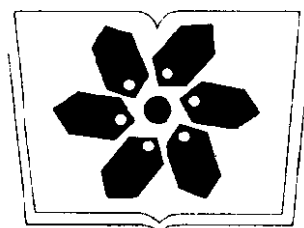


蛋白质电泳实验技术

郭尧君 编著

科学出版社



中国科学院科学出版基金资助出版

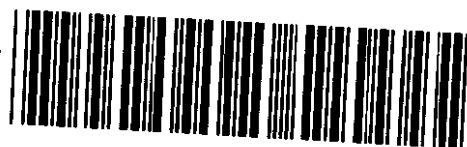
蛋白质电泳实验技术

郭尧君 编著



科学出版社

1999



A0293051

内 容 简 介

本书从介绍凝胶电泳的原理、电泳实验技术的发展简史和各种现代的电泳设备入手,重点阐述了8种蛋白质电泳技术的原理、方法、实验考虑和具体应用。本书是作者多年研究成果的总结,其指导性、实用性、可操作性很强,是一本非常好的电泳工具书。

本书适用于实验室工作人员及相关领域的大专院校师生。

图书在版编目(CIP)数据

蛋白质电泳实验技术/郭尧君编著.-北京:科学出版社,1999.2
ISBN 7-03-006899-8

I. 蛋… II. 郭… III. 蛋白质-电泳-实验 IV. Q51-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (98) 第 20503 号

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街16号
邮政编码:100717

科 地 亚 印 刷 厂 印 刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1999年2月第 一 版 开本: 850×1168 1/32

1999年2月第一次印刷 印张: 11 3/8

印数: 1—2 600 字数: 292 000

定价: 23.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈新欣〉)

序

在这些年来的准备和酝酿之后，在这中秋佳节之夜，我决心开始再度圆我的梦——继《荧光实验技术》、《分光光度实验技术》等十本著作后，奉献我这十五年来在电泳技术中的各种成功与失败的小结。在将近 200 次的电泳讲座中，同行们给予了我那么多的支持、鼓励甚至是赖以生存的力量。希望这本小册子能作为对大家的答谢，也作为对这世界上最爱我的妈妈的回报，还作为给女儿的礼物，希望这些实践对她有用。

在我开始闯入电泳领域后，我崇拜的居里夫人的名言一直伴随着我，那就是“科学的探讨研究其本身就含有至美，其本身给人的愉快就是酬报，所以我在我的工作里寻得了快乐。”是的，三十年来，我在这五彩缤纷的光谱世界和你追我赶的电泳世界里寻得了快乐和生活的力量，我找到了我的“等电点”位置，吸收着和发射着我自己的光彩。

郭尧君

1994. 9. 28

编写本书的消息传出后，同行们以极大的热情来电来函关注着编写的进展。由于 1995 年筹备大型研讨会和筹建“Pharmacia Biotech Centre of Excellence”不得不中断了将近二年。在大家的鼓励和支持下，现在终于脱稿，在此表示深深的感谢。由于水平有限，缺点和错误在所难免，诚恳欢迎您批评指正。

中国科学院生物物理所

郭尧君

1998. 4. 16

Preface

I have been associated with Prof. Guo Yaojun for so many years that I have difficulties in remembering when I first met her. It was probably in Bromma (a suburb of Stockholm), Sweden, perfecting her skills in isoelectric focusing. We met then again in occasion of our first Grand Tour of China, in 1983, spreading the Gospel of electrophoresis. She was my gracious host in Beijing and introduced me to the wonders of the great Chinese civilization. It was with her that I toured for the first time the Great Wall, the Temple of Heaven, the Forbidden City and this was truly an adventure, considering that very few foreigners were admitted into China in those days. We met again in other occasions, organizing lectures and workshops around China and she was always present and ready to help and translate our obscure words into more comfortable Chinese language. She must have toured China so extensively, organizing lectures and workshops in electrophoresis, as to be probably the most popular figure in today's Chinese Separation Science. I suspect that, out of so much capillary knowledge, must have born this idea of writing such a comprehensive book in all aspects of electrophoresis. Originally, I remember she approached me with the idea of translating in Chinese my two books in conventional isoelectric focusing and immobilized pH gradients, but I think she was wise in preparing instead a full meal on all aspects of electrophoresis. I now realize my fundamental mistake in writing my two books in English: as my friend Werner Von Braun (the one who brought the man to the moon with his pestiferous rockets) once warned me, I should have learned Chinese!

