

电泳技术

(一) 原理

1、电泳、迁移率

电泳 (Electrophoresis) 是指溶液中带电粒子在电场中向带相反电荷的电极方向移动的现象。在生物科学中, 电泳技术广泛应用于蛋白质、核酸和氨基酸等物质的分离和鉴定。

因为带电粒子的移动速度和电场强度有密切关系, 所以为了表示不同物质有不同泳动速度的特性, 通常使用“迁移率” (Mobility) 的概念。带电粒子在电泳时的迁移率, 就是指在单位电场强度下粒子的移动速度 ($\frac{V}{X}$)。

2、影响迁移率的因素

在电泳过程中, 带电粒子的移动速度 v 除与粒子所带电荷量 Q 及电场强度 X 有关外, 还与粒子半径 r 及介质的粘度 η 有关:

$$v = \frac{QX}{6\pi r\eta}$$

式中 6π 是适用于球形带电粒子的经验数值, 对椭圆形或半径很大的粒子则数值有所不同。可见, 带电粒子的移动速度和粒子的本身的性质有密切关系, 粒子表面所带电荷量和物质的组成结构有密切关系。此外, 粒子的大小 (分子量) 及粒子的形状等也有重要的影响。所以, 在一定电场强度下, 不同种类的带电物质在电泳时的移动速度就不能完全一致, 这种移动速度的差异就是电泳技术的基本依据。

(1) 样品

带电化合物的性质在几个方面影响着它们的迁移率。

- (1) 电荷: 迁移率随净电荷的增加而增加。电荷的大小一般由 pH 决定。
- (2) 分子大小: 对于较大的分子, 由于周围介质所引起的摩擦力和静电力的增加, 迁移率下降。
- (3) 形状: 同样大小的, 但是具有不同形状分子, 如纤维状的蛋白质和球状蛋白质, 因摩擦力作用不同, 而表现有不同的迁移特征。

(2) 电场

欧姆定律表示了电流 A (安培)、电压 V (伏特) 和电阻 Ω (欧姆) 之间的关系: $A = V / \Omega$ 。因此, 离子在电场中的分离受到这三个因素的影响。

(1) 电流：由于在二个电极之间溶液中的电流完全由缓冲液和样品的离子来传导，因此，迁移率与电流成正比。离子迁移的距离与通电时间成正比。因此，为了得到最好的重复性，在电泳时电流必须保持恒定。当然必须使用直流电。

(2) 电压：电压控制着电流，因此，迁移率与加在支持介质两端的电位差成正比。这是电压梯度，一般用伏特 / 厘米 (V/cm) 来表示 (即，所加的电压除以支持介质的长度)。可以使用低电压 (100—500 伏)，或者高电压 (500—10,000 伏)，电压梯度分别可达 20 和 200 伏 / 厘米。高电压主要是用于分离小分子的化合物。

(3) 电阻：迁移率与电阻成反比，电阻由支持介质的类型和大小，以及缓冲液的离子强度所决定。电阻随支持介质的长度而增加，随支持介质的宽度和缓冲液离子强度的增加而降低。

在电泳时以 $A^2\Omega$ 瓦特的比率产生热，并且电阻随温度升高而下降。因此，如果电压保持不变，那么这种温度的升高将会引起电流的升高，并且促使了支持介质上溶剂的蒸发。为了尽可能得到可重复的结果，使用经过稳定的电源装置，尽管由于温度的波动，不可避免地会引起电阻的改变，但是这种电源能自动地保持电压或者电流的恒定。用一个密闭的盖子罩住电泳槽以减少蒸发。在电泳槽中附设一个冷却系统，在高压工作时起到外加冷却的作用。

(3) 缓冲液

缓冲液决定着并稳定着支持介质的 pH，并且通过很多途径也影响着化合物的迁移率。

(1) 成分：通常所用的缓冲液是甲酸盐、乙酸盐、柠檬酸盐、巴比妥盐和磷酸盐、Tris、EDTA 和吡啶。硼酸缓冲液经常用于碳水化合物的分离，因为它们能和碳水化合物产生带电的复合物。

因为缓冲液是样品的溶剂，因此，不可避免的会有一定强度的样品扩散。特别值得注意的是像氨基酸和糖一类的小分子。让样品走成很窄的带，避免过量的加样；在一个尽可能短的时间内使用高电压；以及在分离完成后迅速地取出并干燥等都能缩小扩散的适度。

