

实用电泳技术

主编 赵春久 齐树青

大连海事大学出版社



实用电泳技术

主 编:赵春久 齐树青
审 校:范钦信

江苏工业学院图书馆
藏书章

大连海事大学出版社

实用电泳技术

主编:赵春久 齐树青

责任编辑:刘宗德 封面设计:王 艳

大连海事大学出版社出版、发行

大连理工大学印刷厂印刷

开本:787×1092 1/16 印张:11 字数:275 千

印数:0001~3000 定价:14.80 元

ISBN 7-5632-1072-5/R · 14

前 言

电泳技术是一门新兴的、精密的、尖端的实验研究技术,20 世纪才被人们发现。它所涉及的学科面广,技术日臻成熟,应用极为广泛。不仅应用于医学临床,还应用于基础科研诸多方面。

国内缺乏电泳技术专书,为了弥补这一空白,总结几十年临床生化检验和分子生物学的实践经验,参阅了国内外有关文献,编写出实用电泳技术一书。

该书比较详尽地叙述了各种电泳方法的原理、操作技术及注意事项。全书共分:一、蛋白质电泳;二、同工酶电泳分离;三、特殊电泳;四、附表四部分。

参加本书的副主编有:李德钧、盛秀芝、张翠玲、丁扬、袁雁军、徐裕海、姚忠武、褚量子、秦桂娥、陈洁、刘艳、范存琳、杨晓明、钱淑兰、邴桂英。编委有:卫连芝、马军、张有才、刘淑兰、赵瑾瑶、李士军、程慕华、张彦、高泓清、赵洪涛、杨春梅、韩淑娟、王美君、宋美娟、顾延梅、邴松景、于雪晶、张延新。

本书可用作各类临床检验人员的书,也可供实验研究人员及教学参考书。

本书能够编写成功,得到了我院领导的大力支持,还得到范钦信教授等指导和鼓励,在此一并致以谢意。

由于时间紧该书难免存在错误、遗漏或不足。热诚欢迎同道提出批评指正。

编 者

1996. 11

前言	1
序	1
绪论	1
第一篇 蛋白质电泳	1
1.1 醋酸纤维素膜电泳法	(7)
1.2 琼脂糖凝胶电泳法	(13)
1.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳法	(17)
1.3-1 PAG 薄层电泳法	(20)
1.3-2 圆盘电泳法	(23)
1.3-3 SDS-PAG 电泳法	(29)
1.3-4 PAG 梯度凝胶电泳法	(29)
1.4 双向电泳法	(33)
1.5 等电聚焦(等电点)电泳法	(38)
1.6 等速电泳法	(41)
1.7 免疫电泳法	(45)
1.8 火箭免疫电泳法	(54)
1.9 免疫固定法	(59)
1.10 淀粉胶电泳法	(61)
1.11 高压滤纸电泳法	(63)
1.12 对流免疫电泳法	(65)
1.13 交叉免疫电泳法	(66)
第二篇 同工酶电泳分离法	(69)
2.1 LDH 同工酶	(69)
2.1-1 CA 膜电泳分离法	(70)
2.1-2 琼脂糖电泳分离法	(71)
2.1-3 紫外荧光检出法	(71)
2.2 AKP 同工酶	(74)
2.3 CK 同工酶	(77)
2.4 AMY 同工酶	(81)
2.5 γ -GTP 同工酶	(86)
2.6 LAP 同工酶	(90)
2.7 CHE 同工酶	(92)

第三篇 特殊电泳法	(96)
3.1 Southern(DNA)印迹法	(96)
3.2 Northern(RNA)印迹法	(101)
3.3 免疫(蛋白质)印迹法	(108)
3.4 亲和电泳法	(117)
3.5 毛细管电泳法	(123)
3.6 亲和吸收电泳法	(127)
3.7 脂蛋白电泳分离法	(131)
3.7-1 臭氧化席夫法	(131)
3.7-2 酶染色法	(134)
3.8 糖蛋白电泳分离法	(140)
3.8-1 电泳法分离血清糖蛋白	(141)
3.8-2 酸溶性糖蛋白的分离	(141)
3.8-3 α_1 -抗胰蛋白酶的遗传型	(142)
3.9 血红蛋白电泳	(145)
3.10 ApoE 显型和异型的电泳分析	(146)
第四篇 附表	(150)
4.1 蛋白染色液	(150)
4.2 电泳用缓冲液	(151)
4.3 市售电泳用支持介质	(153)
4.3-1 CA 膜	(153)
4.3-2 琼脂糖	(155)
4.3-3 琼脂糖特性一览表	(158)
4.3-4 PAG 特性一览表	(159)
4.3-5 琼脂特性一览表	(163)
4.3-6 淀粉特性一览表	(164)
4.3-7 滤纸特性一览表	(164)
4.3-8 两性支持介质	(164)
4.3-9 其它	(166)
本书主要缩略语	(167)

