



普通高等教育“十三五”规划教材

XIANDAI SHENGWUXUE YIQI FENXI

现代生物学 仪器分析

韩宏岩 许维岸 主编



科学出版社

现代生物学仪器分析

韩宏岩 许维岸 主编

科学出版社

北京

内 容 简 介

现代生物学仪器分析是一个崭新而年轻的领域,它是以为化学和物理信息学为基础,交叉融合了生物学的一门综合性学科。本书重点介绍在生物科学中应用非常广泛的仪器分析原理和技术方法,全书共13章,内容包括:生物科学领域常用的光谱技术——紫外光谱、红外光谱、荧光光谱、质谱、圆二色光谱;现代生物样品分离和制备技术——气相色谱、液相色谱和毛细管电泳等;生物材料中元素分析技术——原子发射光谱和原子吸收光谱等;生物电子显微技术——激光扫描共聚焦、透射电子显微技术和扫描电子显微技术、电镜三维重构;与生物大分子相互作用的分析技术——等温微量热技术;常用细胞分析和分选技术——流式细胞仪。

本书可作为综合性大学、医学院校和农林院校生物及相关专业本科生教材,也可作为相关专业研究生的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

现代生物学仪器分析 / 韩宏岩 许维岸主编. —北京:科学出版社,2018.1

ISBN 978-7-03-054764-4

I. ①现… II. ①韩…②许… III. ①生物学—实验室仪器—仪器分析 IV. ①Q-337

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2017)第 246686 号

责任编辑:陈 露 谭宏宇

责任印制:谭宏宇 / 封面设计:殷 靓

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

南京展望文化发展有限公司排版

苏州越洋印刷有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2018年1月第一版 开本:787×1092 1/16

2018年1月第一次印刷 印张:10 1/2

字数:250 000

定价:38.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

《现代生物学仪器分析》

编 委 会

主 编 韩宏岩 许维岸

副主编 聂永心 汪成富

编 者 (按姓氏笔画排序)

戈志强 许维岸 汪成富 周梦怡

聂永心 顾福根 韩宏岩 蒋 滢

前 言

现代生物学仪器分析是一个崭新而年轻的领域,它是化学和物理信息学为基础,交叉融合了生物学的一门综合性学科。近年来,随着现代化科学仪器的迅速发展和不断完善,尤其是生物学仪器在生命科学研究中的普及,生物学仪器分析技术成为从事生命科学领域研究必不可少的手段。本书从生物学的角度,兼顾部分生物科学实验室和多年课堂教学实际情况,简明扼要地讲授生物科学研究领域常用仪器的测定原理、基本结构及用途。全书共13章,内容包括:①生物样品分离鉴定技术,包括离心技术、等电聚焦电泳和双向电泳技术、气相色谱、液相色谱分离技术、生物质谱;②生物科学领域常用的光谱学仪器,包括紫外-可见光谱、红外光谱、荧光光谱、圆二色光谱;③生物材料中元素分析技术,包括原子发射光谱和原子吸收光谱等。本书在编写中,教材内容以与生命科学密切相关的仪器分析为主线,避免与生物化学实验、细胞生物学实验课程内容的重复。本书由浅入深,力求避免烦琐的数学和物理推导,注重对相关仪器基本原理和基本构造的介绍,同课程教学紧密结合,非常适合综合性院校生命科学相关专业本科生使用,也可作为医学、农林及师范类本科生、硕士研究生和进修教师的参考书,并可供相关研究领域人员参考使用。

本教材出版由苏州大学教材培育项目立项资助,感谢苏州大学基础医学与生物科学学院的大力支持,感谢山东农业大学聂永心、苏州大学蒋滢教授在本书编写过程中提供了大量资料和宝贵意见。由于编者水平有限,同时编写时间较为仓促,因此教材中难免存在不妥之处,希望广大读者批评指正。

