

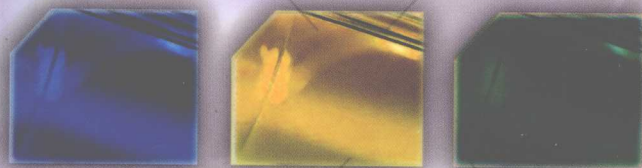
国家“十一五”重点图书出版项目
——生物医学实验技术系列丛书

DANBAIZHI DIANYONG

蛋白质电泳 与分析

YU FENXI

主编◎沃兴德



军事医学科学出版社

国家“十一五”重点图书出版项目
——生物医学实验技术系列丛书

蛋白质电泳与分析

主 编 沃兴德
副主编 程东庆
编 委 窦晓兵 葛尔宁 卢德赵

军事医学科学出版社
· 北 京 ·

图书在版编目(CIP)数据

蛋白质电泳与分析/沃兴德主编.
-北京:军事医学科学出版社,2008.11
(现代生物医学实验技术系列丛书)
ISBN 978-7-80245-240-4

I.蛋… II.沃… III.蛋白质-凝胶电泳 IV.Q510.3

中国版本图书馆CIP数据核字(2008)第177131号

出 版:军事医学科学出版社
地 址:北京市海淀区太平路27号
邮 编:100850
联系电话:发行部:(010)66931051,66931049,81858195
编辑部:(010)66931127,66931039,66931038
86702759,86703183
传 真:(010)63801284
网 址:<http://www.mmsp.cn>
印 装:北京冶金大业印刷有限公司
发 行:新华书店

开 本:787mm×1092mm 1/16
印 张:9.375
字 数:149千字
版 次:2009年6月第1版
印 次:2009年6月第1次
定 价:20.00元

本社图书凡缺、损、倒、脱页者,本社发行部负责调换

内 容 提 要

本书为国家“十一五”重点图书出版项目——生物医学实验技术丛书的分册之一。全面系统地介绍了蛋白质电泳技术,包括发展简史、电泳的基本原理、分类和应用以及影响电泳迁移的因素。重点阐述了7种蛋白质电泳技术的原理、方法和具体应用,特别是对电泳中可能出现的问题以及解决的方法作了详细介绍。本书具有实用性、操作性强的特征,是一本关于蛋白质电泳方面非常实用的工具书。本书适用于生物化学、生物技术和生物医学实验室工作人员及本科和研究生的实验教学。

前 言

自俄国科学家 Peйce 在 1809 年首次发现电泳现象以来已整整经历了 200 年,最初用滤纸和醋酸纤维素薄膜电泳对小分子物质进行分离和分析,以后发展到以琼脂糖和聚丙烯酰胺凝胶作为支持介质,对复杂的生物大分子进行分离、纯化和鉴定,从而使电泳技术成为分析蛋白质、核酸等生物大分子的重要手段。电泳技术与免疫学结合产生的免疫电泳,在对生物大分子定性和定量分析中起到了重要的作用。进入 80 年代后人类基因组课题的提前完成借助了毛细管电泳技术的发展,使对 DNA 序列自动化检测成为可能,大大缩短了人类基因组序列测定的时间。由于双向电泳和质谱分析技术的日趋成熟,生命科学进入了后基因组时代,蛋白质组学研究给蛋白质电泳技术带来了新的机遇、新的挑战、新的应用。双向电泳以它特有的高分辨率、高信息量而成为蛋白质组学研究的首选技术之一。可见每一个生命科学研究领域的进步都离不开电泳技术的发展。

