结果。

下面将对不同类型的电泳作些简单的介绍。由表 1-4 可以看出电泳的种类很多,限于篇幅,不可能一一介绍。移界电泳具有重要的历史意义,稍作介绍,其他区带电泳也谈一些。至于凝胶电泳、免疫电泳等现在应用极广,本书将有专门章节予以详细介绍。

1.3 Tiselius 移界电泳法^[4]

Tiselius 的移界电泳法具有重要的历史意义,它的成功在于巧妙地解决了几个问题:①能够形成清晰的起始界面;②靠密度梯度能够稳定界面;③能良好的散热;④在泳动过程中可用光学方法显示其组分。

电泳池的构造见图 1-3,具有矩形截面的 U 形管,有光学平面的玻璃窗。小池分成可

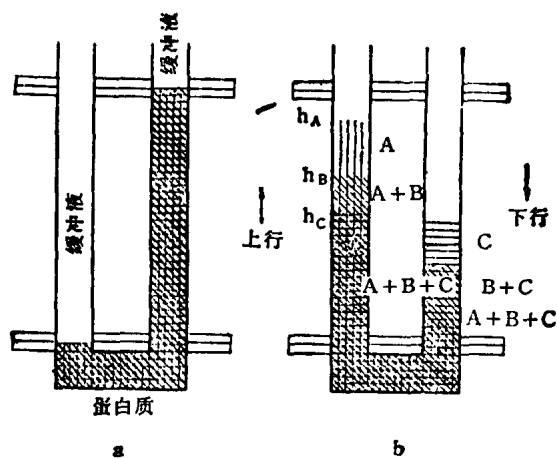


图 1-3 Tiselius 电泳槽示意图

a. 起始界面位置; b. 电泳过程中在 U 形管两臂中发生界面分离。

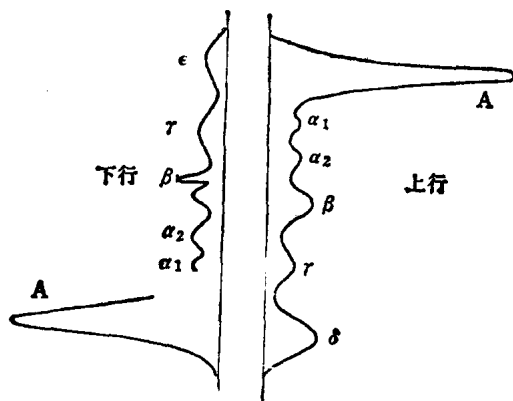


图 1-4 血清样品在下行和上行臂中的分离图形

以滑动的上、中、下 3 个部分,以便造成清晰的起始界面。电泳之后用 Schlieren 光学系统照像,得出电泳图谱,见图 1-4。这种仪器早已不使用了,但测定迁移率还是有些用的。

1.4 区带电泳^[4]

1.4.1 滤纸及醋酸纤维素薄膜电泳

由于设备简单,操作方便,重复性也好,过去在生化研究特别是在临床检验方面起过重要作用。但他们的分辨率不及凝胶电泳高,所以逐渐被后者所代替。利用微晶纤维素薄层作肽的双向“指纹图谱”仍是很有用的技术^[9]。

1.4.2 高压电泳

高压电泳适用于分离低分子物质,如氨基酸、肽、抗生素及其他有机和无机物。因为低分子物质易扩散,高电压可使其移动快,在短时间内达到分离,减少扩散的影响。但高压生热多,必须有较好的冷却装置,主要有溶剂冷却和冷却板 2 种方式。使用有机溶剂冷却设备简单,如图 1-5 的装置,电泳分离效果也很好,但操作不很方便。商品高压电泳仪用内通冷却水的 2 块不锈钢冷却板,将滤纸用绝缘膜隔开,紧压在两板之间,纸的两端浸在电极槽缓冲液中。

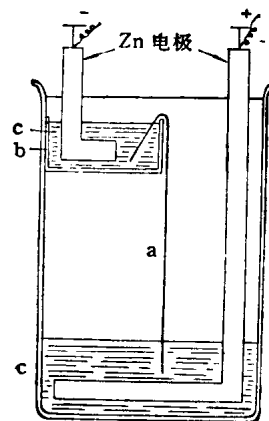


图 1-5 溶剂冷却式高压电泳槽
a. 滤纸; b. 四氯化碳; c. 电极槽。

1.4.3 连续电泳^[4]

用一张垂直悬挂的滤纸作支持物,由上方连续加样,缓冲液连续由上方流下来,电极加在左右两方,电场方向与液流方向垂直。分离的成分由下方分别以试管收集(见图 1-6)。这种电泳实际上应用很少。不用滤纸而是利用 2 个平面之间的薄液层来分离就是自由流动幕电泳。有精密的商品仪器,但不适合分离高分子物质,因其分辨率较具有分子筛作用的凝胶电泳低得多,可用以分离低分子物质。

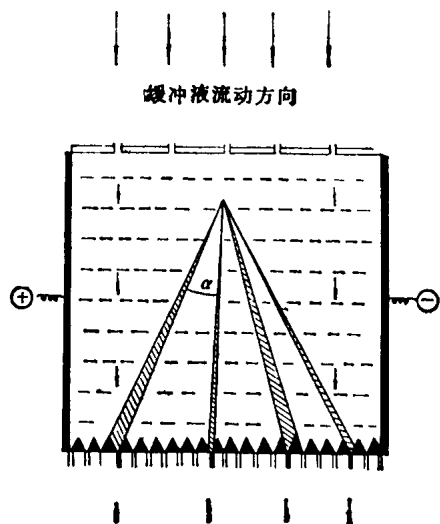


图 1-6 连续流动幕电泳原理
样品连续加于滤纸中部,样品呈斜线分离。

1.4.4 凝胶电泳

聚丙烯酰胺凝胶电泳普遍用于分离蛋白质及较小分子的核酸。琼脂糖凝胶孔径较大,对一