绪 论

从自由电泳到支持介质电泳

所谓电泳(electrophoresis)就是带电粒子在电场中向其所带电荷相反的电极泳动的现象。20世纪初把这种电化学分析法引入到蛋白质分析,1937年由瑞典人 Tiselius 制成电泳仪之后其应用面迅速扩大了。但是,由于 Tiselius 电泳属自由界面电泳,不能将各个部分完全分离,加上操作繁琐、费时,只能用于基础科学及临床医学的研究,难于作为常规检验广泛普及。

1948年 Wieland 等建立了滤纸电泳技术,由 Durruum 等应用于蛋白质分析,这个方法与 Tiselius 电泳法相比具有使用样品微量、短时间可以达到分离效果,而且在滤纸上的区带可以分离固定,还可以进行各种不同的染色等多种优点,因此迅速普及。从50年代开始广泛应用于日常检验。另外,当电泳扫描仪出现之后便开辟了定量化的道路。同时有效地利用滤纸的特点开发了连续滤纸电泳技术用于分离。还在高压滤纸电泳技术上做了大量工作,使其不仅用于蛋白质,也用于氨基酸、多肽、胺等低分子物质的分析。

1949年 Gordon 等首先进行了把琼脂凝胶用于蛋白质电泳的尝试。1957年由 Kohn 把醋酸纤维素膜(CA膜)用于电泳技术。还把淀粉或其它粉末制成柱状或板状进行电泳尝试,也试用了吉纶、琼脂糖粉末等。另外,也把分子筛作用用于支持介质,把淀粉凝胶、聚丙烯酰胺凝胶(PAG)等用于电泳。特别在1965年 Summers 等把 SDS(sodium dodecyl sulfate)加入凝胶中开发出 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳法。这种支持介质具有分子筛作用,透明、质量稳定均一,能够防止蛋白质分子聚合等很多优点。因此,现在不仅用于蛋白质研究,在分子生物学里对核酸分离也是不可缺少的分析方法。

随着等速电泳法、等电点电泳法、细胞电泳法等特殊分析法的建立,应用于不同研究目的。1966年由 Vesterberg 等开发出了等电聚焦(isoelectrofocusing, IEF)电泳,其后广泛地被用于等电点的测定、高灵敏度的分离等研究方面。

日常临床检验广泛把 CA 膜电泳法用于血清蛋白质分离,用这种方法把含有许多成分的正常血清蛋白质分离出5条区带,此种方法可以用于许多疾病的筛选检查。它促使检验工作向简单化、自动化前进,1980年日本率先推出了全自动电泳仪,之后逐渐普及起来。不单是电泳技术的自动化,而且正在利用电子计算机对血清蛋白电泳图象进行病态解析。

目前,把电泳技术与其它分析方法结合起来开发出了多种多样的分析方法。

几乎所有的蛋白质都属于复合蛋白质,除多肽部分外还结合有糖类或脂质。因此,如进行糖类或脂质染色就可以对糖蛋白和脂蛋白进行分离、检出和定量。

酶是蛋白质。因此,预先进行电泳分离之后再用酶反应,可以对同工酶进行分离、检出和定量。此外,还可以利用各种蛋白质所具有的生物活性,开发出复合分析法。

如果是抗原类物质,在电泳法的基础上并用抗原抗体反应,便可以把带有不同电荷的物质

很容易分离开来,这就是免疫电泳法。特别是琼脂凝胶、琼脂糖凝胶具有凝固性,而且透明,可以用肉眼观察到抗原抗体的沉淀反应。因此,1953年由 Grabar 开发出了古典免疫电泳法,至今依然是日常临床检验不可缺少的方法。Grabar-Williams 是定性分析法,缺乏定量性,为了弥补它的缺点,开发出以凝胶为支持介质的抗原抗体免疫电泳法,其中有火箭免疫电泳法(Laurell)和其它各种各样的定量免疫电泳法。

植物血凝素具有和糖类特有的亲和性。因此利用这一性质的植物血凝素电泳也引人注目。例如,用常规检验法鉴定肝细胞由来的 α -胎儿蛋白。

利用核酸碱基之间具有特殊键而建立起来的 DNA 探针法,也就是 Southern 印迹杂交 (blot hybridization) 或 Northern 印迹杂交 (blot hybridization) 法,已成为分子生物学研究中的先进技术。

电泳的基础知识

早年只是狭义的来使用电泳这个概念,只限胶体粒子在电场中的泳动。但是,现在不仅指胶体粒子,而是泛指带电粒子在电场中的泳动。今天广泛应用的是象蛋白质那样在溶液中具有电离基团,各种离子所带电荷不同的原理来进行分离分析的。在生物化学及临床化学领域里到处都有其足迹。

这种方法广泛普及的原因是由于电泳仪的开发,使得以蛋白质为中心的电泳分析研究工作盛行起来。以 Tiselius 研究为开端,以酶为起点,各种蛋白质都利用了电泳分析方法,使它们的多样性得到了解析。观察了在各种 pH 下的电泳迁移率和测定了各种蛋白质的等电点。另外,在象酶那样具有活性的蛋白质即使是极微量也可以观察到电泳迁移率的细微变化等。因此,电泳分析也介入到微量分析的领域。