电泳技术在生物化学、生物技术和医学生物学研究领域中具有重要的作用,每个科研工作者、临床检验医师、从事生命科学教学的老师和正在接受生物科学教育的学生都会接触到电泳技术。在多年从事医学生物学科研和教学实践中,我们应用电泳技术对蛋白质进行分离纯化、对蛋白质分子量进行测定、对临床蛋白质样品进行定性和定量分析以及在中药和中医不同证型对蛋白质组影响的研究中做了大量的工作,积累了一些经验体会,编写了《蛋白质电泳与分析》一书。书中除了介绍醋酸纤维素薄膜电泳、聚丙烯酰胺凝胶电泳、等电聚焦、免疫电泳、蛋白质免疫印迹试验、双向电泳和毛细管电泳外,也对这些电泳过程中出现的问题以及解决的方法作了比较详细的介绍。希望通过我们的努力能给读者在实际工作中提供一定的帮助。

由于水平有限,缺点和错误在所难免,诚恳欢迎您的批评指正。

编者

2009-03-18

目 录

第一章 总论	(1)
1 电泳技术发展简史	(1)
2 电泳的基本原理	(2)
3 电泳技术分类	(3)
4 电泳技术的应用	(5)
5 影响电泳迁移率的因素	(6)
6 常用电泳方法	(8)
7 电泳仪器	(20)
第二章 醋酸纤维素薄膜电泳	(29)
1 醋酸纤维素薄膜电泳的原理	(29)
2 应用举例:醋酸纤维素薄膜电泳分离血清蛋白	(30)
第三章 聚丙烯酰胺凝胶电泳	(36)
1 聚丙烯酰胺凝胶电泳的原理	(36)
2 聚丙烯酰胺凝胶电泳的应用	(38)
3 十二烷基硫酸钠(SDS)—聚丙烯酰胺凝胶电泳	(39)
4 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳	(44)
5 常见问题分析	(47)
第四章 等电聚焦	(57)
1 等电聚焦技术的发展过程	(57)
2 等电聚焦技术的原理	(58)
3 载体两性电解质 pH 梯度等电聚焦	(60)
4 固相 pH 梯度等电聚焦电泳	(65)
第五章 免疫电泳	(70)
1 一般免疫电泳	(70)
2 对流免疫电泳	(73)
3 火箭免疫电泳	(75)

4 交叉免疫电泳	(77)
5 免疫共沉淀	(79)
第六章 蛋白免疫印迹试验	(82)
1 传统的蛋白质免疫印迹技术	(83)
2 蛋白免疫印迹试验中的新仪器、新方法	(91)
第七章 双向电泳	(93)
1 实验方法	(94)
2 双向荧光差异凝胶电泳(2-D DIGE)技术	(113)
3 双向电泳常见的失误与解决方法	(116)
第八章 毛细管电泳	(121)
1 概论	(121)
2 理论基础	(123)
3 基本操作和实验条件选择及注意事项	(127)
4 毛细管电泳技术在生物、药物及食品检测方面的应用	(134)
5 应用举例	(136)
参考文献	(140)

第一章

总论

1 电泳技术发展简史

在电场的作用下,带电粒子在基质中向符号相反的电极移动的现象称为电泳(electrophoresis)。电泳现象在 1809 年首次由俄国物理学家 Рейсэ 发现。他在湿黏土中插上带玻璃管的正负两个电极,加电压后发现正极玻璃管中原有的水层变混浊,即带负电荷的黏土颗粒向正极移动,这就是电泳现象。

1909 年 Michaelis 首次将胶体离子在电场中的移动称为电泳。他用不同 pH 的溶液在 U 形管中观察了转化酶和过氧化氢酶的电泳移动并测定了等电点。

1937 年瑞典 Uppsala 大学的 Svedberg 和其学生 Tiselius 对电泳仪器做了改进,创造了 Tiselius 电泳仪,建立了研究蛋白质的“移动界面”电泳,即现在的区带电泳方法,从此电泳技术才开始应用,并首次证明了血清是由白蛋白及 α 、 β 、 γ 球蛋白组成的。Tiselius 由于在电泳技术方面做出的开拓性贡献而获得了 1948 年的诺贝尔化学奖。