(2) 浓度：由于缓冲液离子强度的增加，缓冲液所载的分电流也随之增加，样品所载的电流则降低，因此而减缓了样品的迁移率。增加缓冲液的离子强度也增加了总电流，因而增加了热的产生。

在低离子强度时，缓冲液所载的电流下降，样品所载的电流增加，因此加速了样品的迁移。低离子强度的缓冲液降低了总电流，结果减少了热的产生，但是扩散较严重，使分辨力明显的降低。

所以，选择离子强度时必须两者兼顾，一般离子强度的选择范围在 0.02~0.2 之间。离子

强度 = $\frac{1}{2} \sum CZ^2$, C是离子的克分子浓度, Z是它所带的电荷。

(3) pH: 像无机盐那样的完全离子化的化合物, pH 的作用不大。但是对于有机化合物, pH 决定了它的电离程度。有机酸的电离随 pH 的增加而增加, 有机碱则相反; 因此, 它们的迁移程度由 pH 决定。对于像氨基酸一类既有碱性也有酸性的化合物 (两性电解质), 两种作用都有。

因此, 两性电介质迁移的方向以及迁移的程度由 pH 决定, 根据分离的需要可以使用 pH 从 1—11 范围内的缓冲液。

在两个蓄水槽中的缓冲液一般是相同的, 用来饱和和支持介质, 但是, 在凝胶电泳中, 缓冲液是支持介质的一部分, 因此, 在凝胶中经常使用一种与缓冲液槽中不相同的缓冲液。这样能使电泳得到很好的分辨率。

(4) 支持介质

虽然使用了比较惰性的材料作为支持介质, 但是介质的精确结构对一种化合物的迁移率有很多影响, 而对介质的选择取决于所用的样品类型。

(1) 吸附:

正如吸附层析一样, 这是支持介质对样品分子的滞留作用。它导致了样品的拖尾, 使样品的移动像一个彗星, 不能形成一条很清晰的带, 因而降低了分离的分辨率。吸附也降低了总的迁移率。纸的吸附最大, 但使用醋酸纤维素实际上可以消除这种作用。

(2) 电渗 (电内渗):

这种现象是由缓冲液的水分子和支持介质的表面之间所产生的一种相关电荷引起的。由于支持介质中基团的电离作用以及对缓冲液离子的表面吸附作用, 通常由水分子产生水合氢离子 (H_3O^+)。由于这些离子是带正电荷的。因此它们带着溶解的中性物质移向阴极, 加速了阳离子的前进、而阻滞了阴离子的移动。这种作用一般可以忽略不计, 但是, 如果在测定化合物的等电点时, 这种作用必须被考虑, 一般通过对一种中性的分子 (如脲或葡萄糖) 进行电泳, 测定它们迁移的程度来决定。醋酸纤维素或聚丙烯酰胺凝胶的电渗作用没有纸或淀粉胶那么明显。

(3) 分子筛:

这是凝胶电泳的一个特性。在这种电泳中, 半刚性支持介质 (凝胶) 的分子筛特性有助于蛋白质一类不但在电泳移动率方面有所区别, 而且在大小、形状上也有所不同的大的离子化合物的分离。凝胶是由分布于整个凝胶的自由缠绕的分子链组成, 这些分子链使凝胶成为

一种筛样的结构。凝胶的孔径可以在一定的范围内有所不同，而使之适合于特殊的分析。琼脂、淀粉和聚丙烯酰胺凝胶的分子筛原理是，大分子的移动随凝胶中交联度的增加，孔径的减少，而阻力逐渐增加。如果使用 Sephadex 型的凝胶，情况正相反，因为它的特性对于小分子迁移的阻碍作用要比大分子来得大。

（二）纸上电泳和醋酸纤维素薄膜电泳

纸上电泳和醋酸纤维素薄膜电泳就是利用滤纸或醋酸纤维素薄膜作为支持物的电泳技术。

纸上电泳是在 1940 年前后和纸上层析一道发展起来的分离分析技术，由于它们都具有简便、迅速而且分离效果好等特点，到 50 年代已成为应用非常普遍的实验室方法，并在此基础上发展了一批类似的使用固相支持物薄膜的分离方法，醋酸纤维素薄膜电泳就是其中发展较早的一种常用技术。