编 者

二零一七年九月

目 录

前 言

第一章 绪论	1
第一节 仪器分析概述	1
第二节 现代生物学仪器分析	3
第二章 电泳技术	6
第一节 等电聚焦电泳	6
第二节 等电聚焦电泳条件的选择	9
第三节 双向电泳	14
第三章 离心技术	20
第一节 基本原理	20
第二节 离心机的种类和基本结构	22
第三节 离心技术	24
第四节 离心技术在生物学研究中的应用	28
第四章 光学分析法导论	30
第一节 基本理论	30
第二节 光学分析法的分类	32
第三节 光谱分析仪器的基本构造	33
第五章 紫外-可见吸收光谱分析	37
第一节 基本原理	37
第二节 紫外-可见分光光度计	41
第三节 紫外-可见分光光度计应用	46
第六章 荧光光谱分析	49
第一节 基本原理	49
第二节 荧光光谱仪	54
第三节 荧光分析法在生物学中的应用	55
第七章 红外吸收光谱法	58
第一节 红外吸收光谱基本原理	59

第二节	红外光谱仪的基本构成	67
第三节	试样处理与制备	71
第四节	红外光谱图的分析	72
第五节	红外光谱的应用	74
第八章	原子光谱法分析	77
第一节	原子吸收光谱法基本原理	77
第二节	原子吸收光谱仪的结构组成	79
第三节	原子吸收光谱法定量分析方法	82
第四节	原子发射光谱法	83
第五节	生物样品的前处理	89
第六节	原子发射光谱法的应用	90
第九章	色谱分析法导论	91
第一节	概述	91
第二节	色谱流出曲线及常用术语	94
第三节	色谱分析的基本理论	96
第四节	色谱定性和定量的方法	100
第十章	气相色谱仪	105
第一节	气相色谱仪的结构	105
第二节	气相色谱分离条件的选择	110
第三节	气相色谱法的应用	112
第十一章	高效液相色谱分离技术	115
第一节	高效液相色谱仪的结构	115
第二节	高效液相色谱分离原理	122
第三节	高效液相色谱的固定相和流动相	124
第四节	高效液相色谱法的应用	130
第十二章	质谱分析法	133
第一节	质谱仪的工作原理及性能指标	133
第二节	质谱仪的基本结构	135
第三节	质谱离子峰	144
第四节	生物质谱技术及其应用	148
第十三章	圆二色光谱	153
第一节	基本原理	153
第二节	圆二色光谱仪的基本构造	155
第三节	圆二色光谱在蛋白质结构研究中的应用	156

第一章 绪 论

科学上的发现和技术上的发明是从对事物的观察开始的,对事物的精细观察就要借助于科学仪器,特别是自然科学和工业生产领域。科学仪器是开展科学研究和实现发明创造的必要手段,是认识世界的工具。科学发展史一再证明,许多重要科学分支的确立和发展归功于重要的科学仪器装置的研制成功。极谱仪的发明产生了极谱学,色谱仪的发明产生了色谱学,光谱仪的发明产生了光谱学,质谱仪的发明产生了质谱学,而扫描隧道显微镜的发明对纳米科技的兴起和发展起到决定性作用。

随着现代科学技术的不断进步以及交叉边缘新兴学科的不断涌现,相关新的生物分析方法已经成为非常热门的研究课题。生命科学领域的发展与仪器分析的发展息息相关。现代生物学仪器分析技术是一门具有前沿性和发展潜力的交叉学科,涉及电子学、物理学、计算机科学、化学、激光技术等多门学科与技术领域。随着现今科学技术的飞速发展,新的分析仪器和分析方法不断地被创造出来。这些仪器在生物科学、医学、环境科学、药学、材料科学、物理学等领域得到广泛的应用,现代生物学仪器分析技术已成为学科相互渗透的重要手段之一。

第一节 仪器分析概述

一、仪器分析的任务

仪器分析(instrumental analysis)是以物质的物理或化学性质为基础,探求这些性质在分析过程中所产生的信号与物质结构、组成的内在关系和规律,进而对其进行定性、定量、结构和形态分析的一类分析方法。由于这类方法常用到各种比较复杂、精密或特殊的仪器设备,故称为仪器分析。

仪器分析是20世纪40年代发展起来的一类分析方法,是化学学科的重要分支,通过使用仪器测定物质的一些物理和化学特性,获得物质的组成、含量、结构及形态等相关信息,通过使用一些高效的仪器分离分析技术如高效色谱仪,可以取代传统的层析对复杂混合物的分离,可直接进行定性、定量分析。这些分离、分析、检测方法,构成了仪器分析方法。仪器分析是生物科学、食品科学、中药学、药学、药物制剂、环境科学等专业的专业基础课之一。

