

色谱分析讲义

上海市科技交流站

细胞电泳及其应用

一、原理及意义

1. 什么叫细胞电泳

细胞可以看成比蛋白质、核酸分子大得多的颗粒，细胞的表面上有着许多可解离和带电的基团，若细胞悬浮于一定酸碱度的介质中，其细胞表面与介质相比有着相反符号的电荷。一般情况下，细胞表面带负电荷，在电场中即向阳极移动，这种现象称为细胞电泳。液体介质对于容器壁的移动，称为电渗。电渗在细胞电泳中有特殊的影响，这一点以后再作介绍。

2. 电泳发生的原因及细胞表面电荷的来源

电泳现象发生的原因，是细胞表面带有与分散介质相反的电荷，这被称为表面电荷。另外电渗发生的原因，也说明分散介质中带有与分散相（即细胞）相反的电荷。分散介质与分散相带有异种电荷是电泳与电渗发生的内因，但要在一定的外加电场作用下才能发生，这就是外因。

分散于一定介质中的细胞表面电荷主要来源于：

(1) 其表面的水解和电离，即把胶粒或细胞的表面看作电介质，由于水解作用及电离作用，产生了净余的电荷。细胞及许多生物颗粒表面上的蛋白质、核酸、脂类、多糖上部有一些可以被电离的基团，如羧基、羟基、磷酸基、氨基、巯基等。有的作者证明了细胞表面糖蛋白上巯基的羧基的介离，是细胞表面电荷的来源之一。

(2) 其表面对分散介质中离子、分子的吸附。这种吸附在本底上来说是静电引力、范德哈尔力、氢键的作用等所致的。

以上这两种原因中，也可能存在着这样的情形：生物颗粒或细胞表面某些可电离基团解离后，也可时或送一部离子到分散介质中去，而分散介质中一些物质分子被生物颗粒或细胞表面吸附后，这些被吸附的物质分子可能再电离，再吸

附。也有一些物质分子，被吸附到生物颗粒或细胞表面以后，并不发生水化及电离，相反还阻碍其他离子被吸附。如脂类被细胞表面^{吸附}电荷下降。

3. 细胞电泳与其他电泳(如纸上电泳)的比较

这两者之间，基本原理相同，都是以多相系统(例如细胞悬液、蛋白质胶体溶液等)在外加电场的作用下，发生分散相(例如悬液的细胞或蛋白质分子)对分散介质(例如各种溶液)的相对位移为基础的。

但在这两者之间，在实验被测对象的大小、实验方法以及实验目的上存在着较大的区别。

对被测对象来说，细胞电泳中，被测的是细胞，要比其他电泳中被测的核酸、蛋白质等生物大分子体积大得多，要比氨基酸、核苷酸等小分子的体积更大得多。

对实验方法来说，细胞电泳应用显微镜直接观察细胞的运动，因此细胞电泳也称显微电泳，而其他电泳技术则待电泳完毕以后，通过显色或其他光学方法来进行定性或定量。

对实验目的来说，细胞电泳是用显微镜直观，求出细胞运动一定距离所需要的时间，从而可以推算出细胞电泳的速度(微米/秒)，电泳率(微米/秒/伏特/厘米)，根据电泳率尚可推测出细胞表面电荷的多少(库仑或静电单位)，或推算出细胞表面的电位(即 Zeta 电位)，根据运动的方向，还可以了解到表面电荷的性质(即正还是负)，以上这些参数的变化，可以推测细胞表面结构与功能的改变，因而在生物学与医药学中的应用是极为普遍的。其他电泳的目的，则主要为分离、纯化、鉴定、定性、定量各种生物物质或其他物质的。

4. 细胞电泳在生物学及医药学中的意义

细胞电泳技术既然是通过测定细胞表面电荷性质和密度，以研究细胞表面结构和功能变化的一种生物物理方法，因此一些发生在细胞表面的变化与生物反应能精密地反映出来。大量事实表明，细胞表面与代谢调节和物质运输、细胞稳定性的维持，机体免疫反应，病毒的感染与侵入，正常细胞的