电泳技术被很多研究者所使用并加以完善。随着支持介质电泳法的普及,逐渐搞清泳动的差异不单是由 pH 之差而引起,还决定于支持介质对蛋白质的吸附、支持介质所具有分子筛效应,电渗现象等诸多因素。相反充分利用这些支持介质的特性开发的新分离方法必将把电泳技术的应用推向新的高峰。

例如具有分子筛效应的 PAG 圆盘电泳、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,利用两性支持介质所形成的 pH 梯度进行分离的等电电泳,利用免疫反应的免疫电泳法、火箭免疫电泳法、免疫固定法等都是先进的电泳分析技术。

电泳方法的种类

基于电泳中是否使用支持介质,分为自由电泳 (Moving-boundary electrophoresis) 和区带电泳。

不使用支持介质的自由电泳,在样品溶液的上层预先加上电泳缓冲液,使样品与电泳缓冲液之间形成鲜明的界面。这时加上电场,在电场中带电的溶质粒子的移动状态可被视为界面的移动。因此,这种方法应用于电泳迁移率的测定,追踪高分子之间的相互作用是个好方法。但对物质进行纯化分离还有难点。另外,需要多量样品,界面检出的光学系统价格昂贵,使广泛利用受到制约。

另外,密度梯度法类似于不用支持介质的自由电泳,也和等速电泳一样把样品夹在起始离子和终止离子之间进行分离,类似于自由电泳。

使用支持介质的区带电泳法是把样品溶液以带状涂布在支持介质上,外加电场,各成分以带状被分离的方法,通常叫做区带电泳。根据区带电泳所用支持介质的性质,直接用光学手段多半难以观察分离的状况,利用蛋白染色、酶活性染色等方法可以比较容易地观察分离的区带。加之又开发了蛋白染色、酶活性染色等高灵敏度的染色法,对微量样品的解析变得容易了。另外,这种区带电泳法可边分离边回收,而且,由于是分离纯度较高的分离方法,也可用于蛋白质的纯化。但是,由于使用了支持介质,需要进行抽提及溶出的操作,故有回收不好的问题。特别在用于样品纯化的时候必须加以注意。

一般选用支持介质的前提是区带稳定。支持介质应能满足如下条件。

①对电泳缓冲液来说呈不溶性,具有均匀的构造。充填到容器内仍保持稳定的结构。

②支持介质本身不导电、不带电荷,没有电渗现象。

③尽可能吸附多量的电泳缓冲液可保持其稳定性。

④不吸附要分离的蛋白质等的溶质,同时分离后的成分容易溶出。

常压电泳使用的电压在 $0\sim 500\text{V}$,电压梯度为 $2\sim 10\text{V}/\text{cm}$ 。这类电泳分离速度较慢,但对电泳设备要求简单。临床中使用的电泳大都为常压电泳。

高压电泳所用电压在 $500\sim 1000\text{V}$,电压梯度可高达 $50\sim 200\text{V}/\text{cm}$ 。这类电泳分离速度快,但热效应较大,必须具备冷却装置。

表 电泳方法的种类

1. 移动界面电泳法(是自由电泳方法之一)(moving-boundary electrophoresis)

1. 区带电泳法(zone electrophoresis)

1. 自由区带电泳法(free-zone electrophoresis)

1) 密度梯度电泳法(density gradient electrophoresis)

2) 等速电泳法(isotachopheresis)

2. 支持介质区带电泳法(zone electrophoresis)

1) 滤纸电泳法(paper electrophoresis)

2) CA膜电泳法(cellulose acetate electrophoresis)

3) 琼脂凝胶或琼脂糖凝胶电泳法(agar or agarose gel electrophoresis)

4) 淀粉凝胶电泳法(starch gel electrophoresis)

5) 聚丙烯酰胺凝胶(PAG)电泳法(polyacrylamide gel electrophoresis)

a) 圆盘电泳法(disc electrophoresis)

b) PAG平板电泳法(PAG slab electrophoresis)

c) SDS电泳法(SDS electrophoresis)

2) 等电点电泳法(isoelectric focusing)

支持介质的性质与电泳方法的关系

用于支持介质电泳的材料开发出很多,了解这些材料的特性是非常重要的。

支持介质的性质与电泳方法的关系,主要取决于支持介质的性质。支持介质的性质,如孔径、电荷、亲水性、疏水性、机械强度、热稳定性、化学稳定性等,都会影响电泳的分离效果。因此,在选择支持介质时,应根据电泳方法的要求,选择具有合适性质的支持介质。

多孔材料

滤纸、CA膜是具有代表性的材料。CA膜普及之前多半采用滤纸电泳。滤纸支持介质具有结构疏松、吸附溶质少等优点。而溶质的区带扩散大、分离不鲜明是其缺点。CA膜结构致密、溶质扩散少、分离效果良好被广泛采用。膜具有多孔性、孔的均匀性尚有问题，多少还有电渗现象。由于有市售的膜使用方便，因此，被广泛利用于临床化学分析。特别是CA膜材料易于保管、来源容易。另外，把CA膜固定在聚乙烯树脂上的产品也有市售品，与CA膜一样使用更为方便。