二、仪器分析的特点

与经典的化学分析相比,仪器分析具有如下特点。

(1) 灵敏度高: 仪器分析的最低检出量大大降低,由化学分析的 10^{-6} g 降至 10^{-12} g, 甚至更低,适用于微量、痕量和超痕量成分的分析。例如,原子吸收分光光度法测定某些元素的绝对灵敏度可达 10^{-14} g,电子光谱甚至可达 10^{-18} g。

(2) 分析速度快: 仪器分析操作简便、快速、重现性好,易于实现自动化、信息化和在线检测,适于批量样品的分析。许多仪器配有自动进样装置和微计算机控制系统,能在较短时间内分析多个样品,满足生产控制的需要,如发射光谱分析法在 1 min 内可同时测定水中 48 种元素。

(3) 试样用量少: 仪器分析的样品用量由化学分析的毫升、毫克级降低至微升、微克级,甚至更低,适合于微量、半微量乃至超微量分析。

(4) 可进行无损分析: 很多仪器分析方法可在物质的原始状态下使用,实现试样非破坏性分析及表面、微区、形态等分析,测定后试样可回收,适合于活体分析和考古、文物等特殊领域的分析。

(5) 选择性高: 很多仪器分析方法可通过选择或调整测定条件,使共存的组分测定时相互间不产生干扰,尤其适合于中药等复杂体系的分析。实现复杂混合物的成分分离、分析和结构测定。

(6) 用途广泛: 仪器分析除进行定性、定量分析外,还能进行结构分析、物相分析、微区分析、价态分析及测定分子量、稳定常数等操作,能适应各种分析的要求。

(7) 分析成本高: 仪器分析通常需要结构复杂、价格昂贵的仪器设备,分析成本一般比化学分析高,且对环境、维护和操作者的要求较高。

三、仪器分析方法的分类

仪器分析的方法根据测量物质的性质进行分类。通常包括: 电化学分析法、光学分析法、色谱分析法和和其他仪器分析法。

1. 电化学分析法

电化学分析法(electrochemical analysis)是根据物质在溶液中的电化学性质建立的一类分析方法。以电信号作为计量关系的一类方法,主要包括: 电导分析法、电位分析法、库仑分析法、伏安分析法、极谱分析法等。

2. 光学分析法

光学分析法(optical analysis)是根据物质发射的电磁辐射或电磁辐射与物质的相互作用而建立起来的一类分析化学方法,可分为光谱法和非光谱法。光谱法是基于物质与

辐射能作用时,测量由物质内部发生量子化的能级之间的跃迁而产生的发射、吸收或散射辐射的波长和强度进行分析的方法。非光谱法是基于物质与辐射相互作用时,测量辐射的某些性质,如折射、散射、干涉、衍射、偏振等变化的分析方法。

光谱法可分为原子光谱法和分子光谱法。原子光谱法是由原子外层或内层电子能级的变化产生的,它的表现形式为线光谱。属于这类分析方法的有原子发射光谱法(AES)、原子吸收光谱法(AAS)、原子荧光光谱法(AFS)、X射线荧光光谱法(XFS)等。分子光谱法是由分子中电子能级、振动和转动能级的变化产生的,表现形式为带状光谱。属于这类分析方法的有紫外-可见分光光度法(UV-Vis)、红外光谱法(IR)、分子荧光光谱法(MFS)和分子磷光光谱法(MPS)等。

3. 色谱分析法

色谱分析法(chromatographic analysis)是利用混合物中的各组分在互不相溶的两相(固定相与流动相)中的吸附、分配、离子交换等性能方面的差异进行分离分析测定的一类分析方法。色谱分析法主要包括气相色谱法(GC)、高效液相色谱法(HPLC)、薄层色谱法(TLC)和离子色谱法(IC)等。此外,还有新近发展起来的超临界流体色谱(SFC)和毛细管电泳技术(CE),也属于色谱分析的范畴。

