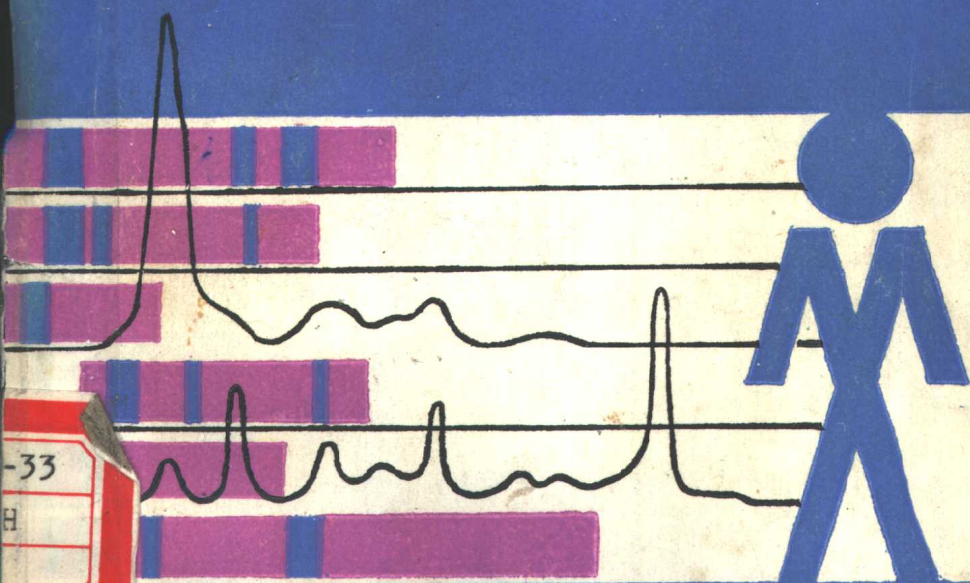


SHIYONG DIANYONG JI MIANYI
DIANYONG JISHU

实用电泳及免疫电泳技术

●周本正 编著



湖北科学技术出版社

实用电泳及免疫电泳技术

●周本正 编著 湖北科学技术出版社



实用电泳及免疫电泳技术

周本正 * 编著

湖北科学技术出版社出版发行 新华书店湖北发行所经销

咸宁市印刷厂印刷

787×1092毫米 32开本 8.125印张 170千字

1988年10月第1版 1988年10月第1次印刷

ISBN7-5352--0263-2/R·55

印数：1—7900 定价：2.40元

前 言

电泳技术是生物化学、免疫化学和分子生物学在分析、分离、纯化与鉴定物质中不可缺少的一项测试技术。

当前，生物试样组分的分离、有层析技术、超离心技术和电泳技术三大类别。层析技术、当今已进入高压液相色谱分析新领域——高级层析系统。但由于仪器昂贵、设备条件要求高、一般实验室不易推广使用。常用层析方法虽为一般实验室所采用，但实验方法繁杂、费时，还不够理想。超离心技术要求条件更高，因此，不能常规使用。电泳技术由于在技术上不断更新和完善，以及良好的经济适用性，进展迅速，已被所有生物科学领域广泛采用，成为当今生命科学中分离、鉴定以及纯化生物化学活性物质中最简便、快速、准确的一种新技术。

本书主要介绍常用电泳、微量免疫电泳、

放射自显影、聚丙烯酰胺凝胶电泳、聚焦电泳、双向电泳、转移电泳和核酸(DNA/RNA)序列电泳分离技术。并按每种技术程序、要求和技术进展,列五个专题编写,即电泳技术简介、分类及应用,电泳的基本原理以及各类电泳技术和附录。附录中绘制了各种电泳图型,其图表和数据多以本室实验结果为例。本书可供生物学、生物化学、分子生物学、分子遗传学、免疫化学、临床化学、微生物学、病毒学、寄生虫学、动植物学、畜牧医学、职业医学、法医学的科研人员、卫生实验人员、临床检验人员以及高等院校师生参考使用。

刘恭植

1988.5.