纸上电泳所需的设备很简单：一个供给稳压直流电电源和一个简单的电泳槽。电泳槽通常由玻璃或有机玻璃等塑料制成，目前常用的是平卧式的电泳槽。它内部有两个分隔的缓冲液槽，分别装有铂丝或其它材料的电极。在这两缓冲液槽中间的上部有支架，供放置（平放）滤纸用，滤纸两端分别浸入两个槽内的缓冲液中。在电泳上部还有盖，以减少液体蒸发，有时还装有适当的冷却装置，以减轻电泳对发热所造成的影响。平卧式电泳槽不仅适用于纸上电泳，而且也适用于醋酸纤维素薄膜及其它类型薄膜电泳，此外，琼脂凝胶、淀粉凝胶等平板凝胶电泳也可以适用。

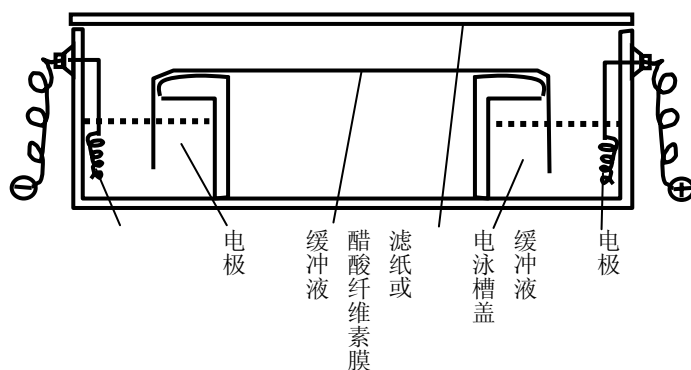


图 1-2 用于滤纸或醋酸纤维素薄膜电泳用的电泳槽

适用于纸上电泳及醋酸纤维素薄膜电泳的缓冲液种类很多，对于蛋白质电泳多采用巴比妥缓冲液。例如血清蛋白质的电泳常用 pH 8.6 的巴比妥缓冲液，浓度可在 0.05~0.1M 之间选用。浓度较高的缓冲能力较强，可以保证电泳过程中滤纸上缓冲液不因盐类的电解而姓过

份明显的影响，但因离子强度较高，电泳的速度较慢，需要的电泳时间较长。反之，浓度较低的缓冲能力较弱，在电泳过程中因 pH 值的变化较大可能影响电泳的效果，但它的离子强度较低，电泳速度较快，需要电泳时间较短，适于进行快速鉴定。

纸上电泳及醋酸纤维素薄膜电泳的基本过程包括如下几个步骤：

1、准备—将适当的缓冲液倾入电泳槽中，将滤纸或醋酸纤维素薄膜（经缓冲液湿润的）用铅笔在离一端一定距离处作好起点线记号后放在支架上，使滤纸两端或醋酸纤维素薄膜两端相连的滤纸桥浸入缓冲液中。将两电极接连电源（如果是用 pH 8.6 缓冲液分离血清蛋白质，起点线侧应接上负极）。

2、点样—用点样器或毛细管将样品点在起点线上，通常每个样品的加样宽度约 1~2 厘米，加样量约 10 微升（根据样品浓度不同而异，可通过试验确定）。

3、通电—点样后加盖，打开电源的开关，调节电压（或电流）达到要求的数值。通常电压可在 1~10 伏 / 厘米范围内选择，电流可在 0.2~2 毫安 / 厘米（宽）的范围内选择。对于纸上电泳应选择较低的电压（或电流），而醋酸纤维素薄膜电泳则可选择较高的电压或电流，因此纸上电泳的通电时间相应要长一些，而醋酸纤维素薄膜电泳则相应要短一些。加以后者的电渗和吸附能力小，分离效果好，可以用较短的电泳距离（即较短的电泳薄膜条），所以电泳时间可缩短到 0.5~1 小时。

4、染色—纸上电泳在染色前要先将滤纸条加热烘干，而醋酸纤维素薄膜则可直接进行染色，不必事先烘干。染色剂的种类很多，要根据实验材料及实验目的来选择。例如对于蛋白质，常用的染色剂溴酚蓝、氨基黑 10B（Amido black 10B）、考马斯亮蓝（Coomassie brilliant Blue）和丙酮红 S（Ponceau S）等，后几种的灵敏度较高，是醋酸纤维素薄膜电泳常用的显色剂。染色后通常要用适当漂洗液（例如 5% 醋酸）漂洗，经几次换漂洗液直到背景漂洗清楚为止。