Prof. PIER GIORGIO RIGHETTI

University of Verona (Italy)

October-29-1998



目 录

序

第一章 电泳概论	(1)
1.1 电泳的早期历史	(2)
1.2 电泳的简单原理	(6)
1.3 电泳的大致分类	(8)
1.4 凝胶电泳技术的历史	(9)
参考文献	(10)
第二章 凝胶电泳的支持介质	(14)
2.1 聚丙烯酰胺凝胶的形成和结构	(15)
2.2 丙烯酰胺和 N, N -甲叉双丙烯酰胺的纯化和 毒性	(18)
2.3 引发剂、增速剂和聚合	(20)
2.4 聚丙烯酰胺凝胶的有效孔径和分子筛效应	(23)
2.5 琼脂糖凝胶的性能、结构与特点	(25)
2.6 电泳新介质	(32)
参考文献	(35)
第三章 凝胶电泳仪器的进展	(38)
3.1 电泳槽	(38)
3.1.1 圆盘电泳	(39)
3.1.2 垂直电泳	(41)
3.1.3 水平电泳	(43)
3.1.4 水平平板电泳的优点	(44)
3.2 电源	(46)
3.3 外循环恒温系统	(47)
3.4 凝胶干燥器	(47)

3.5	各种灌胶模具	(48)
3.6	电泳转移	(48)
3.7	电泳洗脱仪	(50)
3.8	制备电泳仪	(50)
3.9	凝胶扫描和摄录装置	(52)
	参考文献	(53)
第四章	常规聚丙烯酰胺凝胶电泳	(54)
4.1	原理	(54)
4.1.1	蛋白质的电泳行动	(54)
4.1.2	原理	(55)
4.1.3	缓冲系统的选择	(57)
4.1.3.1	pH 的选择	(57)
4.1.3.2	离子强度的选择	(59)
4.1.4	凝胶浓度的选择	(61)
4.1.4.1	浓缩胶与分离胶	(62)
4.1.4.2	浓缩胶的作用原理	(63)
4.1.4.3	均一胶和梯度胶	(64)
4.1.5	连续电泳和不连续电泳	(64)
4.1.6	分子量测定	(66)
4.2	方法	(69)
4.2.1	制胶	(70)
4.2.1.1	垂直平板电泳的制胶	(70)
4.2.1.2	水平平板电泳的制胶	(73)
4.2.2	样品的准备	(79)
4.2.2.1	选择合适的样品缓冲液	(79)
4.2.2.2	蛋白标准的准备	(79)
4.2.2.3	样品浓度	(79)
4.2.2.4	加样要求	(80)
4.2.3	电泳	(80)
4.2.3.1	垂直电泳	(80)
4.2.3.2	水平电泳	(81)
4.2.4	检测	(82)
4.2.4.1	早期染色方法	(82)

4.2.4.2	考马斯亮蓝染色	(83)
4.2.4.3	银染色	(87)
4.2.4.4	其他染色方法	(91)
4.2.4.5	一些蛋白的染色方法	(92)
4.2.4.6	同工酶染色	(95)
4.2.4.7	荧光探针法	(100)
4.2.4.8	免疫方法	(102)
4.2.4.9	电泳转移	(103)
4.2.4.10	电泳后蛋白带的氨基酸分析	(103)
4.2.5	照相, 凝胶干燥	(104)
4.2.6	定量测定	(105)
4.3	实验考虑	(106)
4.3.1	电泳方法和方式的选择	(106)
4.3.2	最佳凝胶浓度和缓冲系统的选择	(106)
4.3.3	凝胶聚合不佳的原因和对策	(107)
4.3.4	样品的预处理	(108)
4.3.5	阳极电泳和阴极电泳	(108)
4.3.6	半干技术	(109)
4.3.7	检测方法的选择	(111)
4.3.8	电泳过程中的不正常现象和对策	(112)
4.3.9	电泳结果的分析	(113)
	参考文献	(115)

第五章 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (123)

5.1	原理	(123)
5.1.1	蛋白质分子的解聚	(123)
5.1.2	缓冲系统的选择	(126)
5.1.3	凝胶浓度的选择	(127)
5.1.4	分子量测定	(128)
5.1.4.1	分子量测定的理论背景	(128)
5.1.4.2	蛋白标准	(129)
5.1.4.3	分子量的计算	(130)
5.1.5	低分子量多肽的 SDS 电泳	(131)
5.2	方法	(132)