癌化过程等发生和进行的场所，而其本身又是这些重要过程的直接参加者，并在结构与功能上显示出相应的变化。研究细胞表面的方法固然很多，如电子显微镜、X光衍射、核磁共振等。这些方法均能从不同角度提供有关细胞表面结构与功能的资料，但上述方法共同缺点是：它们所揭示的是非活细胞的表面结构状况。细胞电泳技术优于上述方法的重要特点之一，就是能够在维持细胞完整无损的自然状态下，将外来因素减少到最低限度的相对稳定环境中，通过测定完整活细胞表面电荷。对由于各种病理因素、各种药物、代谢产物、抗原、细菌、病毒等作用而引起的细胞表面结构、组成和功能的改变进行精细研究和定量分析。

我们有1974年以来，建立细胞电泳技术，并开展祖国医药学活血化瘀原理，对中风、冠心病及各种缺血性血管病的研究及对巨噬细胞电泳试验诊断肿瘤等方面有些初步的体会。关于细胞电泳技术在医药学中的应用问题，我们结合自己在实践中的体会及国外外开展工作的情况，在以后再作详细介绍。

二. 细胞电泳装置

细胞电泳装置有以下组成：

电源及线路系统

观察小室及电极系统

光学观察系统

恒温系统

计时器

现将这五个组成部分介绍如下：

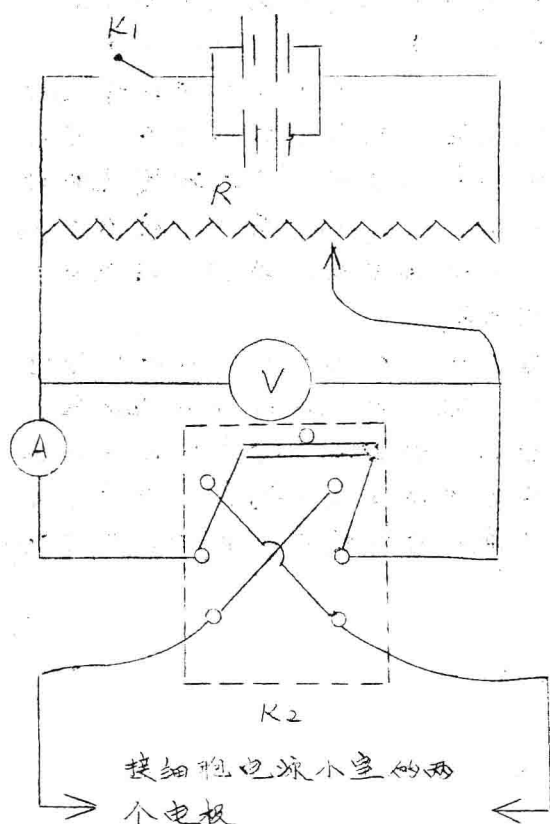
1. 电源及线路系统

电源用壹号L干电池，每节45伏特，共用四节，一般两节并联，两节串联，但可根据所需电压数值，可以随意更换。

电源也可DYI电泳仪直流电源，但不如用干电池稳定。

好。

线路图如下：



K_1 单刀单掷开关
 K_2 六柱双刀双掷开关
 A 安培表
 V 伏特表
 R 变阻器

图 1 线路

2. 观察小室及电极系统

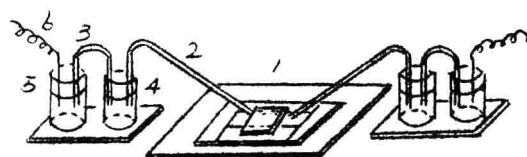
观测小室是细胞电泳装置的最关键部分。根据观测小室的两端是否与空气相通，所有的细胞电泳装置基本上可分为两大不同类型，即开放型和密闭型细胞电泳装置：

(一) 开放型细胞电泳装置：

图 2 A 和 B 所示为属于这种类型的细胞电泳装置的两个例子。在第一个例子中：细胞悬液的灌充和排出系统是在一

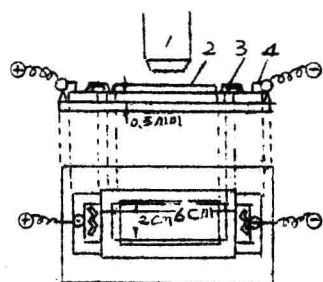
块宽的载物片上，由四块薄的盖玻片粘合一起做成的长条形槽，在其上面再盖上一块薄的盖玻片，则构成观测小室。电极是由金属铂和饱和硫酸铜溶液组成的去极化电极，并通过罐满 1~3% 琼脂的虹吸管与盛有 10% 氯化钾溶液的小烧杯相连。后二烧杯又通过虹吸管与观测小室相连。