1948 年 Wieland 和 Fischer 重新发展了以滤纸作为支持介质的电泳方法,对氨基酸的分离进行了研究。

从 20 世纪 50 年代起,特别是 1950 年 Durrum 用纸电泳进行了各种蛋白质的分离以后,利用各种固体物质(如各种滤纸、醋酸纤维素薄膜、琼脂凝胶、淀粉凝胶等)作为支持介质的区带电泳方法得到广泛应用。

在 20 世纪 40 年代和 20 世纪 50 年代,当电泳技术的应用范围从大的蛋白质分子扩展到氨基酸,甚至无机离子时,电泳技术得到了长足的发展。除了区带电泳外,也出现另外两个类型的电泳,即等电聚集和等速电泳。由于三种分离方法是基于不同的物理特性,这就使得我们能对一个样品使用三种不同的方法进行检测或者通过几种方法联合使用对样品进行分析测定。

如等电聚焦后使用 SDS-PAGE 平板电泳被称作双向凝胶电泳,大大提高了分辨率,此方法能使每块凝胶板中分离得到数千点。

这三种电泳方法之间的区别与基质有关。现在使用的这些基质,如凝胶、纸和毛细管经证明对不同类型的样品电泳分离具有不同的优点。虽然纸由于用不着制备基质,被最早用于电泳,但凝胶电泳一直被沿用至今,也是应用最多的电泳基质。1955 年 Smithies 使用淀粉凝胶作为基质进行电泳,两年后 Kohn 使用醋酸纤维素作为基质,1959 年 Ornstein/Davis 和 Raymond/Weintraub 利用人工合成的凝胶作为支持介质,创建了聚丙烯酰胺凝胶电泳,极大地提高了电泳技术的分辨率,开创了近代电泳的新时代。这些基质被广泛应用于蛋白质、核酸、酶,以及病毒与细胞的分离、分析与研究,并且还用于其他小分子物质的分离、分析。30 多年来,聚丙烯酰胺凝胶电泳仍是生物化学和分子生物学中对上述生物大分子使用最普遍,分辨率最高的分析鉴定技术,是检验生化物质的最高纯度,即“电泳纯”(一维电泳一条带或二维电泳一个点)的标准分析鉴定方法,至今仍被人们称为是对生物大分子进行分析鉴定的最后、最准确的手段。

与此同时,分析技术也得到了很好的发展,这些新技术、新方法可帮助人们对电泳基质中的样品进行分析和定量,这些技术包括化学染色、免疫电泳技术、双向电泳技术和各种免疫印迹技术。

20 世纪 80 年代早期由 Jorgenson 和 Lukacs 发展起来的毛细管电泳技术,是化学和生化分析鉴定技术的重要新发展,因为它能对众多的物质,如蛋白质、核酸、药物、代谢物和多肽的分析提供理论上能达到一百万理论踏板数的分离方法,已受到人们的充分重视。

2 电泳的基本原理

电泳是指带电颗粒在电场的作用下发生迁移的过程。许多重要的生物分子,如氨基酸、多肽、蛋白质、核苷酸、核酸等都具有可电离基团,它们在某个特定的 pH 值下可以带正电或负电,在电场的作用下,这些带电分子会向着与其所带电荷极性相反的电极方向移动。电泳技术就是利用在电场的作用下,待分离样品中各种分子由于带电性质、电荷数量以及分子本身大小、形状等性质的差异而产生不同的迁移速度,从而对样品进行分离、鉴定或提纯的技术。