5.2.1	制胶（用于垂直电泳或水平电泳）	(132)
5.2.2	样品的准备	(137)
5.2.2.1	样品缓冲液的配制	(137)
5.2.2.2	蛋白标准的准备	(138)
5.2.2.3	样品浓度和加样要求	(138)
5.2.3	电泳	(138)
5.2.3.1	垂直电泳	(138)
5.2.3.2	水平电泳	(138)
5.2.4	检测	(139)
5.2.4.1	考马斯亮蓝染色	(140)
5.2.4.2	银染色	(141)
5.2.4.3	其他染色方法	(144)
5.2.4.4	荧光探针法	(145)
5.2.4.5	电泳转移	(145)
5.2.4.6	电泳后蛋白带的氨基酸组成和序列分析	(145)
5.2.4.7	电泳后的肽图分析	(145)
5.2.5	照相，凝胶干燥	(146)
5.2.6	定量测定	(146)
5.3	实验考虑	(146)
5.3.1	SDS 电泳是测定蛋白质亚基分子量的最佳选择	(146)
5.3.2	凝胶浓度和缓冲系统的选择	(147)
5.3.3	SDS-琼脂糖凝胶电泳	(148)
5.3.4	去污剂的选择	(149)
5.3.4.1	阳离子去污剂	(149)
5.3.4.2	无离子去污剂	(150)
5.3.4.3	酸-尿素去污剂	(150)
5.3.4.4	电荷位移电泳	(150)
5.3.5	样品的处理	(151)
5.3.5.1	还原 SDS 处理	(151)
5.3.5.2	带有烷基化作用（alkylation）的还原 SDS 处理	(152)
5.3.5.3	非还原的 SDS 处理	(152)
5.3.6	半干技术	(153)
5.3.7	检测方法的选择	(154)
5.3.8	生物活性的恢复	(154)

5.3.8.1	在凝胶中恢复活性	(155)
5.3.8.2	电泳转移后恢复生物活性	(156)
5.3.8.3	洗脱后在自由溶液中恢复生物活性	(156)
5.3.9	电泳过程中的不正常现象和对策	(156)
5.3.10	电泳结果的分析	(156)
参考文献		(157)
第六章 载体两性电解质 pH 梯度等电聚焦		(161)
6.1	原理	(161)
6.1.1	蛋白质的等电点	(161)
6.1.2	等电聚焦——在 pH 梯度中的电泳	(162)
6.1.3	等电聚焦的分辨率	(164)
6.2	载体两性电解质和 pH 梯度的形成	(166)
6.2.1	历史	(166)
6.2.2	合成	(167)
6.2.2.1	Ampholine 的合成 (瑞典 LKB 公司)	(167)
6.2.2.2	Servalyte 的合成 (德国 Serva 公司)	(168)
6.2.2.3	Pharmalyte 的合成 (瑞典 Pharmacia 公司)	(169)
6.2.2.4	实验室合成	(170)
6.2.2.5	中国军事医学科学院的载体两性电解质	(170)
6.2.3	特性	(170)
6.2.3.1	分子量小	(170)
6.2.3.2	可溶性好	(171)
6.2.3.3	缓冲能力强	(172)
6.2.3.4	导电性均匀	(172)
6.2.3.5	紫外吸收低, 不发荧光	(172)
6.2.3.6	容易从聚焦的蛋白带中除去	(173)
6.2.3.7	无毒、无生物学效应	(173)
6.2.3.8	螯合性质	(173)
6.2.4	pH 梯度的形成	(173)
6.3	薄层分析等电聚焦的方法	(175)
6.3.1	聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦	(175)
6.3.1.1	制胶	(175)
6.3.1.2	等电聚焦	(179)

6.3.1.3	pH 梯度测定	(180)
6.3.1.4	固定、染色、脱色	(180)
6.3.1.5	保存	(181)
6.3.2	琼脂糖凝胶等电聚焦	(181)
6.3.2.1	制胶	(181)
6.3.2.2	等电聚焦	(183)
6.3.2.3	pH 梯度的测定	(183)
6.3.2.4	固定, 染色, 脱色, 保存	(184)
6.4	实验考虑	(184)
6.4.1	稳定介质的选择	(184)
6.4.2	稳定介质的电内渗	(185)
6.4.3	载体两性电解质和 pH 梯度范围的选择	(187)
6.4.4	丙烯酰胺的聚合	(189)
6.4.5	电极溶液	(191)
6.4.6	四甲基乙二胺 (TEMED) 对丙烯酰胺凝胶的聚合和 pH 梯度的影响	(192)
6.4.7	样品的预处理	(194)
6.4.8	加样方法	(196)
6.4.9	电参数 (电压, 电流, 功率, 温度和时间)	(197)
6.4.10	pH 梯度和 pI 的测定	(201)
6.4.11	聚焦后的检测	(202)
6.4.11.1	各种染色方法	(202)
6.4.11.2	扫描与定量	(203)
6.4.11.3	电泳转移	(204)
6.4.11.4	双向电泳	(204)
6.4.11.5	滴定曲线	(204)
6.4.12	聚焦过程中出现的问题及解决方法	(204)
6.4.12.1	聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦	(204)
6.4.12.2	琼脂糖凝胶等电聚焦	(208)
	参考文献	(210)
第七章	固相 pH 梯度等电聚焦	(214)
7.1	原理	(214)
7.1.1	固相 pH 梯度介质的结构和合成	(214)