序

《实用电泳及免疫电泳技术》一书，系统地介绍了当前常用的各种电泳及特殊的电泳技术，包括其原理，操作要点及研究进展。内容极为丰富，具有先进性和适用性。可作为生物科学和临床实验研究工作者的有益参考书，对广大基层工作者更具有指导意义。

李玉瑞

1988.5.

编者的话

本书出版前，曾经卫生部全国卫生防疫湖北教学基地、黄石职业大学列为教材，并在湖北省药检专科学校主管技师班讲授。根据多方意见和要求，结合作者长期从事电泳技术所积累的知识和经验，并参阅了国内外有关文献，编写成这本技术性专业书籍。在编写过程中，中国预防医学科学院李玉瑞研究员、同济医科大学张国高教授、湖北省药检专科学校校长黄森琪研究员、镇江医学院刘恭植教授等进行了审阅和指导。本书的出版还得到湖北科学技术出版社的大力支持与帮助。在此，一并表示衷心的感谢。

本书在出版前虽经多次修改，但由于作者水平所限，难免有不妥之处，请读者批评指正。

编 者

1988.5.

目 录

一、电泳技术发展简介	(1)
二、电泳技术的分类及其应用	(4)
(一) 电泳技术的分类	(4)
(二) 电泳技术的应用及研究	(6)
三、电泳的基本原理	(8)
(一) pH在缓冲系统中的作用	(10)
(二) 溶液的离子强度	(11)
(三) 电场强度	(12)
(四) 电渗现象	(13)
(五) 其他有关因素	(15)
四、各类电泳技术	(15)
(一) 一般实用电泳技术	(15)
1. 纸上电泳	(15)
2. 淀粉板电泳	(19)
3. 琼脂和琼脂糖凝胶电泳	(20)
4. 醋酸纤维素薄膜电泳及其应用	(21)
5. 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 技术 及其应 用	(34)
(二) 特殊电泳分离技术	(36)
1. 聚丙烯酰胺凝胶 (PAG) —— 十二烷基硫酸钠 (SDS) 电泳技术测定生物分子量和迁移率	(86)
2. 凝胶等电聚焦电泳 (GIFE) 技术	(98)

3. 新型制备式聚丙烯酰胺凝胶单管电泳技术.....	(105)
4. 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离——银染协同作用的病毒核酸 (RNA) 快速诊断技术.....	(109)
5. 聚丙烯酰胺凝胶圆盘圆芯免疫电泳技术.....	(114)
6. 聚丙烯酰胺凝胶高效双向电泳分离技术.....	(116)
7. 转移电泳技术.....	(120)
8. 核酸 (DNA/RNA) 测定及序列凝胶电泳分离技术.....	(124)
9. 显微细胞电泳技术.....	(140)
(三) 免疫电泳技术.....	(145)
1. 琼脂和琼脂糖免疫电泳.....	(145)
2. 琼脂 (糖) 对流免疫电泳.....	(151)
3. 琼脂 (糖) 火箭免疫电泳.....	(155)
4. 琼脂 (糖) 交叉免疫电泳 (双向免疫电泳技术).....	(163)
5. 醋酸纤维素薄膜微量免疫电泳制作技术.....	(165)
6. 放射免疫电泳自显影技术.....	(176)
7. 酶标电泳测定技术.....	(183)
五、附录.....	(189)
(一) 电泳分离的多种表现形式示意图.....	(189)
(二) 41例不同分离带与28类样品区带数.....	(220)
图119 41例不同肿瘤病人血清样品 (PAGE) 分离示意图.....	(220)
表19中28类样品盘状电泳区带数参考值.....	(221)
(三) 正常人与患者血清、组织液中乳酸脱氢酶 (LDH)同工酶PAGE分离酶谱图.....	(222)

1. 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离正常人体部分组织中乳酸脱氢酶 (LDH) 同工酶电泳谱及亚基表现形式·····	(223)
2. 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离成年小白鼠组织液中乳酸脱氢酶 (LDH) 同工酶图谱·····	(223)
(四) 人血浆中蛋白质电泳分离成分·····	(224)
(五) 聚丙烯酰胺凝胶电泳技术应用的主要方面·····	(229)
1. 血清中各种蛋白质的分离与测定·····	(229)
2. 血清中各种酶活性物质的分离与酶谱分析·····	(229)
3. 尿、组织液和骨髓液中各种成分的分离与实验研究·····	(230)
4. 其他重要生物物质的分离、分析与研究, 包括动植物、职业危害、法政医学等·····	(231)
(六) 试剂纯制方法·····	(232)
(七) 不同缓冲系统及其配制·····	(233)
常用生化、免疫计量单位名称表·····	(238)
希腊字母表·····	(239)
参考文献·····	(241)