在第二个例子中，细胞悬液的灌注和排出系统，如图 2 B 所示，是由一块矩形玻璃板制成，其上挖了一个长为 3 厘米、宽为 2 厘米和深为 0.5 毫米的矩形浅槽，在其中央部分盖上一块薄的盖玻片，则成为观测小室。电极是采用金属铂片，并通过“棉线盐桥”与细胞悬液相连，以防气泡的形成。



A

- (1) 观测小室；
- (2) 琼脂虹吸管；
- (3) 琼脂虹吸管；
- (4) 盛有 10% 氯化钾溶液的小烧杯；
- (5) 盛有饱和硫酸铜溶液的小烧杯；
- (6) 金属铜棒



B

- (1) 显微镜物镜；
- (2) 观测小室；
- (3) “棉线盐桥”；
- (4) 铂电极

图 2 开放型细胞电泳装置

开放型细胞电泳装置的优点是：(1)结构简单，制作容易，便于推广；(2)经济，不易损坏，操作简便；(3)所需细胞悬液的量比较小，约1~2毫升。其主要缺点是：(1)由于观测小室的两端是开放的，因此，在观测小室中极易产生不是由于电场作用而引起的机械性的液体流动和悬浮细胞的机械性的“飘移”；(2)不宜根据经典的流体力学公式准确计算出细胞的真实电泳率，因为该公式不适用于两端开放的观测小室；(3)细胞，特别是较大的细胞，容易沉积于小室底。从而使实验工作中断。

(二) 密闭型细胞电泳装置：

密闭型细胞电泳装置根据其观测小室的形状和结构的不同，又分为多种式样。其中以圆柱式和长方扁平式为目前一般最常用。

(1) 圆柱式细胞电泳装置：

目前一般最常用的圆柱式细胞电泳装置等是一个U形玻璃圆管(图3A)，其内灌满细胞悬液。U形管底是一个长为10厘米、内径为2毫米的细玻璃圆管，其中央部分是进行显微镜下观测的地方，即观测小室。U形管底的上部装有一根长玻璃棒，作为整个U形管的固定之用。观察小室两端的密闭是采用在U形管的两端各装一个玻璃磨口活塞的方法，电极是采用金属铂片，并穿过玻璃活塞的中心直接浸泡在细胞悬液中。电极也是采用由银—氯化银和饱和氯化钾溶液组成的反极化电极，它是通过安装在U形管底两侧，并与观测小室平行的两个玻璃磨口活塞与观测小室相连(见图3B)。

圆柱式细胞电泳装置的主要缺点是不能同时观察细胞的形态变化，这是因为圆形玻璃管具有凹面，实际上是一个凹面镜，从而使显微镜下的成像发生畸变的缘故。为了克服这一缺点，有人将圆形玻璃管的前侧或前后两侧用不同型号的金钢砂磨平(图2A下)；还有人将观测小室的内腔做成四角方形。国外已作为商品出售的“Zeiss细胞电泳装置”，就是其中之一例。然而，更为常见的，是将观测小室做成长方扁平式的。

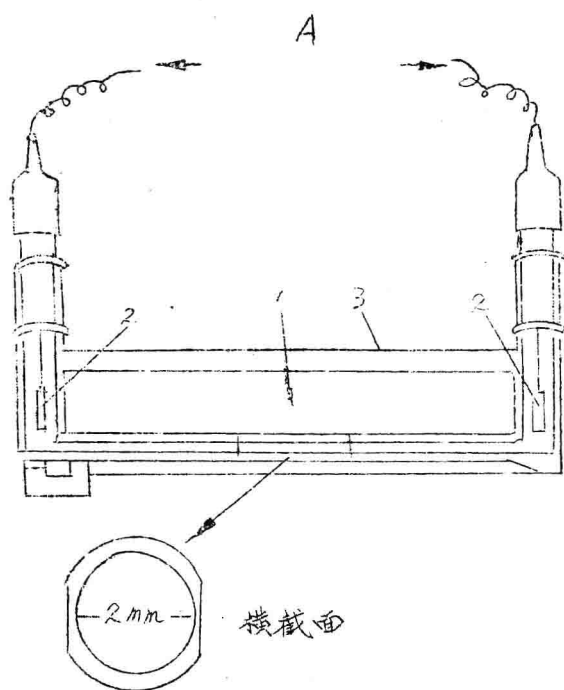
(2) 长方扁平式细胞电泳装置:

在这一类式样的细胞电泳装置结构示如图4。它全部由派列克斯优质玻璃制成。观测小室系由两块0.6毫米厚的载玻片构成,沿载玻片的两边侧再用0.6毫米厚的细玻璃条焊接或粘合,做成一个长方扁平的中空小室。宽度同深度的比大于20:1。小室的两端各通过一圆形玻璃管与三通玻璃磨口活塞相连接。装在漏斗中的细胞悬液则可以经三通活塞流入观测小室内,再经另一端的三通活塞排出。电极是采用由铜—硫酸铜溶液组成的平板化电极并通过三通活塞的另一通路与观测小室相连接。这样,当细胞悬液充满观测小室之后,旋转一下三通活塞,观测小室则与装有铜—硫酸铜溶液的玻璃圆管接通,随着电流的导入,细胞则发生移动。为了防止硫酸铜溶液流入观测小室内,污染细胞悬液,在两者之间一般用烧石膏或琼脂溶液使之隔开。长方扁平式的观测小室可有三种不同的摆法:水平摆法、侧摆法和垂直摆法。它们各有优缺点。

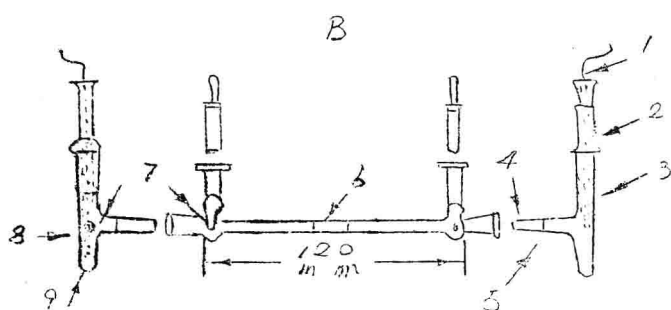
综上所述,密闭型细胞电泳装置,不论是圆柱式的或长方扁平式的,在很多方面是明显地优于开放型细胞电泳装置的。但是,在实际应用过程中亦逐步发现它们具有下列一些共同问题和缺点:

(1) 由于采用两通或三通普通大小的玻璃活塞作为观测小室两端的密闭以及与电极系统的连接之用,而且以玻璃活塞的数目来看,少者为两个、四个,多者可达九个,结果造成装置的结构复杂,有些部件与深度可小至0.5毫米的观测小室不成比例地庞大和笨重。

(2) 装置的制作困难,工艺要求高,生产效率低。这种情况的产生主要是如深度可小至0.5毫米的观测小室均是采用人工焊接、粘合或磨平的手工操作方法制成的分不开的。



(1) 观测小室 (2) 铂电极 (3) 玻璃固定棒



(1) 银丝 (2) 玻璃管 (3) Pyrex 玻璃管
(4) 玻璃磨口 (5) 电极小室 (6) 观测小室
(7) 不锈钢丝 (8) 银片 (9) 氯化钾结晶物

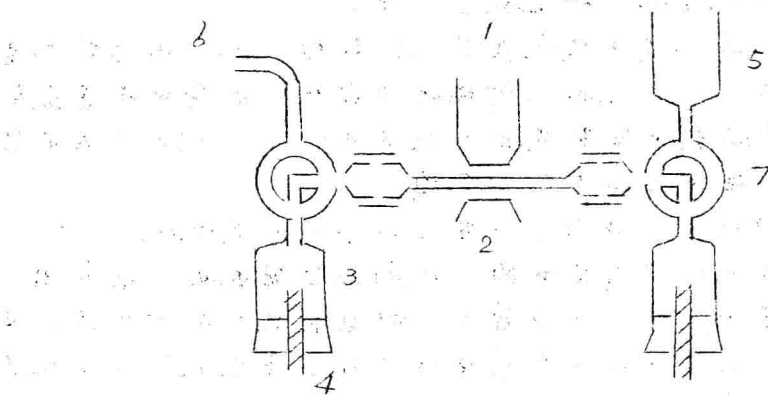
图3 圆柱式细胞电泳装置

(3) 所需细胞悬液的量比较大。少者(如图柱式〔图3 A、B〕)4毫升,多者(如长方扁平式〔图4〕)10~20毫升。这对于细胞电泳技术在医学临床上的应用,显然是一个亟待解决的问题。