使用这些材料时由于溶质的吸附少，用于分离分析多于纯化提取。分离后的蛋白质可直接固定在膜上进行蛋白质染色、酶活性染色等来检出目的蛋白质(酶)。

酶活性的染色使用酶反应检出用的色素系统来进行。广泛应用于血清酶的多样性分析。

凝胶及粉末

高分子凝胶可作为支持介质利用。琼脂、琼脂糖等可溶于沸水冷却后可得到凝胶。淀粉有以凝胶化的形式或以粉末形式直接使用的。使用这些支持介质时对蛋白质等溶质一般没有分子筛作用。

使用琼脂凝胶时由于琼脂分子内含有相当多的解离基团，电渗现象大。另外，由于琼脂的原材料不同含有的解离基团也不同，一般设定分析条件很难。同时还有吸附性强的缺点。而由琼脂精制的琼脂糖却是个电渗少、吸附性也有改进的良好材料。这些材料可在玻璃平板上制成薄的凝胶使用。最近在聚乙烯板上薄膜化成功，已有市售品出售。

也有在淀粉颗粒中加入聚乙烯醇等凝胶形式作为支持介质的，有分子筛效应。根据目的有选择地加以利用。

另外，支持介质多用淀粉颗粒、纤维素粉末等，加入适量的电泳缓冲液，制成片块形状常用以分离提取为目的的电泳分析。把电泳结束后的片块与电泳方向垂直加以仔细分段溶出，可以简便地进行分离提取。而且可以充填到柱内进行电泳，也可由柱里溶出进行分离提取。

具有分子筛作用的凝胶

PAG、淀粉凝胶等由于凝胶具有非常致密结构，电泳迁移率不仅与其分子量及带电荷多少有关，还受分子的大小及形状的影响。由于凝胶致密溶质扩散少，因此分离能力极优。

其中改变PAG单体和交联浓度比可以使凝胶网状构造的大小发生改变。因此，根据分离的目的可以制作出适宜的网目大小的凝胶。

可把凝胶制成网目大小不同的梯度。可以只依据分子量大小进行分离。PAG具有这样几种特征。因此有必要充分了解其特征。用这个支持介质不仅可以进行单纯的平板电泳分析，也可以进行具有盘状电泳和SDS电泳特征的电泳分析。

圆盘电泳是一种把要分离的样品胶下面加上不连续缓冲系统的浓缩胶，把要分离的样品加以浓缩，籍此显著提高了分离效果的电泳分析法。也就是样品胶重迭在浓缩胶上，样品进入浓缩胶中在起始离子和终止离子狭窄的离子界面上，把要分离的样品浓缩成圆盘状的薄层(这种现象叫浓缩)。这种浓缩的样品分离的效果好、扩散少，更适宜于微量分析。

SDS电泳是使要分离的样品所带的负电荷显著增加，仅仅利用PAG分子筛效应，只根据

分子量不同进行分离的方法。阴离子型表面活性剂 SDS(十二烷基硫酸钠)和蛋白质形成复合物,使负电荷显著增加的同时生成大致与分子量大成比例的复合物。不以带电荷多少来分离,仅以分子筛效应使样品在一定多孔的凝胶内泳动。使用相对迁移率来推算蛋白质的分子量,是一种测量微量样品中蛋白质分子量的好方法。

多羧基多氨基脂肪族化合物分子内具有阳离子和阴离子两种电荷的两性载体,是适合形成稳定 pH 梯度的两性电解质。因此,在这种 pH 梯度中作为分离对象的蛋白质泳动到各自等电点处便静止不动了。这种方法用于蛋白质等电点的测定,也用于分离纯化。用这种方法可以使 0.01 等电点之差的蛋白质得到分离,是个非常优越的方法。并能把酶或辅酶与底物结合状态所具有极微小等电点之差的酶蛋白分离开来,可以得到用原来的电泳方法所不能得到的新信息。

电泳的原理

蛋白质为两性电解质,在不同的 pH 下,其带电情况不同。在等电点时蛋白质所带正、负电荷相等即为兼性离子,此时蛋白质不带电荷,不产生泳动。蛋白质分子在 pH 小于其等电点的溶液中羧基的电离受到抑制,呈碱式解离,带正电荷,向负极泳动;在 pH 大于等电点的溶液中氨基的电离受到抑制,呈酸式解离,带负电荷,向正极泳动。泳动速度除与电场强度,溶液性质等有关外,主要决定于分子颗粒的电荷量及分子大小和形状等。电荷较多、分子较小的球形蛋白质泳动较快。