一、电泳技术发展简介

电泳 (Electrophoresis) 是指带电胶体粒子或分子在电场的影响下定向移动。大分子的蛋白质、多肽、病毒粒子、细胞或小分子的氨基酸、核苷等定向阳极或阴极泳动；也称电泳。包括垂直电泳 (Shabelctrophoresis) 中 (带正电荷或带负电荷) 胶体粒子 (Colloid ion) 向负极或向正极定向移动。

电泳现象 (Electrophoresis) 早在18世纪即被发现。一般说来，带电质点 (胶体粒子或分子) 在电场中所驱动的方向，取决于该物质所带电荷的物理、化学性质，不同物质，由于带电性质不同，一定电场强度下的移动，其方向和速度是不同的。例如，氯化钠 (NaCl) 溶液在电场的作用下，则发现氯化钠溶液中氯离子 (Cl^-) 向正极移动；钠离子 (Na^+) 向负极移动，其结果在负极端获得氢氧化钠 (NaOH)；正极端获得氯气 (Cl_2)。这是一种介面电泳移动，也称电解 (Electrolysis)。生物活性物质在电场中，同样具有定向移动的道理，这种现象称之电泳现象。19世纪有的学者利用这一现象，采用琼脂凝胶作载体进行电泳，研究过白喉毒素的迁移率 (Move rate) 和无机离子的移动度 (Move degree)。直到1937年吉塞林 (Tiselius) 成功地研制了界面电泳仪，它是在一U型管内自由溶液中进行的，仪器复杂昂贵，曾应用于正常人血清蛋白的分离，获得白蛋白 (Albumin)、甲₁球蛋白 (α_1 -Globulin)、甲₂球蛋白

(α_2 -Globulin)、乙种球蛋白(β -Globulin)及丙种球蛋白(γ -Globulin)等五种成分,分离结果并予以命名,至今仍为人们所公认。随后, Wieland和K'anig等于1948年采用滤纸条为载体,成功地进行了纸上电泳。从那时起,电泳技术逐渐被人们所接受并予以重视,继而发展以滤纸、各种纤维素粉、淀粉凝胶、琼脂和琼脂糖凝胶、醋酸纤维素薄膜、聚丙烯酰胺凝胶、葡聚糖凝胶……为载体;有平槽、元槽、方槽、长槽、管型、板型等多种电泳装置;更新了连续和不连续缓冲系与载体离子浓度,采用高压电位分离多种氨基酸和核苷;利用琼脂凝胶的特性,将免疫反应与电扩散(物理化学分离与生物免疫学)技术相结合,成为多种适用的免疫电泳技术。选用增染试剂,如氨银染色、铬银染色及考马氏兰(Coomasse Beul)和氨银双染呈色方法,利用高效PAGE双向分离,能大大提高和促进生物样品着色与分辨能力,因此,可以与同位素放射自显影媲美。电泳分离和免疫反应相结合,不断朝着微量和超微量($10^0 \sim 10^{12}$ 克级)水平发展,因其灵敏、快速、简便、适用而获得迅速推广和应用。

随着各类生物学科的发展,电泳测试技术日趋完善和补充,将会日新月异的深入向前发展。近年来出现了高分辨率(Resolving Power)的电泳技术,尤以聚丙烯酰胺凝胶(Polyacrylamide Gel简称PAG)为载体,取得了显著效果。例如,将人血清中蛋白质由原来组份的5~7条区带,提高到20~30条(组份)区带;用不连续梯度凝胶电泳系统进行分离,可获得40种以上蛋白质区带;参入兼性离子载体(商品名Ampholine)pH梯度凝胶电泳分离,其区带分离的选择性还要高许多倍,并无拖尾现象,同时,可以测得该蛋白质的pH和等电点(Isoelectric point简称pI);结合