在电场中,推动带电质点运动的力(F)等于质点所带净电荷量(Q)与电场强度(E)的乘积。

$$F=QE$$

质点的前移同样要受到阻力(F')的影响,对于一个球形质点,服从Stoke定律,即:

$$F'=6\pi r\eta v$$

式中 r 为质点半径, η 为介质黏度, v 为质点移动速度,当质点在电场中做稳定运动时:

$$F=F', \text{ 即 } QE=6\pi r\eta v$$

上式交换后可写成

$$\frac{v}{E} = \frac{Q}{6\pi r\eta}$$

v/E 的含意为单位电场强度下的移动速度,这里可用迁移率 μ 表示,即

$$\mu = \frac{v}{E} = \frac{Q}{6\pi r\eta}$$

从上式可见,球形质点的迁移率,首先取决于自身状态,即与所带电量成正比,与其半径及介质黏度成反比。除了自身状态的因素外,电泳体系中其他因素也影响质点的电泳迁移率。

3 电泳技术分类

根据分离的原理不同可将电泳分为以下5种。

3.1 区带电泳

因在电泳过程中,待分离的各组分分子在支持介质中被分离成许多条明显的区带而得名。区带电泳有各种类型的物质作支持体,样品在固定的介质中进行电泳,减少了扩散和对流等干扰作用,故区带电泳的分离效果远比界面电泳要好。区带电泳因电泳仪构造简单、体积小、操作方便等原因,发展迅速,是当前应用最为广泛的电泳技术。区带电泳包括滤纸电泳(常压及高压)、薄层电泳(薄膜及薄板)、凝胶电泳(琼脂、琼脂糖、淀粉胶、聚丙烯酰胺凝胶)等。

如果就目前常用的区带电泳进行分类,可有以下不同的分类方法。

(1)按支持物的物理性状不同分类

- ①滤纸及其他纤维(如醋酸纤维、玻璃纤维、聚氯乙烯纤维)薄膜电泳。
- ②粉末电泳:如纤维素粉、淀粉、玻璃粉电泳。

③凝胶电泳:如琼脂、琼脂糖、硅胶、淀粉胶、聚丙烯酰胺凝胶等。

④丝线电泳:如尼龙丝、人造丝电泳。

(2)按支持物的装置形式不同分类

①平板式电泳:支持物水平放置,是最常用的电泳方式。

②垂直板式电泳:聚丙烯酰胺凝胶常做成垂直板式电泳。

③垂直柱式电泳:聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳即属于此类。

④连续流电泳:首先应用于纸电泳,将滤纸垂直竖立,两边各放一电极,溶液自顶端向下流,与电泳方向垂直。后来有用淀粉、纤维素粉、玻璃粉等代替滤纸来分离血清蛋白质,分离量最大。

(3)按 pH 的连续性不同分类

①连续 pH 电泳:即在整个电泳过程中 pH 保持不变,常用的纸电泳、醋酸纤维薄膜电泳等属于此类;

②非连续性 pH 电泳:缓冲液和电泳支持物间有不同的 pH,如聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳分离血清蛋白质时常用这种形式。它的优点是易在不同 pH 区之间形成高的电位梯度区,使蛋白质移动加速并压缩为一极狭窄的区带而达到浓缩的作用。

(4)按所用电压不同分类

①低压电泳:100~500 V,电泳时间较长,适于分离蛋白质等生物大分子。

②高压电泳:1 000~5 000 V,电泳时间短,有时只需几分钟,多用于氨基酸、多肽、核苷酸和糖类等小分子物质的分离。

3.2 界面电泳

界面电泳是指在溶液中进行的电泳,没有固体支持物。由于没有固定支持介质,所以扩散和对流都比较强,因此分离效果较差。当溶液中有几种带电粒子时,通电后由于不同种类粒子泳动速度不同,在溶液中形成相应的区带界面,但区带界面由于扩散而易于互相重叠,不易得到纯品,且分离后不易收集。界面电泳因电泳仪构造复杂、体积庞大、操作要求严格、价格昂贵等原因,发展并不迅速,故目前已很少应用界面电泳。