电泳速度常用迁移率(μ)来表示。电泳迁移率是指带电粒子在单位电场下的泳动速度,即带电粒子在每厘米电压降为一伏特(V/cm)的电场强度下每秒钟内泳动的厘米数(cm/s)。

$$\mu = \frac{V}{E} \quad (1)$$

公式中的 V 为粒子泳动距离(cm/s),E 为电场强度(V/cm)。

根据 Stokes 定律,如果带电粒子为圆球形其泳动速度(μ)与粒子带电量(Q)和电场强度(E)成正比,而与粒子半径(r)和介质粘度系数(η)成反比。即 $\mu = \frac{QE}{6\pi\eta r}$ 。电泳迁移率 $\mu = \frac{V}{E} =$

$$\frac{QE}{6\pi\eta r} = \frac{Q}{6\pi\eta r}$$

在实际测定中,电泳迁移率常用下式求得 $\mu = \frac{V}{E} = \frac{l/t}{E}$,其中 l 为带电粒子在 t 秒内的移动距离(cm),E 为电场强度(V/cm)。因此,电泳迁移率的单位为 $\text{cm}^2\text{S}^{-1}\text{V}^{-1}$ 。泳动速度除受上述粒子自身性质及介质粘度的影响外,还受其它因素的影响。

影响电泳速度的重要因素

一、电泳缓冲液的 pH

对于蛋白质和氨基酸等两性分子,电泳缓冲液 pH 值决定了它们所带净电荷的性质和多少。pH 值小于等电点,分子带正电荷,向负极泳动。如果 pH 值大于等电点,分子带负电荷,向正极泳动。pH 值偏离等电点越远,分子所带的净电荷越多,其泳动速度越快。当缓冲液 pH 值

等于其等电点时;分子处于等电状态,不移动。由于血清蛋白质的等电点多在 pH4~6 之间。因此,分离血清蛋白常用 pH8.6 的低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

离子强度是表示溶液中电荷数量的一种量度。离子强度等于溶液中各种离子的质量摩尔浓度与其价数平方之积的和的一半。

$$I = \frac{1}{2} \sum m_i z_i^2$$

式中 m_i 系离子的质量摩尔浓度, z_i 为相应离子的价数。

溶液中离子浓度越大或离子价数越高,离子强度就越大。对缓冲液来说,离子强度过低主要影响缓冲液的缓冲容量,不容易维持介质的 pH 恒定;离子强度过高,带电粒子的电泳速度减慢。这是由于带电的生物大分子吸附溶液中的相反电荷离子形成反离子层,犹如大气层包围地球。距离中心离子愈近,反离子密度越大,反之,密度越小。根据反离子与中心离子结合的紧密程度不同可将反离子层分为吸附层和扩散层。在电场的作用下,吸附层的反离子随中心离子一起泳动。离子强度越大,吸附层反离子越多,泳动粒子团的净电荷越少,泳动速度也就越慢。一般缓冲液离子强度多在 0.01~0.10 mol/L。

三、电渗

在电场中,液体对于固体支持介质的相对移动称为电渗。电渗是由于支持介质带有电荷而引起的。支持介质上的电荷使介质中的 H_2O 感应产生相反电荷。如纸上电泳所用的滤纸带有负电荷;琼脂电泳中,所用的琼脂由于大量的硫酸根存在也带有负电荷,它们使水感应产生水合离子 (H_3O^+),在外加电场的作用下,水向负极移动。如果被测定样品也带正电荷,则移动更快;如果被测定样品带负电荷,则移动减慢。所以电泳时,颗粒泳动所表现的速度决定于颗粒本身的泳动速度和溶液的电渗作用。因此在选用支持介质时,应尽量避免高电渗作用的物质。

四、电场强度的影响

电场强度增高,带电粒子受到电场力增大,移动速度加快,但迁移率不变!随着电场强度的增高,电流强度增加,产热也增加。产热的不良后果是:①引起水的蒸发,改变着溶液的 pH 和离子强度。②引起介质温度升高,可使蛋白质变性。因此电泳必须控制电压在一定范围之内。进行高压电泳必须备有冷却装置。

五、通电引起缓冲液电解和 pH 的变化

在电极槽内通电期间发生电解,生成酸或者碱。在 CA 膜电泳时每次都要更换电极的正负极。因为这样可使电解产生的 pH 变化最小。

计算通电 10mA30 分钟可产生 18 库仑的电量,在阴极端可产生 1.9×10^{-4} 当量的酸。仅仅产生这么一点酸便可使缓冲作用弱的缓冲液 pH 改变超过 0.1。使用缓冲液时必须考虑缓冲液的用量及离子强度等。

结束语

叙述了电泳分析的基本方面。其中主要的还是要充分地理解电泳的原理和支持介质的性质。使用时必须充分地探讨,什么支持介质能够适合于检测什么目的物。

第一篇 蛋白质电泳

1.1 醋酸纤维素薄膜电泳法

以醋酸纤维素膜(CA膜)为支持介质的电泳法,1957年首先由 Kohn 进行了尝试,得到了比原来使用滤纸对蛋白质分离效果好的结果。其后迅速普及起来,成为今天最广泛地被利用于血浆蛋白异常的筛选检验之一。

CA膜之所以被广泛地利用于日常蛋白分离是因为有如下的优点:①对蛋白成分的吸附分离良好。②可用微量样品。③电泳时间短。④染色、脱色、透明化及保存容易。但是,由于市售的数种 CA 膜的特性不同,必须定出适合于所用 CA 膜的条件。