电免疫化学技术，可将全血清呈现40~50余条结合（沉淀）线；添加最终浓度为0.1~1.0%十二烷基硫酸钠（Sodium Dodecyl Sulfate简称SDS）去污剂，可测到不同物质的亚基分子量（Molecular Weight简称MW）和迁移率；若与等电聚焦pH梯度凝胶电泳技术结合高效双向电泳分离，其分辨能力则更加大大提高。如分离人血清蛋白组份，可获得200余种；在红细胞膜蛋白质结构分析中能获得250个以上蛋白质斑点；如果将大肠杆菌菌体蛋白质，经解链后可测得近千种蛋白质点。实验证明，酵母蛋白质经适当解析，能获得约5000个蛋白质斑点。采用核酸（DNA/RNA）序列分析，了解腺嘌呤（A）、鸟嘌呤（G）、胞嘧啶（C）、胸腺嘧啶（T）的排列，对于生命科学的深入研究，从分子水平来探讨遗传和生命的本质已引人注目。

各种电泳技术的发挥，实际上是对氨基酸质点和蛋白质电解行为的一种应用。因此，电泳技术不但应用于生物基础理论的实验研究和工农业生物的制备；而且大量适用于临床疾病诊断和疗效观察。如血红蛋白（Hb）分子遗传病的研究、优生生物的探索、氨基酸、肽链的鉴别、核酸的纯制与结构基因（Gene）定位分析、血脂分型、冠心病临床诊断、血清中蛋白质多聚体的分离、酶、激素的监测和提取……等。它既能将混合性生物活性物质予以分离；又能获得各种生物物质中的蛋白质、亚基的迁移变化。既可探明细胞游走时间和规律；又可以追索核酸定序中的变位情况等。由于电泳技术不断补充更新，极大地加速了电泳技术的应用范围，为生物学、细胞生物学、生物化学、分子生物学、分子遗传学、免疫化学、临床化学、病毒学、微生物学、动植物学、法医学及职业危害等学科的发展与研究，作出了重要贡献。

二、电泳技术的分类及其应用

(一) 电泳技术的分类

随着生物学各学科的迅速发展及相互渗透，电泳技术在不同程度上的更替换新已有各种不同的类别，现归纳分类如下：

1. 显微电泳：即在显微镜下观察胶体粒子或细胞（红细胞、白细胞、淋巴细胞、巨噬细胞、寄生物、精虫、肿瘤细胞……）的移动度，有称细胞电泳，也属于自由电泳。

2. 自由电泳：即悬浮在介质中的细胞和生物大分子，在有电场作用下自由定向移动。该类自由电泳又分两种：

(1) 界面自由电泳：即将生物大分子或细胞悬液置于介质的某一层上，电泳时该层上的生物大分子或细胞随着各自的速度选择移动，形成一层或多层不同介面，这种电泳常称为自由界面电泳。

(2) 非自由界面电泳：即悬浮于水性介质的各种细胞，在通电后，处于水介质中的细胞全部移动，不出现介面，常称分析型自由电泳。

3. 区域电泳（区带电泳）：也称支持电泳，即在不同电力条件，不同支持物（载体）上进行直接分离，鉴定生物物质，促使获得各自电荷差异的生物粒子或分子，形成各自

区域以带形停留在载体上。如，滤纸、淀粉、琼脂、纤维素粉以及聚丙烯酰胺凝胶……等。此类电泳技术分离技巧简便，应用十分广泛，具体内容将在后面详细介绍。

4. 免疫电泳：即抗原（Ag）与抗体（Ab）在比例合适的琼脂和琼脂糖载体中相结合的一种电免疫化学技术，当前出现的亲和电泳也属此类。能定性定量、方法简便、快速、微量，已作为各免疫室、微生物室、生化室、病毒室、分子生物室、遗传工程常规方法。

也有按支持物与没有支持物进行分类，见表1。

表1 电泳技术的分类

类别	名 称	形 式
不用支持物的电泳	(1) 吉塞林 (Tiselieas) 式电泳	属自由电泳
	(2) 显微电泳 (有称细胞电泳)	
	(3) 等电聚焦电泳	
	(4) 等速电泳	
	(5) 密度梯度电泳	
有支持载体的电泳	(1) 纸电泳	常压高压
	(2) 醋酸纤维素薄膜电泳	常压免疫
	(3) 薄层电泳	
	(4) 淀粉凝胶电泳	
	(5) 琼脂和琼脂凝胶电泳	常压免疫
	(6) 聚丙烯酰胺凝胶电泳	柱板式电泳