3.3 等速电泳

需使用专用电泳仪,当电泳达到平衡后,各电泳区带相随,分成清晰的

界面,并以等速向前运动。

3.4 等电聚焦电泳

由两性电解质在电场中自动形成 pH 梯度,当被分离的生物大分子移动到各自等电点的 pH 处即聚集成很窄的区带。

3.5 毛细管电泳

毛细管电泳和一般电泳法的区别在于使用毛细管柱。毛细管电泳的分离基于组分淌度的区别,一般毛细管内壁带负电荷。由于吸引了溶液中的阳离子,由此在毛细管内壁形成表面带阴离子的双电层。电渗流从阳极移动至阴极,流出顺序是阴离子<中性分子<阳离子。若毛细管内壁涂上一层阳离子表面吸附剂,则极性颠倒,流出顺序是阳离子<中性分子<阴离子。毛细管电泳具有分离方便、快速、样品用量小的特点,在无机离子、有机物、氨基酸、蛋白质及各种生物样品的测试中有着广泛的应用。毛细管电泳包括毛细管区带电泳、胶束电动毛细管色谱、毛细管凝胶电泳等。

4 电泳技术的应用

电泳技术主要用于分离各种有机物(如氨基酸、多肽、蛋白质、脂类、核苷酸、核酸等)和无机盐;也可用于分析某种物质纯度;还可用于分子量的测定。最早使用的支持介质是滤纸和醋酸纤维素薄膜,目前已经很少使用。在很长一段时间里,小分子物质如氨基酸、多肽、糖等通常用滤纸或纤维素、硅胶薄层平板为介质的电泳进行分离和分析,但目前则一般使用更灵敏的技术如高效液相色谱(HPLC)等来进行分析。这些介质适合于分离小分子物质,操作简单、方便。但对于复杂的生物大分子分离效果较差。凝胶作为支持介质的引入大大促进了电泳技术的发展,使电泳技术成为分析蛋白质、核酸等生物大分子的重要手段之一。最初使用的凝胶是淀粉凝胶,效果不佳,目前使用得最多的是琼脂糖凝胶和聚丙烯酰胺凝胶。核酸(DNA 和 RNA)的分析测定多用琼脂糖凝胶,而蛋白质电泳主要使用聚丙烯酰胺凝胶。

电泳技术与其他分离技术(如层析法)结合,可用于蛋白质结构的分析,“指纹法”就是电泳法与层析法的结合产物。用免疫原理测试电泳结果,可提高对蛋白质的鉴别能力。电泳与酶学技术结合发现了同工酶,从而对酶

的催化和调节功能有了更深入的了解。所以电泳技术是医学科学研究中的重要技术。

5 影响电泳迁移率的因素

如前所述(见电泳的基本原理),带电粒子的迁移率 $\mu = Q / (6\pi r \eta)$

由于蛋白质、氨基酸等的电离度 α 受溶液 pH 值影响,所以常用迁移率和当时条件下电离度 α 的乘积即有效迁移率 U 表示泳动情况: $U = \mu \cdot \alpha$

代入同 μ 得: $U = \alpha Q / (6\pi r \eta)$

从上式可以看出,影响分子带电量 Q 及电离度 α 的因素如溶液的 pH、影响溶液黏度系数的因素如温度、分子的半径 r 等,都会影响有效迁移率。因此,电泳应尽可能在恒温条件下进行,并选用一定 pH 的缓冲液。所选用的 pH 以能扩大各种被分离组分所带电荷量的差异为好,以利于各种成分的分离。

除以上因素影响电泳结果外,还有离子强度、电渗现象也对电泳构成影响。一般最合适的离子强度在 $0.02 \sim 0.20 \text{ mol/L}$ 之间。离子强度过小会降低溶质的溶解度,离子强度过大会降低被分离组分的泳动速度并增加电泳过程中的发热量,使区带扩散变形。如果电泳不是在溶液中而是在支持介质中进行,还要注意选用无电渗或低电渗物质作支持物。所谓电渗是指在电场中,液体对于固体支持物的相对移动。电渗液流往往破坏电泳中已形成的区带,使其扩散变形。

综上所述,电泳受粒子本身大小、形状、所带电量、溶液黏度、温度、pH 值、电渗及离子强度等多种因素的影响。当电泳结果欠佳时,应检查或重新设计实验条件以便改进。现就影响电泳迁移率的主要因素介绍如下。