7.1.2	Immobiline 的物化特性	(219)
7.1.3	固相 pH 梯度的原理	(223)
7.1.3.1	Henderson-Hasselbalch 公式	(223)
7.1.3.2	一个 pH 范围的固相 pH 梯度	(224)
7.1.3.3	窄范围和宽范围的 pH 梯度	(226)
7.1.3.4	固相 pH 梯度的计算机模拟	(233)
7.1.4	分辨率	(234)
7.2	方法	(238)
7.2.1	制胶	(238)
7.2.1.1	选择 pH 范围, 计算缓冲与滴定 Immobiline 的体积	(238)
7.2.1.2	贮液配置	(239)
7.2.1.3	模具组装和凝胶溶液的配制	(239)
7.2.1.4	灌胶	(240)
7.2.1.5	洗胶和吹胶	(240)
7.2.2	等电聚焦	(241)
7.2.3	pH 梯度的测定	(242)
7.2.4	检测	(242)
7.2.4.1	各种染色方法	(242)
7.2.4.2	凝胶干燥与保存	(243)
7.2.4.3	扫描与定量	(243)
7.2.4.4	双向电泳	(243)
7.2.4.5	电泳转移	(243)
7.3	实验考虑	(243)
7.3.1	固相 pH 梯度的优缺点	(243)
7.3.2	pH 范围的选择	(245)
7.3.3	灌胶与聚合	(245)
7.3.4	洗胶与干胶	(246)
7.3.5	离子强度, 缓冲能力和导电性	(247)
7.3.6	电内渗	(248)
7.3.7	蛋白质的可溶性和添加剂	(249)
7.3.8	盐对固相 pH 梯度等电聚焦的影响	(251)
7.3.9	电参数	(252)
7.3.10	等电点的实验测定	(253)
7.3.11	与质谱连用	(254)

7.3.12 电泳过程中出现的问题和解决方法	(254)
7.4 等电聚焦技术的进展	(255)
7.4.1 第一代等电聚焦	(255)
7.4.2 第二代等电聚焦	(256)
7.4.3 第三代等电聚焦	(256)
7.4.4 第四代等电聚焦	(257)
参考文献	(258)
第八章 双向电泳	(262)
8.1 概述	(262)
8.1.1 O'Farrell 系统——ISO - DALT 系统	(263)
8.1.2 IPG - DALT 系统	(264)
8.2 方法	(265)
8.2.1 ISO - DALT 方法	(265)
8.2.1.1 等电聚焦凝胶的准备	(265)
8.2.1.2 样品的准备和加样	(266)
8.2.1.3 等电聚焦	(266)
8.2.1.4 pH 梯度的测定	(266)
8.2.1.5 平衡	(267)
8.2.1.6 SDS 凝胶的准备	(267)
8.2.1.7 二向间的转移	(267)
8.2.1.8 SDS 电泳	(267)
8.2.1.9 检测	(267)
8.2.2 IPG - DALT 方法	(268)
8.2.2.1 固相 pH 梯度凝胶或凝胶条的准备	(268)
8.2.2.2 溶液配制	(268)
8.2.2.3 凝胶的重新水化	(269)
8.2.2.4 样品准备和加样	(269)
8.2.2.5 等电聚焦	(270)
8.2.2.6 pH 梯度的测定	(270)
8.2.2.7 平衡	(270)
8.2.2.8 SDS 凝胶的准备	(270)
8.2.2.9 二向间的转移	(270)
8.2.2.10 SDS 电泳	(271)
8.2.2.11 检测	(271)