(4) 由于观测小室的深度均为固定的,不能够随意调节,因此,不能适用于大小相差悬殊的不同生物材料。

(5) 操作和测量过程尚不够简便,采用普通玻璃磨口处塞密闭观测小室的效果尚不够十分可靠,结果,细胞的不是由于电场作用而引起的机械性“飘移”以及细胞在电场作用下向左和向右移动速度的差异均不能从根本上消除。

(6) 由于细胞容易沉积于观测小室底,结果,为完成一次测量工作,即测得10~20个细胞的平均电泳率,往往不得不更换细胞悬液数次,这不仅增加了细胞悬液的需要量,而且亦使操作过程更加费时和费力。



(1) 显微镜物镜 (2) 显微镜聚光镜 (3) 饱和硫酸铜
电极溶液 (4) 铜电极 (5) 溶液的进口 (6) 溶液的
出口 (7) 玻璃活塞

图4 长方扁平式细胞电泳装置

(3) 简便、微量方形毛细管式细胞电泳装置

观察小室是一个长为 5~6 厘米长的，内径是一个，平方毫米左右的方形玻璃毛细管。管径横截面的大小大约为 0.5~1.5 毫米见方均可，可以根据需要选择。

当这种玻璃毛细管一头浸入被测细胞悬液的液体时，借助毛细管现象作用力，液体很快充满内腔。两头用适当口径的塑料管（内充 1% 琼脂和 10% 氯化钠）各套入 2 毫米，由于塑料管尚有一定的弹性，方形玻璃毛细管与塑料管之间的接触是比较紧密而又牢固的，不另横放或竖放液体均不会漏出。

然后将方形毛细管连同两头的塑料管，放入一个用有机玻璃做的支架上，这支架长 1.5 厘米，宽 2 厘米，厚 0.5 厘米，中心开一条方形的浅槽，中心恰容方形毛细管安入，两头恰容塑料管嵌入（见图 5）。

然后将两根银电极分别插入塑料管内的琼脂中，通过两个小型接线柱把这两个银电极固定住。

再把有机玻璃支架固定在显微镜载物台上，由于整个支架的下边有两只脚，这两只脚间的距离恰好相等于普通载玻片的长度，显微镜的弹簧夹正好把它夹住，可以上下左右移动。並將两个电极通上电源（见图 1）。

在电极问题上，我们曾应用了以下两种类型电极：

A. 金属电极。有银和铂，我们经验铂电极只能应用于非离子等渗溶液（如 9% 蔗糖），银电极概可用于非离子等渗溶液，也可应用于离子等渗溶液（如生理盐水，199 培养液，血浆，血清，Hank's 溶液等），因此一般应用银电极比铂电极好。

B. 可逆电极，有 $\text{Ag}-\text{AgCl}$ ， $\text{Cu}-\text{CuSO}_4$ ， $\text{Zn}-\text{ZnSO}_4$ ， $\text{Ag}-\text{AgNO}_3$ ，可逆电极在理论上比以上所述的银电极还好，但操作上较为麻烦。