这里以电泳操作法为代表来叙述日常的血清蛋白电泳分离方法。

原 理

带电粒子在电场中向着与其电荷相反的电极方向移动的现象称为电泳。蛋白质为两性电解质,在不同的 pH 下,其带电情况不同,在等电点时,蛋白质呈兼性离子其实积电荷为零,不发生泳动;蛋白质分子在 pH 小于其等电点溶液中,呈碱式解离,带正电,向负极泳动;在 pH 大于其等电点溶液中,呈酸式解离,带负电,向正极泳动。泳动速度除与电场强度、溶液性质有关外,主要决定于分子颗粒的电荷量及分子的大小与形状等,电荷较多、分子较小的球状蛋白质泳动较快。

CA膜电泳是利用 CA 膜做为固体支持介质的电泳技术,和纸上电泳相似并且是在其基础上发展起来的。该电泳技术具有比纸上电泳电渗小、分离速度快、样品用量少(可少于 10 微升)、分辨率高、分离清晰等优点。因此,从 1957 年应用此法以来,纸上电泳已逐渐被淘汰。CA 膜电泳的操作方法除比琼脂电泳、淀粉胶电泳和 PAG 电泳简便外,还有一显著优点,即染色后的薄膜可用乙醇、冰醋酸浸泡透明,透明后的薄膜便于保存和定量分析。

CA 膜可用于一般血清蛋白电泳、脂蛋白电泳、同工酶电泳、甲种胎儿球蛋白(α -FP)电泳、血红蛋白电泳以及免疫电泳等。

CA 膜电泳的具体方法

这里所设定的条件还是比较宽松的。因此,各个设施里经常保持一定的条件极为重要。各个单位设定本实验室的正常参考值也很有必要。

材料及仪器

1) CA 膜

CA 膜是把纤维素的羟基乙酰化而得到的醋酸纤维素的均匀的多孔膜。这个膜如前所述有许多优点。因此,不仅用于血清也广泛地应用于尿、脑脊液等的蛋白分离或其他的电泳方法。现在市售的 CA 膜有数种,分别具有不同的膜特性。因此,要根据目的不同选择不同的 CA 膜。

有代表性的 CA 膜的特性如表 1.1-1 所示。

表 1.1-1

CA 膜的特性

	separax	separax-S	separax-SP	celaphore
厚度(μm)	140	140	140	120
含水率(%)	180	180	180	180
折射率(μD^{20})	1.474	1.474	1.474	1.474
电渗度(mm)	12	7	0	0
涂布位置	距阳极 20mm	膜中央	距阴极 15mm	距阴极 15mm
特征	波形带明了,涂布位置与 el 重合	涂布位置与 el 重合	没有电渗影响	电渗影响小
含水率(%): (湿重-干重)/干重 $\times 100$				
折射率(μD^{20}): 氢化奈透明后的折射率				
电渗度(mm): 用维生素 B12 法的移动距离				

2) 缓冲液

用巴比妥-巴比妥钠缓冲液(pH8.6, 离子强度 0.05~0.07)。这种缓冲液有用一定量蒸馏水溶解后即可使用的市售品。因此,使用很方便。另外,自行配制可按如下配方(pH8.6 离子强度 0.06):

巴比妥 1.66 g

巴比妥钠 12.76 g

用蒸馏水溶解后加至 1000ml。

3) 染色液

对蛋白质染色主要用酸性染料。但是,由于各种蛋白质的种类不同对各种染料的亲和性也不同。因此,在结果的解释上必须加以注意。通常使用丽春红 S, 也有调配好的染液市售。而自行调配时的配方如下:

丽春红 S 0.2 g

三氯醋酸 3.0~5.0 g

加蒸馏水使成 100ml。

在尿、脑脊液等蛋白浓度低的样品时,也有使用比丽春红 S 敏感度高 10 倍的酸性紫 17 的。也有用 0.5% 氨基黑 10B 染色液的,因难于脱色现在很少使用。

4) 脱色液

用 1~3% 的醋酸水溶液。也有用异醇 45ml、冰醋酸 5ml、蒸馏水 50ml 为脱色液的。

5) 透明液

CA 膜的透明主要使用十氢萘。十氢萘挥发性很强,扫描后在室温放置短时间即可干燥,恢复原来的状态。因此,被广为利用。也有用 30ml 冰醋酸和 95% 乙醇 70ml 混合液或液体石蜡

为透明液的。

6) 电泳槽

在标准操作法里要求电泳槽的空间在 1000mm^3 ，缓冲液面的总面积包括膜面及滤纸面积在 200cm^2 以上的密闭的槽。这些条件主要是为了保持电泳中电泳槽内一定的湿度。也就是不使 CA 膜干燥，维持适量的缓冲液。它直接影响电泳分析结果的好坏。