8.3	实验考虑	(271)
8.3.1	双向电泳的次序	(271)
8.3.2	非平衡 pH 梯度电泳 (NEPHGE)	(271)
8.3.3	管状、垂直与水平方式的比较	(272)
8.3.4	ISO-DALT 和 IPG-DALT	(274)
8.3.5	样品的处理	(275)
8.3.6	去污剂的影响	(278)
8.3.7	聚焦参数	(278)
8.3.8	IPG-DALT 系统第一向电泳时的油层覆盖	(279)
8.3.9	两向间的平衡和转移	(279)
8.3.10	双向标准	(280)
8.3.11	点的延长和扩散	(282)
8.3.12	纹理现象	(282)
	参考文献	(283)
第九章	滴定曲线	(287)
9.1	概念	(287)
9.2	方法	(291)
9.3	实验考虑	(291)
9.3.1	在 8mol/L 尿素和去污剂中的滴定曲线	(291)
9.3.2	大分子的滴定曲线	(292)
9.3.3	用琼脂糖作为支持介质	(292)
	参考文献	(292)
第十章	免疫电泳	(294)
10.1	原理	(295)
10.1.1	免疫电泳基础	(295)
10.1.2	单免疫扩散-Mancini 技术	(295)
10.1.3	双扩散-Ouchterlony 技术	(296)
10.1.4	Grabar 和 Williams 免疫电泳	(298)
10.1.5	“火箭”免疫电泳	(299)
10.1.5.1	Laurell “火箭”免疫电泳	(299)
10.1.5.2	融合“火箭”免疫电泳	(299)
10.1.6	交叉免疫电泳	(301)

10.1.6.1	Clarke 和 Freeman 交叉免疫电泳	(301)
10.1.6.2	串联交叉免疫电泳	(301)
10.1.7	反向免疫电泳	(303)
10.2	方法	(303)
10.2.1	溶液的准备	(303)
10.2.2	倒胶	(304)
10.2.3	打孔与加样	(304)
10.2.4	电泳	(304)
10.2.5	检测	(305)
10.3	实验考虑	(305)
10.3.1	支持介质	(305)
10.3.2	缓冲系统	(306)
10.3.3	抗体和抗血清	(306)
10.3.4	方法的选择	(307)
10.3.5	“laying-on” 技术	(307)
10.3.6	媒介凝胶技术	(308)
10.3.7	免疫沉淀的观察	(309)
	参考文献	(310)
第十一章	蛋白质印迹	(312)
11.1	原理	(312)
11.1.1	几种印迹方法	(313)
11.1.1.1	点印迹	(313)
11.1.1.2	扩散印迹	(314)
11.1.1.3	溶剂流印迹	(314)
11.1.1.4	电泳印迹	(315)
11.1.2	固定化材料	(317)
11.1.2.1	硝化纤维素膜	(317)
11.1.2.2	尼龙膜	(317)
11.1.2.3	DBM 和 DPT 纸	(318)
11.1.3	转移缓冲液	(319)
11.1.4	封阻, 标记和检测	(320)
11.2	方法	(320)
11.2.1	从 SDS 凝胶上转移蛋白	(320)

11.2.1.1	溶液配置	(320)
11.2.1.2	转移单元的组成	(321)
11.2.1.3	电参数	(322)
11.2.2	从琼脂糖凝胶上转移蛋白	(322)
11.2.2.1	溶液配置	(322)
11.2.2.2	转移单元的组成	(322)
11.2.2.3	电参数	(322)
11.2.3	从等电聚焦凝胶上转移蛋白	(323)
11.2.3.1	溶液配置	(323)
11.2.3.2	转移单元的组成	(323)
11.2.3.3	电参数	(323)
11.2.4	检测	(323)
11.3	实验考虑	(324)
11.3.1	电泳转移的效率	(324)
11.3.2	转移缓冲液	(324)
11.3.3	封阻	(326)
11.3.4	探针	(327)
11.3.5	总蛋白染色	(328)
11.3.6	转移膜的塑料包埋和透明化	(329)
11.3.6.1	溶液和材料	(329)
11.3.6.2	操作	(330)
11.3.7	垂直槽式和水平半干式电泳印迹	(330)
11.3.8	印迹过程中出现的问题及解决办法	(331)
	参考文献	(333)

第十二章 制备电泳

12.1	洗脱	(339)
12.1.1	扩散洗脱	(339)
12.1.2	电泳洗脱	(340)
12.2	连续电泳	(340)
12.2.1	连续洗脱电泳	(340)
12.2.2	连续自由流动电泳	(340)
12.2.3	空间电泳	(340)
12.3	等电聚焦制备电泳	(341)

12.3.1 液体介质 (341)

12.3.2 凝胶介质 (342)

12.3.3 方法 (342)

12.3.4 实验考虑 (345)

12.3.5 固相 pH 梯度制备等电聚焦 (346)

12.4 样品的均一性 (347)

参考文献 (347)