更由于银电极泡在 10% 氯化钠的琼脂中，通电以后形成变质的银——氯化银电极，故银电极仅次于以上可逆电极，不过在实际操作时，尚须注意通电时间不宜过久，要求两边

换白板为白瓷。

方形毛细管式细胞电泳装置示意图(图5)。

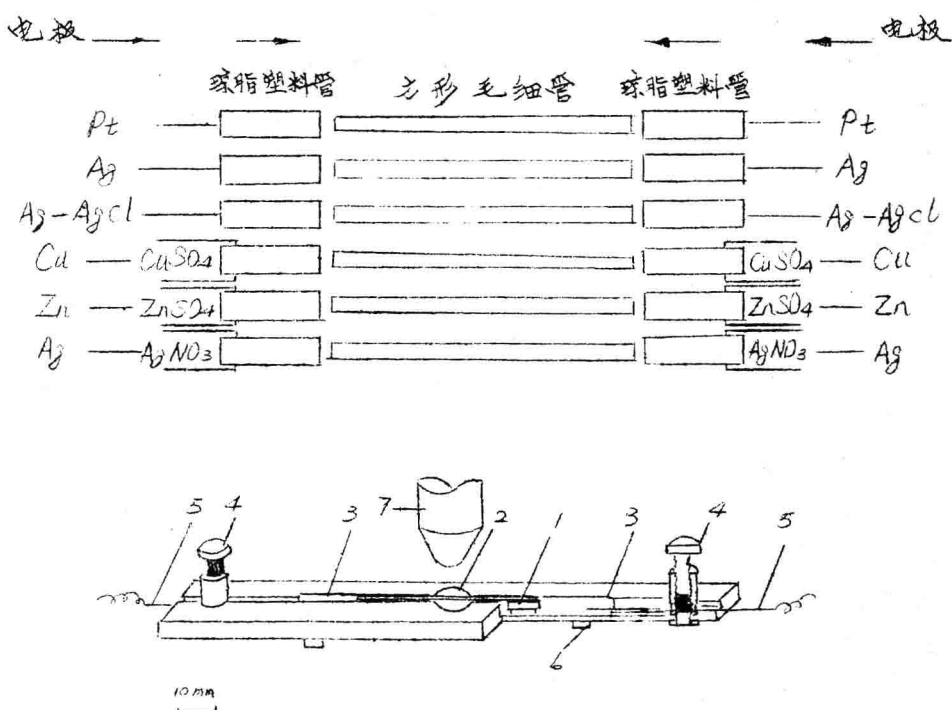


图5 方形毛细管式细胞电泳装置示意图

上图: 方形毛细管、琼脂塑料管及电极联接法, 箭头示装置方向。

下图: (1) 方形毛细管 (2) 观察窗 (3) 琼脂塑料管
(4) 固定电极接线柱 (5) 银丝 (6) 夹脚
(7) 显微镜物镜

以上所提到的方形玻璃毛细管的拉制方法分两步：

第一步：制造方形玻璃原料管。

A. 由圆变成方：购买上玻一厂的GG-17玻璃管，长50~60厘米，内径1~1.5厘米，在煤气-氧气焰上加热，当玻璃软化时，则将事先磨好的方形碳精棒或不锈钢棒插入内腔，如此经过几次插入与退出，圆形管则被挤压成为形管。

B. 焊接粘合法：将四块宽度为2厘米、厚度为1~2毫米、长度不限的玻璃条，放在煤气灯火焰上加热焊接或者用环氧树脂粘合而成，为了保证四块玻璃之间焊接或粘合得均匀和牢固，需事先用金刚砂将其边缘各磨成45°的角度。

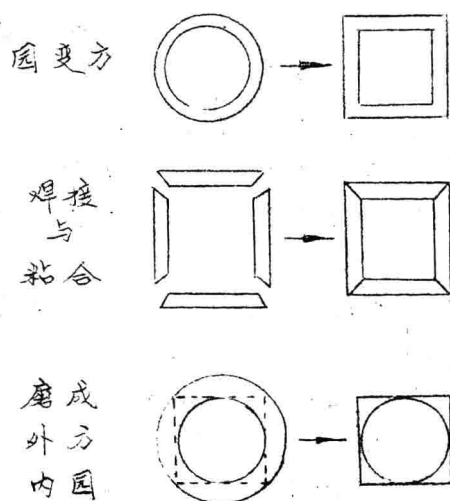
C. 由圆磨成方：将圆形玻璃管的外周磨成近正方形，则变成外方内圆管。

第二步：由方形原料管变成方形毛细管。

需做一个特制的小型竖式电炉，该电炉的炉腔是一个内直径为3~4厘米的石英玻璃管，外面绕上1KW电热丝，电热丝外边应上一个石棉围筒，以防止散热，这电炉上竖着固定在一个能升、能降的装置上，原料管升入炉腔内，并固定妥，下端挂上一个一定重量的砝码，将电炉安放在原料管下部，通过调压变压器逐步通电加热，慢慢地使原料管熔化，受砝码重力拉大变细成为方形毛细管，逐步升高电炉，使整根原料管变成毛细管为止，毛细管的粗细度及均匀度，是通过加热电压、电炉上升的速度以及砝码重量这三者的关系进行控制的，各种原料管原来是什么样，拉出的毛细管仍是什么样，原来磨面经过加热熔化，已变成了光面，方形毛细管制法见示意图（图6）。

用显微镜观察方形毛细管中的细胞，其形态清晰，不变形；而未经磨制的圆形管中，细胞形态变形；但经磨制的外方内圆毛细管中，从中心切面处观察，细胞形态与方形管中一样清晰。