4. 其他分析法

除以上三类分析方法外,还有利用热学、力学、声学、动力学等性质进行测定的仪器分析法。其中最主要的有以下三种。

(1) 质谱法(MS):根据物质带电粒子的质荷比在电磁场作用下进行定性、定量和结构分析的方法。

(2) 热分析法:依据物质的质量、体积、热导、反应热等性质与温度之间的动态关系来进行分析的方法。

(3) 放射分析法:依据物质的放射性辐射来进行分析的方法如同位素稀释法、中子活化分析法等。

第二节 现代生物学仪器分析

一、现代生物学仪器分析概述

生命科学的发展,需要对多肽、蛋白质、核酸等生物大分子进行观察分析,对生物药物进行定性定量分析,对超微量生物活性物质(如单个细胞内神经传递物质)进行分析以及对生物活体等进行观察和分析。我国在发展高技术战略的规划中,也把生物技术列为重点领域。生命科学及生物工程的发展向仪器分析提出了新的挑战。当前电泳技术、

离心技术、色谱、质谱、磁共振、荧光、化学发光和免疫分析以及化学传感器、生物传感器、化学修饰电极和生物电分析化学等为主体的各种分析手段,广泛应用于生命体与有机组织及分子和细胞水平上,以研究生命过程中某些大分子及生物活性物质的化学和生物本质。现代生物学仪器分析是在仪器分析基础上产生的一个崭新而年轻的领域,它是以化学和物理信息学为基础,交叉融合了生物学的一门综合性学科。

二、生物学仪器分析的应用成果

纵观科学研究的重大历史突破,有许多重大研究成果是科学家因应用仪器分析研究生物科学现象而获得的。Kurt Wuthrich 教授因发现应用磁共振技术测定溶液中生物大分子三维结构的新方法而获得了 2002 年诺贝尔化学奖。磁共振可提供分子空间立体结构的信息,目前已经发展成为分析分子结构和研究化学动力学的重要手段,在有机化学、生物化学、药物化学等领域得到了广泛的应用,这反映出了磁共振技术的迅猛发展及其对前沿研究工作的巨大贡献。日本科学家田中耕一和美国科学家 John Fenn 共同开发出生物大分子的质谱分析技术,发展了基质辅助激光解析电离法,为发展生物大分子的鉴定与结构分析方法做出了重大贡献,获得了 2002 年诺贝尔化学奖。瑞典皇家科学院称赞他们的研究工作“提升了人类对生命进程的认识”。傅里叶变换红外光谱(FTIR)可提供有关分子结构的多种信息,辅以二阶导数、去卷积、曲线拟合等解析方法可以研究蛋白质二级结构的变化规律。近几年,应用 FTIR 从分子水平的角度研究癌症是生物医学领域的热门课题。癌组织和正常组织的谱图表明癌组织样品与正常样品的红外光谱存在明显差异,通过谱图解析可直接或间接地阐明引起谱图变化的主要原因,以及细胞癌变的可能机制和病程进展。在对生物大分子的分析中,生物质谱与其他分析方法相比,准确性和灵敏度高,速度快,易于大规模和高通量操作,因此在基因组学和蛋白质组学研究中扮演着越来越重要的角色。例如,在蛋白分析技术中生物质谱以其不可比拟的优越性能,已经成为蛋白质组学研究中必不可少的技术平台,在蛋白质鉴定、序列分析、定量、翻译后加工(修饰)及蛋白质相互作用等方面得到了广泛的应用,其中,用于蛋白序列分析的生物质谱鉴定方法有基质辅助激光解吸-飞行时间-肽质量指纹谱(MALDI-TOF-PMF)、串联质谱的肽序列标签以及肽段的从头测序。

三、现代生物学仪器分析的发展趋势

现代生物学仪器分析技术正向智能化方向发展,发展趋势主要表现为:基于微电子技术和计算机技术的应用实现分析仪器的自动化,通过计算机控制器和数字模型进行数据采集、运算、统计、处理,实现了分析仪器数字图像处理能力的发展。分析仪器的联用技术向测试速度超高速化、分析试样超微量化、分析仪器超小型化的方向发展。