7) 恒流装置

恒流装置能持续提供 $0\sim 200\text{V}$ ， $0\sim 60\text{mA}$ 的稳压、恒流就足够了。

8) 扫描仪

电泳后进行蛋白染色的 CA 膜使用通常的扫描仪可把各个部分的百分比分别计算出来。现在市售的大部分扫描仪都具有把总蛋白量作为资料输入的功能。由于输入了总蛋白量便可把各部分的蛋白绝对值计算出来。

9) 其它

涂布样品用刻度微量吸管、玻璃板或带盖的塑料容器（缓冲液、染色、脱色、透明等用）以小镊子（准备各种操作时用）。

操作方法

1) 电泳槽的准备

在电泳槽的两个电极槽里加入等量的电泳缓冲液（约 200ml ），准备好在 CA 膜和电极槽之间架桥用的滤纸 4 张（或纱布 4 层），用电泳缓冲液湿润后重叠起来把支持板和电极槽连接起来。注意在支持板和滤纸之间不要有气泡。另外，两电极槽的支持板之间要保持约 5cm 的距离。

2) CA 膜的准备

把 CA 膜切成 $2\times 8\text{cm}$ 的长度，也有此规格的市售品。用铅笔把样品涂布位置划上记号。涂布的宽度为 $8\sim 10\text{mm}$ ，膜的两端 1cm 左右不使用，以免使电泳图象发生歪斜。另外，CA 膜有正反面，有光泽的一面为正面，但正反面对电泳图象没有太大的影响。

接着把 CA 膜浸于另外准备好的电泳缓冲液中，使缓冲液充分浸透。电泳缓冲液浸透的时间约为 $5\sim 10$ 分钟即可。这时膜表面不要带入一点气体，否则膜的气孔中残留有空气，缓冲液的浸透不均匀，成为电泳图象发生紊乱的原因。不要使膜浮出于液面，要从一端慢慢地浸入缓冲液中使其充分均匀地浸透。缓冲液浸透后的 CA 膜夹在清洁的滤纸之间，轻轻地按压，除去膜上多余的缓冲液。

把 CA 膜平行地放于电泳槽的支持板上，使用滤纸或纱布等连接起来，用按压板把膜固定起来。如过分按压，滤纸中含有的缓冲液被挤压出来，缓冲液向膜的补充不充分。因此，要用按压板轻轻地按压。膜两端约 5mm 要与支持板上的滤纸等接触好。

用微量细管吸取样品一滴于玻片上，用如样器蘸取后，加到薄膜标记位置上，或用血红蛋白吸管吸取样品加样，轻轻地使管尖与膜面以均一的速度接触使成直线状。刻度吸管离开膜面时再次向原来的方向回拉一下可得到均匀的涂布效果。样品涂布费时较长可使 CA 膜干燥，开始涂布的样品产生扩散，使分离不清晰。因此，要尽可能缩短时间。电泳图象的好坏，样品涂布的好坏最为重要。因此，要反复地练习，掌握熟练的涂布方法。

血清样品的涂布量通常为 $0.4-0.8\mu\text{l}$ 。其它样品根据蛋白量的多少有时有浓缩的必要。样品涂布量过多或过少都不能得到正确的电泳图象。核查泳动距离用的样品中加入少量的BPB(溴酚兰)等,和白蛋白结合的色素移动距离可以作为电泳距离的参考。

4) 通电

通电以CA膜每1cm宽 0.5mA ,电压 15V/cm ,电泳时间约45分,电泳展开距离在3~4cm为好。

另外,由于通电后两个电极槽的缓冲液会发生变化。因此,每次电泳时改变电极的极性为好。同一个缓冲液最多可以电泳10次左右。由于多次改变极性使用,缓冲液的变化使蛋白质泳动距离稍变短些。因此,必须考虑泳动时间或通电量。提高通电量通电时间可以缩短,但焦耳热变大使膜干燥电泳图象紊乱。相反用低电流长时间电泳会引起蛋白扩散,分离不清晰。

5) 固定、染色

电泳结束以后用小镊子把CA膜浸入染色液里5分钟,染色液同时有固定和染色两种作用。电泳结束后如不迅速进行染色,则蛋白扩散分离变得不清晰,必须加以注意。另外,染色时间过长膜本身被染色,使脱色困难。因此,根据所用的膜有必要设定适当的染色时间。

染色液陈旧使pH升高成为固定不充分的原因,白蛋白等蛋白量多的区带的中心部出现不被染色的现象,有时能见到炸面包圈状(空心状)。

6) 脱色、干燥

染色后用1~3%的醋酸溶液反复数次更换脱色液脱色,脱色至背景成原来的白色。脱色终了用洁净的滤纸把CA膜夹起来,使其自然干燥。紧急时用吹风机使其迅速干燥也可,但是温度超过 60°C 会引起膜变性。因此,必须在 60°C 以下进行干燥。

在剪取各区带抽提定量时,脱色后趁着膜没有干燥用 0.01N 的 NaOH 3.5~5ml边振荡边抽提5~10分钟。抽提后用490~540nm波长比色定量。用干燥的CA膜抽提需要时间比较长。