各种原料管



拉制方形毛细管的电炉及拉制方法

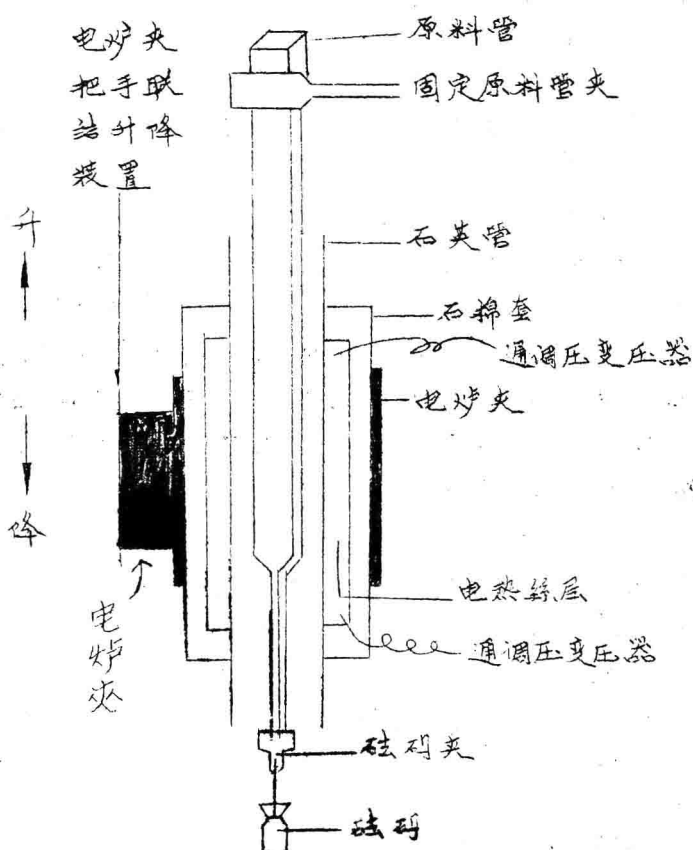


图6 方形毛细管制法示意图

以上所述方法毛细管式细胞电泳装置与其他各种细胞电泳装置相比有如下优点：

(1) 由于采用硅胶连接管封闭观察小室和联结电极，因而使整个装置结构简单，体积小，重量轻，取材便当；

(2) 方形毛细管可以大批生产，毛细管损坏可以重新更换；

(3) 所用细胞悬液很少，大大减轻病人抽血量，且可多次重复实验结果；

(4) 由于观察小室横截面积极小，所以电流强度很少，从而减少因电流过大而引起的干扰；

(5) 被观察细胞形态十分清晰。

但由于我们实践时间尚短，还有很多地方尚有待大家共同提高和完善。

3. 光学观察系统：

显微镜：普通显微镜及相差显微镜均可。要求显微镜可以侧放，载物台可以从水平变成垂直方向，物镜倍数有 $10\times$ ， $45\times$ ，目镜 $10\times$ ，内附棋盘式目镜测微器，经物镜测微器校正，在 $450\times$ 放大率下，是一个 165 微米的正方形，每边共分十格，每一小格为 16.5 微米。通过棋盘测微器来衡量细胞泳动的距离，并同时用秒表和电子计时器记录下时间。

在观察时要有适当的光源，一般 $18W$ 显微镜灯泡是合适的。显微镜的细调节轮上须标有转一圈相当变化显微镜高度的常数（这一点以后再详细讲）。

4. 恒温系统

有两种恒温系统，一种是水恒温法，把整个细胞电泳小室及电极装置浸泡在恒温水流中或不断通以恒温水源而维持。这种做法要求整个细胞电泳小室和电极密封性非常好，不能有任何漏水，否则就发生漏电。同时显微镜须有水镜头。

另一种是用空气恒温，即把整个装置放在恒温的空气中。我们采用后一种方法。我们采取以下两个办法解决，(1) 建立恒温小室，整个细胞电泳装置及实验操作者均在恒温室中操作；(2) 建立恒温橱，把细胞电泳全部设备放入恒温橱中，