重点研究方向包括:一是高通量分析,即在单位时间内可分析测试大量的样品;二是极端条件分析,其中单分子单细胞分析与操纵为目前热门的课题;三是在线、实时、现场或

原位分析,即从样品采集到数据输出,实现快速的或一条龙的分析;四是联用技术,即将两种或两种以上分析技术连接,互相补充,从而完成更复杂的分析任务。联用技术及联用仪器的组合方式,特别是二联甚至是三联系统的出现,已成为现代分析仪器发展的重要方向;五是阵列技术,如果把联用分析技术看成计算机中的串行方法,那么阵列技术就等同于计算机中的并行运算方法。阵列方法是大幅度提高分析速度或样品批量处理量的最佳方案。一旦将并行阵列思路与集成和芯片制作技术完美结合,仪器分析技术就将向新的领域进发。

现代生物学仪器分析是在细胞和分子水平研究生命过程、生理、病理变化和药物代谢、基因改造的有力工具,是生物大分子多维结构和功能研究、疾病预防与诊断、药品与食品安全保障的常用技术。

第二章 电泳技术

利用带电粒子在电场中的移动速度不同而使混合物分离的技术称为电泳技术。电泳技术是一种先进的分离检测手段,与其他先进技术相配合,能创造出惊人的成果,可使人们用较少代价获得最优效益。因此电泳技术正越来越多地为人们所重视,广泛应用于各个领域。本章在醋酸纤维素薄膜电泳和以淀粉胶、琼脂或琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶等作为支持介质的凝胶电泳技术的基础上介绍等电聚焦电泳和双向电泳。

第一节 等电聚焦电泳

等电聚焦电泳(isoelectric focusing, IEF)是20世纪60年代由瑞典科学家 H. Rilbe 和 O. Vesterberg 建立的一种高分辨率的蛋白质分离和分析技术。它的分离原理是利用蛋白质分子或其他两性电解质分子具有不同的等电点,从而在一个稳定、连续、线性的 pH 梯度中得到分离。近年来,等电聚焦电泳技术的分辨率有了很大提高,可以分辨 pI(等电点)只差 0.001 的生物大分子,这是等电聚焦最突出的优点,且重复性好,样品容量大,只需要一般的电泳设备,操作更加简便快速,这些优点使等电聚焦技术得到广泛应用。

一、等电聚焦电泳的基本原理

由于各种蛋白质的氨基酸组成不同,因此有不同的等电点。当 $\text{pH} > \text{pI}$ 时,蛋白质带负电荷,在电场的作用下向正极移动;当 $\text{pH} < \text{pI}$ 时,蛋白质带正电荷,在电场的作用下向负极移动;当 $\text{pH} = \text{pI}$ 时,蛋白质所带净电荷为 0,在电场的作用下不发生移动。因此可以利用蛋白质不同的等电点对其进行分析和分离。

等电聚焦电泳技术就是在电泳支持介质中加入载体两性电解质(carrier ampholytes),通以直流电后在正负极之间形成稳定、连续和线性的 pH 梯度,正极附近是低 pH 区,负极附近是高 pH 区。蛋白质在 pH 梯度凝胶中,当大于或小于其等电点时仍带电荷,因此,蛋白质在 pH 梯度凝胶中受电场力作用能进行电迁移,但在 pH 梯度凝胶中,当 pH 等于蛋白质等电点时,蛋白质就失去电荷而停止运动。蛋白质在凝胶中迁移的距离取决于其本身的等电点的大小,当蛋白质分子一旦到达 pH 等于其等电点的位置,分子所带净电荷为 0,就不能再迁移。如果它向等电点两侧扩散,净电荷就不再为 0,又会被阴极或阳极吸引回来,直至回到净电荷为 0 的位置,因此蛋白质在与其本身 pI 相等的 pH 位置被聚焦成窄而稳定的区带(图 2-1)。这种效应称为“聚焦效应”,保证了蛋白质分离的高分辨率,

是等电聚焦最为突出的优点。

等电聚焦电泳是根据蛋白质等电点不同而将不同蛋白质进行分离的技术,也可以根据蛋白条带在 pH 梯度中形成的位置测定未知蛋白质的等电点。

二、电泳胶中 pH 梯度的形成

在等电聚焦电泳中产生 pH 梯度的方式有两种:一种是人工 pH 梯度,即用两种具有不同 pH 的缓冲液相互扩散,在混合区形成 pH 梯度,由于缓冲液离子的电迁移和扩散使 pH 梯度不稳定,一般用于制备柱电泳;另一种是自然 pH 梯度,即在凝胶中加入载体两性电解质,在电场作用下形成连续的 pH 梯度,凝胶的防对流扩散作用使 pH 梯度保持稳定。两性电解质是同时带有正、负电荷基团的化合物。特殊的两性电解质可以实现 pH 梯度,稳定的 pH 梯度是等电聚焦技术的关键。