(1) 电场强度对电泳迁移率的影响

电场强度(V/cm)是每厘米的电位降,也称电位梯度。电场强度越大,电泳速度就越快。但增大电场强度会引起通过介质的电流强度增大,而造成电泳过程产生的热量增大。电流在介质中所做的功(W)为:

$$W = I^2 \cdot R \cdot t$$

式中: I 为电流强度, R 为电阻, t 为电泳时间。

电流所做的功绝大部分都转换为热,因而引起介质温度升高,这会造成很多影响:①样品和缓冲离子扩散速度增加,引起样品分离带的加宽;②产生对流,引起待分离物的混合;③如果样品对热敏感,会引起蛋白变性;④引起介质黏度降低、电阻下降等;⑤电场强度加大,可引起水的蒸发,改变溶液

pH 及使离子强度更大,电泳中产生的热通常是由中心向外周散发的,所以介质中心温度一般要高于外周,尤其是管状电泳,由此引起中央部分介质相对于外周部分黏度下降,摩擦系数减小,电泳迁移速度增大,由于中央部分的电泳速度比边缘快,所以电泳分离带通常呈弓型。降低电流强度,可以减小生热,但会延长电泳时间,引起待分离生物大分子扩散的增加而影响分离效果。所以电泳实验中要选择适当的电场强度,同时可以适当冷却降低温度以获得较好的分离效果。

(2) 溶液的 pH 值对电泳迁移率的影响

溶液的 pH 决定被分离物质的解离程度和质点的带电性质及所带净电荷量。例如蛋白质分子,它是既有酸性基团($-\text{COOH}$),又有碱性基团($-\text{NH}_2$)的两性电解质,在某一溶液中所带正负电荷相等,即分子的净电荷等于零,此时,蛋白质在电场中不再移动,溶液的这一 pH 值为该蛋白质的等电点(isoelectric point, pI)。若溶液 pH 处于等电点酸侧,即 $pH < pI$,则蛋白质带正电荷,在电场中向负极移动。若溶液 pH 处于等电点碱侧,即 $pH > pI$,则蛋白质带负电荷,向正极移动。溶液的 pH 离 pI 越远,质点所带净电荷越多,电泳迁移率就越大。因此在电泳时,应根据样品性质,选择合适的 pH 值缓冲液。蛋白质的等电点多在 $pH 4 \sim 6$ 之间,因此,分离蛋白质常用 $pH 8.6$ 的巴比妥缓冲液或三羟甲基氨基甲烷(Tris)缓冲液。

(3) 溶液的离子强度对电泳迁移率的影响

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摩尔浓度与其价数平方之积总和的一半。溶液中的离子浓度越大,或离子的价数越高,离子强度就越大。电泳液中的离子浓度增加时会引起质点迁移率的降低。其原因是带电质点吸引相反电荷的离子聚集其周围,形成一个与运动质点电荷相反的离子氛(ionic atmosphere),犹如大气层包围地球:距离中心离子愈近,反离子密度就愈大;反之,密度就愈小。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。因此离子氛不仅降低质点的带电量,同时增加质点前移的阻力,甚至使其不能泳动。

然而离子浓度过低,会降低缓冲液的总浓度及缓冲容量,不易维持溶液的 pH 值,影响质点的带电量,改变泳动速度。离子的这种障碍效应与其浓度和价数相关。可用离子强度 I 表示。

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^s C_i Z_i$$

式中 S 表示溶液中离子种类, C_i 和 Z_i 分别表示每种离子的摩尔浓度与化合价。最常用 I 值在 $0.02 \sim 0.2$ 之间。

4. 电渗对电泳迁移率的影响

在电场作用下液体对于固体支持物的相对移动称为电渗(electrosmosis)。其产生的原因是固体支持物多孔,且带有可解离的化学基团,因此常吸附溶液中的正离子或负离子,使溶液相对带负电或正电。如以滤纸作支持物时,纸上纤维素吸附 OH^- 带负电荷,与纸接触的水溶液因产生 H_3O^+ ,带正电荷移向负极。若质点原来在电场中移向负极,结果质点的表现速度比其固有速度要快;若质点原来移向正极,表现速度比其固有速度要慢。可见应尽可能选择低电渗作用的支持物以减少电渗的影响。