把显微镜目镜伸出橱外，即人在橱外观察，操作者用手伸入橱中操作，

5. 计时器

一般用秒表（30秒一圈），可以读到秒以下小数点后两位，

也可用电子计时器。由于每一个标本要测十个细胞，每个细胞来回各一次，共有20个数值求平均值，这样电子计时器还能累计，叠加，代替一部分脑力劳动，使用电子计时器且比秒表准确性好并客观性强。

三. 操作方法

1. 静止层的测定

A. 电泳率与管径的关系：在封闭式的方形毛细管式细胞电泳中，电泳率与管径互成抛物线关系，即管中心电泳最快，管边沿最慢（图7）为什么会发生这样的现象呢？这

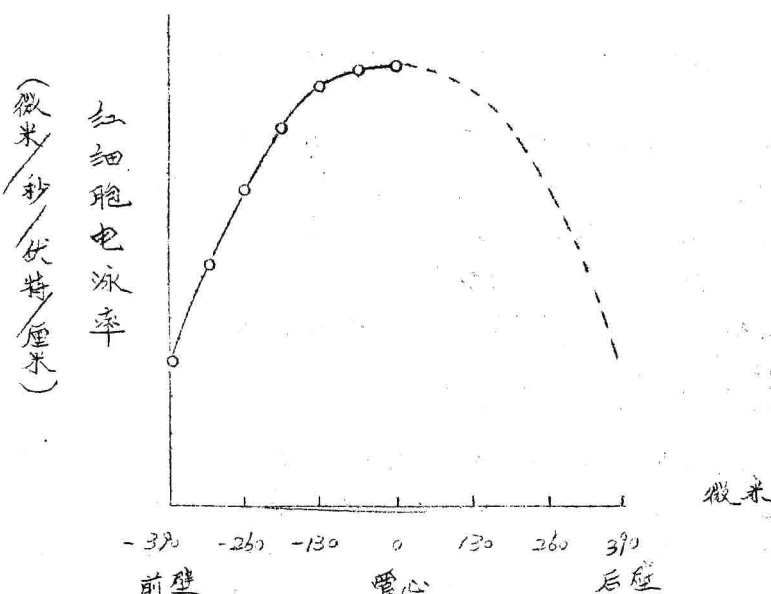


图7 红细胞电泳率与管径的关系

是由于电泳与电泳相互作用的结果。因为玻璃容器中，玻璃也带负电荷，液体的电泳现象是沿管壁从正极到负极，到负极以后，又从管心倒流回来，由于细胞带负电，总是由正极向负极泳动，故细胞在管心处是电泳加电渗，在靠近管壁处是电泳减电渗。根据流体力学的定律，在观测小室是封闭条件下，室中总流动为零，可以在观察小室中心至边上的中间，找到一个电泳等于零的地方，在这个地方是纯净的电泳，而没有电渗，故称为静止层。细胞电泳必需在静止层上观察，得到的结果才是真正电泳率，其余地方得到的电泳率是电泳与电渗的相加或相减，电泳、电渗、静止层间的关系见图8。

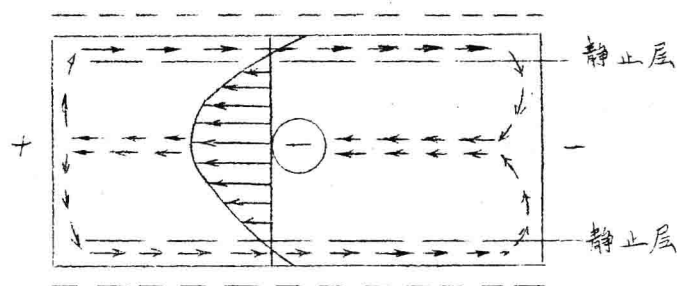


图8 电泳、电渗、静止层的关系

E. 静止层的理论推导及实际测量

在静止层上观察细胞电泳，是本技术的基本要求之一。因此必须搞清楚静止层在什么位置及实际测量的方法。

(1) 静止层的理论推导结果：

根据流体力学纳维叶——斯托克斯公式：

$$\frac{\partial^2 U}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 U}{\partial z^2} = \frac{1}{\eta} \frac{dp}{dx}$$

可以推导出各种电泳小室的静止层的位置，由于整个推导过程比较麻烦，本处仅将其结果罗列于下：

圆柱式电泳小室：静止层至圆心的距离为半径的0.707，
即静止层至圆周的距離为半径的0.293。

长方扁平式（宽：高=∞）：静止层离“天花板”距离