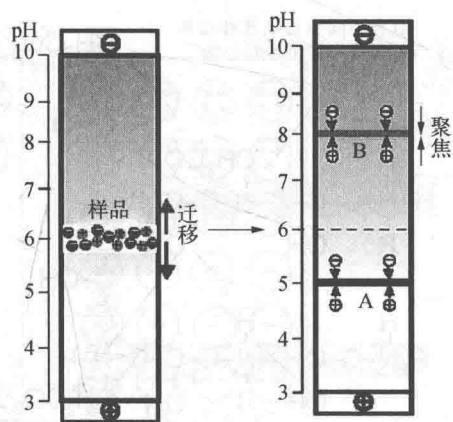


图 2-1 等电聚焦的“聚焦效应”

1. 载体两性电解质必须具备的条件

载体两性电解质为略带黄色的水溶液,质量分数一般为 40%,于 4℃ 保存。有不同 pH 范围的两性电解质商品可供选择使用。

作为理想的载体两性电解质,应该具备如下必要的性质。

1) 载体两性电解质应溶解性能好,在 pI 处缓冲能力强,形成稳定的 pH 梯度,不致被蛋白质或其他两性电解质改变 pH 梯度。

2) 导电性能良好,具有相同的电导系数,在等电聚焦过程中保持均匀的电场,可以适当加高电压,从而缩短电泳时间,提高分辨率,避免由两性电解质质量差而造成的凝胶局部过热,严重时造成烧胶。

3) 载体两性电解质应化学性质稳定,无毒、无生物学效应,不影响蛋白质活性。

4) 载体两性电解质紫外吸收低,与蛋白质可逆结合,相对分子质量小,易从聚焦的蛋白条带中除去,有利于蛋白质的检测和分析。

从载体两性电解质的结构看:它既带有酸性基团($-\text{NH}_3^+$),又带有碱性基团($-\text{COO}^-$),即它既可接受质子,又可释放质子。

2. 等电聚焦中使用的载体两性电解质

等电聚焦中使用的载体两性电解质是含有正负电基团的一类异构体与同系物的混合物。其化学本质是多羧基、多氨基脂肪族化合物。载体两性电解质是由具有几个 pH 很相近的多乙烯多胺(如五乙烯六胺)与不饱和酸(如丙烯酸)发生加合反应而合成的。调节



图 2-2 等电聚焦的载体两性电解质

胺和酸的比例可以合成多异构物和同系物,以保证很多具有不同而又互相接近的 pK 值和 pI 值,从而得到平滑的 pH 梯度,如图 2-2 所示。

载体两性电解质是一系列脂肪族多氨基和多羧基类的混合物,即是一系列的异构物和同系物,相对分子质量在 300~1 000,各组分的等电点 (pI) 既有差异又相接近, pI 的范围在 2.5~11。对两性电解质的要求是缓冲力强,具有良好的导电性,相对分子质量小,不干扰被分析的样品等。合成载体两性电解质的原料是丙烯酸和多乙烯多胺。目前常用的载体两性电解质的商品有:

Ampholine(LKB 公司)、Pharmlyte(Pharmacia 公司)、Serralyty(Serva 公司)。在制备聚丙烯酰胺凝胶时,将其混溶其中,在外电场作用下,自然形成 pH 梯度。

两性电解质在溶液中的行为可以从两方面看:一方面,溶液的 pH 决定它带电荷的性质,具有不同 pI 的两性电解质在同一环境中带有不同性质和数量的电荷,如溶液 $pH=7$ 时,对 $pI=9$ 的两性电解质来说,是处于酸性环境,带正电荷;但对 $pI=3$ 的两性电解质来说,却是处于碱性环境,故而带负电荷。另一方面,溶液中的两性电解质又破坏了水的解离平衡,使溶液的 pH 有所改变。当某一两性电解质的 pI 较低,即释放质子(H^+)能力较强,使溶液 pH 下降时,这类两性电解质称为酸性两性电解质;而 pI 高的两性电解质可使溶液 pH 上升,称为碱性两性电解质。所以,在溶液中的两性电解质一方面受溶液 pH 的影响,决定其带电的性质;另一方面它又影响周围环境,使溶液 pH 有所改变。