5. 其他因素对电泳迁移率的影响

另外,待分离生物大分子所带的电荷、分子大小和性质都会对电泳有明显影响。一般来说,分子带的电荷量越大、直径越小、形状越接近球形,其电泳迁移速度就越快。支持介质的筛孔大小对待分离生物大分子的电泳迁移速度有明显的影响。在筛孔大的介质中泳动速度快,反之,则泳动速度慢。

6 常用电泳方法

6.1 纸电泳和醋酸纤维素薄膜电泳

纸电泳用于血清蛋白质分离已有相当长的历史,在实验室和临床检验中都曾经广泛应用。纸电泳是用滤纸作支持介质的一种早期电泳技术。尽管分辨率比凝胶介质要差,但由于其操作简单,所以仍有很多应用。

纸电泳使用水平电泳槽。分离氨基酸和核苷酸时常用 $\text{pH } 2.0 \sim 3.5$ 的酸性缓冲液,分离蛋白质时常用碱性缓冲液。选用的滤纸必须厚度均匀,常用国产新华滤纸和进口的 Whatman 1 号滤纸。点样方法有干点法和湿点法。湿点法是在点样前即将滤纸用缓冲液浸湿,样品液要求较浓,不宜多次点样。干点法是在点样后再用缓冲液和喷雾器将滤纸喷湿,可用吹风机吹干后多次点样,因而可以用较稀的样品。

电泳时要选择好正、负极,电压通常使用 $2 \sim 10 \text{ V/cm}$ 的低压电泳。对于氨基酸和肽类等小分子物质,则要使用 $50 \sim 200 \text{ V/cm}$ 的高压电泳,电泳

时间可以大大缩短,但必须解决电泳时的冷却问题。

电泳完毕记下滤纸的有效使用长度,然后烘干,用显色剂显色。定量测定的方法有洗脱法和光密度法。洗脱法是将确定的样品区带剪下,用适当的洗脱剂洗脱后进行比色或分光光度测定。光密度法是将染色后的干滤纸用光密度计直接定量测定各样品电泳区带的含量。

自从1957年Kohn首先将醋酸纤维素薄膜用作电泳支持物以来,纸电泳已被醋酸纤维素薄膜电泳所取代。醋酸纤维素薄膜电泳与纸电泳相比有以下优点:①醋酸纤维素薄膜对蛋白质样品吸附极少,无“拖尾”现象,染色后蛋白质区带更清晰。②快速省时。由于醋酸纤维素薄膜亲水性比滤纸小,吸水少,电渗作用小,电泳时大部分电流由样品传导,所以分离速度快,电泳时间短,完成全部电泳操作只需90 min左右。③灵敏度高,样品用量少。血清蛋白电泳仅需2 μl 血清,点样量甚至至少到0.1 μl ,仅含5 μg 的蛋白样品也可以得到清晰的电泳区带。临床可用于检测微量异常蛋白的改变。④此法应用面广,可用于那些纸电泳不易分离的样品,如胎儿甲种球蛋白、溶菌酶、胰岛素、组蛋白等。⑤醋酸纤维素薄膜电泳染色后,用乙酸、乙醇混合液浸泡后可制成透明的干板,有利于光密度计和分光光度计扫描定量及长期保存。

由于醋酸纤维素薄膜电泳操作简单、快速、价廉,目前已广泛用于分析检测血浆蛋白、脂蛋白、糖蛋白、胎儿甲种球蛋白、体液、脊髓液、脱氢酶、多肽、核酸及其他生物大分子,为心血管疾病、肝硬化及某些癌症鉴别诊断提供了可靠的依据,因而已成为医学和临床检验的常规技术。