还有按分子颗粒大小进行分类：

(1) 小分子 (约在5~20 Å) 物质的电泳，如氨基酸、

核苷酸、生物碱及有机酸等。

(2) 大分子 (约在 $100\sim 1000\text{\AA}$) 物质的电泳, 如蛋白质、核酸等。

(3) 细胞 (约在 $10000\sim 100000\text{\AA}$) 电泳, 如细菌、病毒、血小板及细胞 (红细胞、白细胞、淋巴细胞、巨噬细胞、精虫、癌细胞) 等。

还有按pH系统、连续与不连续离子浓度电泳系统进行分类等。

(二) 电泳技术的应用与研究

电泳技术是当前国内外生物学、分子生物学、生物工程中不可缺少的重要分离、分析手段之一, 用途十分广泛。它适用于一切带净电荷离子或分子的分离, 包括无机离子, 氨基酸和核苷等有机分子, 以及多肽、蛋白质和核酸等复杂的生物高分子物质的分离与分析, 也适用于各生物活性物质的鉴定与制备。它已用于基础理论、工业、农业、医药卫生、法政医学及国防医学等学科的科学研究的科学研究, 在实践中有着广泛的应用前景。

电泳技术有常压 (中压) 与高压电泳系统。高压电位一般多用于小分子氨基酸的分离, 电泳时间短、扩散不严重、分离效果好、分辨率高; 常压电泳有多种形式和多种用途。一般应用较普遍的有: 醋酸纤维素薄膜电泳、淀粉凝胶电泳、琼脂和琼脂糖凝胶以及聚丙烯酰胺凝胶电泳。醋酸纤维素薄膜电泳, 分离速度快、用量少、无拖尾、清晰度高。它多用于血清蛋白、血清糖蛋白、血清脂蛋白的分离与测定,

特别适用于血红蛋白的分离、分型与鉴定,结合免疫学技术的免疫电泳,更有其独到之处;淀粉凝胶电泳分离纯度高、分辨率亦高,容易切取,适用量大、易于制备;琼脂和琼脂糖电泳适用于各种血清、组织中的蛋白质的分离,特别适用于各种酶类及酶谱分析。临床上用得最多的是乳酸脱氢酶(LDH)同工酶的分离;放射免疫电泳技术灵敏高度、特异性强、切割方便。自显影技术能增强敏感度,临床上多作为甲胎蛋白(AFP)测定、乙型肝炎表面抗原(HBsAg)的检查以及核酸分析与研究;聚丙烯酰胺凝胶电泳是当今电泳技术的进一步发展,可用于许多生物样品的分离、鉴定以及特殊样品的纯化,特别适用于各种分子生物样品,如核酸(DNA/RNA)的实验研究,更适宜样品量少的酶类分析等。能定性、定量、对比分析,重现性好、分离清晰。结合电免疫化学技术,进行高效双向免疫电泳,渗进SDS裂解剂,可测定生物样品的亚基结构、分子量和迁移度,增进兼性离子载体,可测出生物物质的等电点,提高被测物的分辨率。更新缓冲系统和不连续凝胶系统,pH梯度离子浓度的应用,将会进一步扩展电泳技术的适用范围。

近年来电泳技术又有新的发展。美国Conlors,Carle和Olson发明了脉冲梯度电场凝胶电泳(Pulse-Field-Gradient Gel Electrophoresis简称PEGGE)和相互垂直交替电场凝胶电泳(Orthogonal-Field-Alternation Gel Electrophoresis,简称OFAGE),都是用在染色体DNA大分子的分离新技术。前者主要根据染色体DNA大分子测琼脂糖凝胶中的速率,途径不一,把电泳分为二个方向,并形成电场梯度,以脉冲形式相互间隔地进行二个方向的同时电泳,以达到染色体DNA分子在凝胶中不间断地变换方向,