3. pH 梯度形成的原理

在不加电场时,载体两性电解质溶液的 pH 大约是该溶液 pH 范围的平均值。当加入电场后,载体两性电解质根据各自的 pI 值进行分布,低 pI 的分子向阳极移动,高 pI 的分子向阴极移动,直至载体各自的等电点而停止运动,从而形成 pH 梯度。

相邻两种分子的两性载体电解质形成的不同 pH 的等电点层,每一层由于它们的高缓冲能力给予环境一个 pH 。两层之间不能形成纯水层,中间部分相互粘连,从而形成平稳的 pH 梯度,如图 2-3 所示。

电泳时凝胶板正极的电极液是磷酸,负极是氢氧化钠。正极是酸性环境,载体两性电解质都带正电荷,但由于载体 pI 的不同,其所带正电荷数量就不同,电泳时向负极泳动的速度也就因此不同。同理,负极是碱性环境,载体两性电解质带有数量不等的负电荷,以不同速度向正极泳动。根据两性电解质的特性,在泳动过程中又不断地与溶液交换质子,改变了溶液的 pH 。当达到平衡时,即得失质子相等,不再出现质子的交换,载体两性电解质到达等电点并分别处于自己的 pI 区域, pI 即是指溶液的 pH ,所以,溶液也因此呈现不

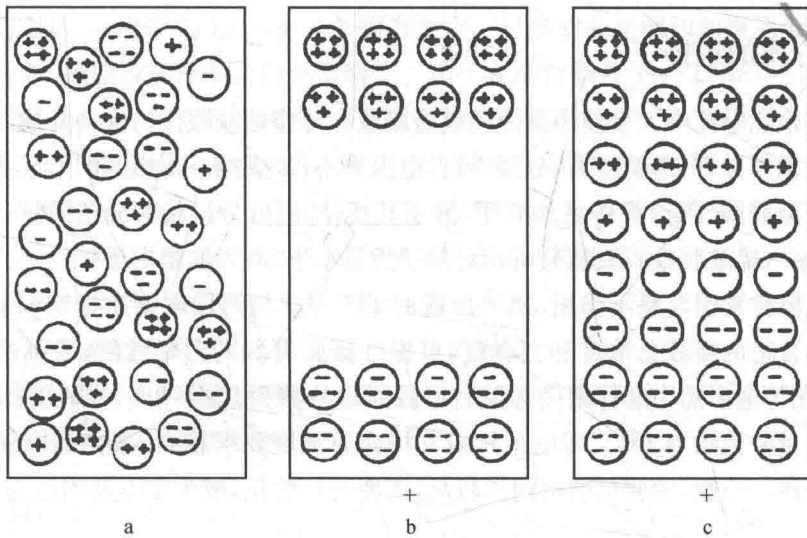


图 2-3 载体两性电解质形成 pH 梯度的机制

a. 通电前的原始状态; b. 通电后 pH 梯度正在形成过程中; c. 已经形成连续 pH 梯度

同的 pH, 随载体两性电解质的 pI 梯度而形成 pH 梯度。由于凝胶的防对流扩散作用, 使 pH 梯度保持稳定不变。不同 pH 的两性电解质的含量与 pI 的分布越均匀, 则 pH 梯度的线性就越好。

pH 梯度的形成有一个时间过程, 加入电场后, pH 梯度首先在电极两端开始形成, 然后移向中间。例如, 在 12 cm 的凝胶距离中, 使用 30 W 的功率, Ampholine 在 1 h 后, pH 梯度才能完全形成, 2 h 后变化很小。