7) 透明、扫描

使膜完全干燥后用十氢萘透明。膜干燥不充分或者湿润的膜是透明不均匀的原因。膜透明之后用扫描仪扫描,扫描时的狭缝宽度1mm以下,狭缝宽度为涂布样品宽度的 $1/2\sim 4/5$ 为宜,在电泳图象的中央扫描。另外,测定波长根据所用染料不同而异,要加以注意。

血清蛋白电泳图象

用CA膜电泳观察蛋白电泳分离图象,有在电泳图形透明前肉眼观察或者定量各个区带的浓度百分比的两种方法。前者主要对微量异常蛋白的检出有用,后者对各种疾病及了解病情变化有用。用这两种方法进行充分观察就可以把蛋白电泳分离的很多信息提供给临床。

正常蛋白电泳图象

正常血清蛋白电泳时可得到白蛋白, α_1 , α_2 , β , γ 球蛋白五条区带。各个区带的正常值因所用的CA膜的种类、电泳条件及年龄等而有所不同。这里根据标准操作法电流为 0.5mA ,电泳时间45分钟进行的。下面为使用不同CA膜所得到的健康成人正常参考值如表1.1-2。

表 1.1-2

蛋白电泳的正常参考值 (%)

	Separax	Separax-SP	Celaphore
白蛋白	59.8—71.5	61.2—74.0	60.0—71.7
α_1 球蛋白	2.3—4.1	1.0—2.7	1.6—3.5
α_2 球蛋白	5.7—10.4	4.8—8.4	4.9—9.6
β 球蛋白	6.2—10.8	6.8—11.7	6.6—11.5
γ 球蛋白	10.6—19.1	9.4—20.2	11.9—20.4

异常蛋白电泳图象

1) 在体外的变化

①血清保存的影响:在室温放置时由于干燥而浓缩,可出现细菌污染,蛋白变性等。因此,样品应该迅速处理。如要保存必需在 -20°C 以下冰冻保存。但是,必须避免反复冻溶引起蛋白变性。

②溶血的影响:由于溶血后血红蛋白释放到血清中,可以和结合珠蛋白结合而泳动到 α_2 - β 区带的位置,使 α_2 和 β 区带的分离不清晰。特别是超过结合珠蛋白的结合力的血红蛋白被释放出来成为游离血红蛋白,游离血红蛋白泳动在 β 区带部分使 β 部分的结果增高。

③血浆和血清的不同:使用血浆进行蛋白电泳时,在血清中不存在的纤维蛋白原被泳动在 β - γ 区带之间。用 Separax 膜电泳时出现特有的弓形蛋白带,有必要与 M 蛋白进行鉴别。

2) 不同疾病的异常蛋白电泳图象 各种疾病时有代表性的蛋白电泳图形如图 1.1-1。

①急性炎症型:由于急性炎症时所谓急性时相反应性物质的糖蛋白增加,电泳图形的特征主要是由于 α_1 -抗胰蛋白酶, α_1 -酸性糖蛋白而使 α_1 区带增加。以及由于结合珠蛋白,铜兰蛋白的增加使 α_2 区带增加。另外, β 区带 $\beta_1\text{C}/\beta_1\text{A}$ 的球蛋白也增加,而转铁蛋白的减少 β 区带减少也有一定意义。血清总蛋白浓度和白蛋白浓度也有减少倾向。

②慢性炎症型:由于炎症持续成慢性,不仅急性时相反应性物质增加,而且慢性刺激反应的结果出现宽阔的 γ 区带,可见到多克隆性免疫球蛋白增加。

另外,在持续消耗性疾病时出现蛋白不足型,白蛋白区带、 β 区带减少。

③慢性肝病型:由于严重的肝细胞损害,肝脏生成的蛋白显著减少,各球蛋白呈多克隆性增加。球蛋白区带里的 γ 区带广泛性增加,其它区带都减少, β 和 γ 区带分离不清。这是由于转铁蛋白的减少所致。 α_2 的增加使 β 和 γ 区带之间没有低蛋白区带。把这种电泳图象叫做 β - γ 搭桥现象。这种搭桥现象在慢性肝损害特别在肝硬化时多见。

④肾病型,也叫选择性蛋白漏出型。由于肾小球基底膜的通透性发生改变,分子量比较小的蛋白被选择性地由尿中排出。因此,出现显著的低蛋白血症。蛋白电泳图象中可见白蛋白显著减少, α_1 轻度增加, α_2 显著增加, γ 区带减少, β 区带因病情而异。 α_2 显著增加是由于 α_2 巨球蛋白、结合珠蛋白、脂蛋白等的增加而引起。

⑤蛋白不足型:营养不良使蛋白合成必需的氨基酸不足,以及血清蛋白丢失到血管外或体外的漏出性胃肠病,可见血清总蛋白浓度低下和白蛋白区带显著减少, α_1 、 α_2 区带正常或有增加倾向。但随蛋白不足的进展而减少。

⑥ γ 区带缺乏型:可见于原发性及继发性免疫不全症候群。前者是先天性的产生缺失,后者是由于原发疾病的影响而产生低下。蛋白电泳图象可看到 γ 区带的显著减少或缺失。另外,