纸电泳和醋酸纤维素薄膜电泳仪器装置包括电泳室及直流电源两部分。常用的水平式电泳室装置见电泳仪器节,包括两个电泳槽和一个可以密封的玻璃(或相应材料)盖;两侧的电泳槽均用有机玻璃(或相应材料)板分成两部分;外格装有铂电极(直径0.5~0.8 cm);里格为可放滤纸的有机玻璃电泳槽架,此架可从槽中取出;两侧电泳槽内的铂电极经隔离导线穿过槽壁与外接电泳仪电源相连。电源为具有稳压器的直流电源,常压电泳一般在100~500 V,高压电泳一般在500~1 000 V。

6.2 琼脂糖凝胶电泳

琼脂经处理去除其中的果胶成分即为琼脂糖。琼脂糖是由链状多糖组成,由于硫酸根含量较琼脂为少,电渗影响减弱,因而分离效果显著提高。琼脂糖形成的凝胶孔径较大,可以用作蛋白质和核酸的电泳支持介质,尤其

适合于核酸的提纯、分析。对一般蛋白质不起分子筛作用,因此适合于免疫复合物、核酸、脂蛋白与核蛋白的分离、鉴定及纯化。

琼脂糖凝胶电泳分为垂直及水平型两种。其中水平型可制备低浓度琼脂糖凝胶,通常的浓度是1%~3%,加热煮沸至溶液变澄清,注入模板后室温下冷却凝聚即成琼脂糖凝胶。琼脂糖凝胶的孔径可以通过琼脂糖的最初浓度来控制,低浓度的琼脂糖形成较大的孔径,而高浓度的琼脂糖形成较小的孔径。由于制胶与加样都比较方便,故应用比较广泛。琼脂糖凝胶通常使用水平式板状凝胶,垂直式板状电泳应用得相对较少。由于琼脂糖凝胶的弹性较差,难以从小管中取出,所以一般琼脂糖凝胶不适合于管状电泳。琼脂糖凝胶电泳可用于等电聚焦、免疫电泳等蛋白质电泳,也适合于DNA、RNA分子的分离、分析。电泳迁移率的大小主要与蛋白质和DNA分子大小有关,而与蛋白质的荷电数及碱基排列及组成无关。另外,一些低熔点的琼脂糖(62~65℃)可以在65℃时熔化,因此其中的样品如DNA可以重新溶解到溶液中而回收。电泳电压一般为5~15 V/cm。对大分子的分离可用5 V/cm。电泳最好在低温条件下进行。

6.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)

聚丙烯酰胺凝胶是一种人工合成的凝胶,是由单体的丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺聚合而成。在聚合过程中需要催化。常用的催化聚合是化学聚合和光聚合。化学聚合通常是加入催化剂过硫酸铵以及加速剂四甲基乙二胺。光聚合的催化剂是核黄素,核黄素在光照下能够产生自由基,催化聚合反应。一般光照2~3h即可完成聚合反应。

由于四甲基乙二胺催化过硫酸铵产生自由基,从而使乙烯基发生聚合形成丙烯酰胺长链,同时甲叉双丙烯酰胺在不断延长的丙烯酰胺链间形成甲叉键交联,最终形成交联的三维网状结构。由于氧气对自由基有清除作用,所以最好在凝胶溶液聚合前要进行抽气。丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺是一种对中枢神经系统有毒的试剂,操作时要避免直接接触皮肤,但它们聚合后则无毒。

聚丙烯酰胺凝胶的孔径可以通过改变丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺的浓度来控制,丙烯酰胺的浓度可以在3%~30%之间。低浓度的凝胶具有较大的孔径,如3%的聚丙烯酰胺凝胶对蛋白质没有明显的阻碍作用,可用作平板等电聚焦或SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳的浓缩胶,也可以用于分离DNA;