4. TEMED 对 pH 梯度的影响

载体两性电解质本身可以作为凝胶聚合的促进剂, 因此在凝胶制备中可以不加 TEMED(四甲基乙二胺); 如果加入 TEMED, 可加速 pH 3~10、中性和碱性范围载体两性电解质凝胶的聚合, 对酸性范围无加速作用。TEMED 本身为碱性物质, 在 pH 大于 4.5 时能扩展凝胶碱性端 pH 梯度, 其扩展幅度与 TEMED 加入量有关, TEMED 可使聚丙烯酰胺凝胶 pH 梯度碱性侧扩展 1~2 pH 单位。由于 CO_2 的影响, 碱性侧的 pH 往往达不到指定的 pH, 因此 TEMED 的扩展具有实际意义。

第二节 等电聚焦电泳条件的选择

早期等电聚焦电泳是垂直板式, 后来发展为水平板式, 防止由电极液的电渗作用而引起 pH 梯度的漂变。近几年发展起来的超薄层水平板式等电聚焦电泳具有散热效果好、节省试剂、加样数量多等优点, 而且电泳后凝胶的固定、染色和干燥很方便、迅速, 利于比

较不同样品的电泳结果。

一、支持介质的选择

在等电聚焦电泳中大多使用聚丙烯酰胺凝胶和琼脂糖凝胶作为支持介质。聚丙烯酰胺凝胶化学稳定性好,透明度高,分辨率高,电内渗小,不影响 pH 梯度的形成和蛋白质的分离。琼脂糖凝胶无毒,操作更加简便,由于其孔径大,可分析相对分子质量达 200 万的大分子,而聚丙烯酰胺凝胶只能分析相对分子质量小于 30 万的蛋白质。

凝胶载体常常引起电渗作用,使得形成的 pH 梯度与两性电解质标明的 pH 范围有差别。选择合适的凝胶总浓度和交联度,可保证凝胶有好的力学性能,有弹性和高透明度。一般,在等电聚焦中选择聚丙烯酰胺凝胶质量分数为 5%~8%,交联度约为 3%;琼脂糖凝胶质量分数约为 1%。等电聚焦对支持介质纯度要求较高,减少电内渗,pH 梯度不会产生漂移。一般,琼脂糖的电内渗较高,需要进行纯化,减少带电基团后方可使用。

二、pH 梯度范围的选择

载体两性电解质的质量是高分辨率等电聚焦的关键因素,只有选择优质的载体两性电解质,才能得到连续稳定的 pH 梯度,使蛋白质很好地聚焦。根据被分析蛋白质的等电点选择合适的 pH 梯度范围,凝胶的 pH 梯度范围是由所使用的载体两性电解质的 pH 范围决定的。宽范围的 pH 梯度适应范围广,对于具有不同 pI 的蛋白质混合样品或未知蛋白质样品尤其适用;窄范围的 pH 梯度用于已知 pI 的蛋白质样品,可以提供高分辨率,增大加样量,更有利于制备。在测定未知蛋白时,可先采用 pH 3~10 的载体,经初步确定待测蛋白质样品的 pI 位置后改用较窄的 pH 梯度范围以提高分辨率。有时实验为保证 pH 梯度的线性或对梯度的特殊要求,将两种或两种以上 pH 范围的载体两性电解质混合,提高 pH 重叠区域的分辨率和加样量。

在使用 pH 7 以上或以下范围时,因缺少中性载体,在聚焦过程中载体与电极之间 pH=7 的部位就会形成纯水区带,纯水的电导极低,必须避免此现象。凡使用离开中性 pH 范围的载体时应加入相当于 0.1 载体量的 pH 6~8 或 pH 3~10 的载体。在 pH 低于 3 时,可加有机酸(如一氯醋酸、二氯醋酸、甲酸、乙酸),pH 低于 10 时,可补加胺使 pH 增加到 11。

pH 梯度的稳定性决定于载体两性电解质的质量、电泳中的电参数,也与凝胶系统的成分有关。例如,在凝胶中添加 10%~15% 的甘油、蔗糖或山梨糖醇,以增加凝胶的机械稳定性和渗透能力,减少电泳时凝胶的渗出液,增加凝胶与玻璃的黏着度,减少电内渗,以提高 pH 梯度的稳定性。

三、支持介质丙烯酰胺的聚合

丙烯酰胺凝胶的聚合是等电聚焦中的第一个关键步骤,聚合方式多采用过硫酸铵