5、定量—染色后，用剪刀将各蛋白色带剪开，另在空白部分剪下一条（宽度相当于几个色带的平均宽度）作为空白对照，分别将各条放入有 4ml 1.5% NaOH 液的试管中，轻轻振动到各管中色带的颜色溶入溶液后，以空白对照管作为空白进行比色，即可根据各管光密度值推算出各部分蛋白质的含量百分比。

对于醋酸纤维素薄膜电泳，还可以将干的薄膜条浸入新鲜配制透明液（3：7 比例混合的冰醋酸—无水乙醇溶液），经 10~20 分钟，贴在玻璃板上，干后即成透明薄膜，可直接用光密计读出各个色带的颜色深浅，进一步推算各种蛋白质的含量百分比。

对于脂蛋白、糖蛋白或核酸等，则可另选用适当的染色方法进行定量。

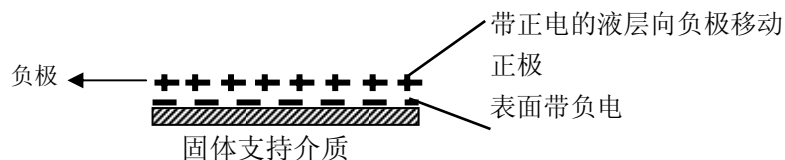
(三) 琼脂及琼脂糖凝胶电泳

琼脂糖是琼脂的主要成分，它的水溶液和琼脂一样可以制成凝胶，具有多孔网状结构，但它已除去含硫酸根的果胶成分，所以不象琼脂那样产生相当明显的电渗现象，电泳的效果更佳。

琼脂或琼脂糖凝胶电泳的基本原理和纸上电泳相同，只不过是固相支持物的材料不同。这类电泳因凝胶含水量大（98~99%），近似自由电泳，受固相支持物的影响较小，电泳速度快而且区带整齐，分辨率高，所以应用得也很为广泛。

这类凝胶电泳的基本过程和纸上电泳也很相似，只不过是要先配成 1~2% 溶液浇在玻璃板上制成凝胶板（琼脂糖的溶液浓度要低一些，0.5% 左右即可制得满意的凝胶板）。电泳所需的电流较大，可达到 2 毫安 / 厘米（宽）甚至更高些，而电泳时间可以缩短，通常在 1 小时左右即可以达到良好的分离。琼脂或琼脂糖凝胶电泳完毕后，凝胶板要先烘干再进行染色，为了避免在烘干过程中，各蛋白质区带可能因扩散而变得模糊，要用酒精醋酸固定液处理再进行烘干。至于染色、漂洗与定量等操作，基本上与纸上电泳或醋酸纤维素薄膜电泳相似，这里不再作详细介绍。

琼脂凝胶电泳和琼脂糖凝胶电泳的主要区别之一，就是琼脂凝胶有相当大的电渗作用。所谓电渗作用（electro-osmosis），如前所述，是指在电场影响下缓冲溶液缓慢地向一极移动的现象，这种现象的发生，就是由于琼脂的表面带有大量负电荷（酸根），而周围缓冲液中带正电荷的阳离子则受电场的影响而向负极移动，这种缓冲液的流动方向正好和蛋白质泳动的方向相反，使蛋白质的颗粒泳动过程有如“逆水行舟”，表现出来的泳动速度减慢，特别是对于泳动速度本来就是慢的蛋白质颗粒（如 γ -球蛋白），甚至会被缓冲液冲到起点的后面去，好象这些蛋白质向阴极泳动那样，而与其它颗粒向阳极移动的表现不同。这种电渗现象无疑要影响电泳的效果，降低分辨率，所以应用电渗作用弱的琼脂糖凝胶作支持物，电泳效果就会比琼脂凝胶好。

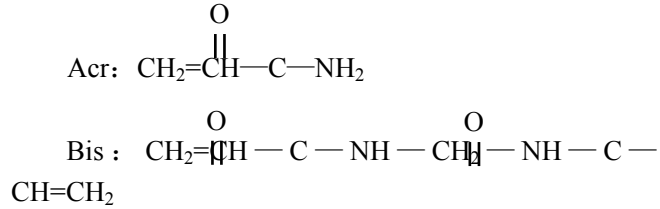


电渗作用图解

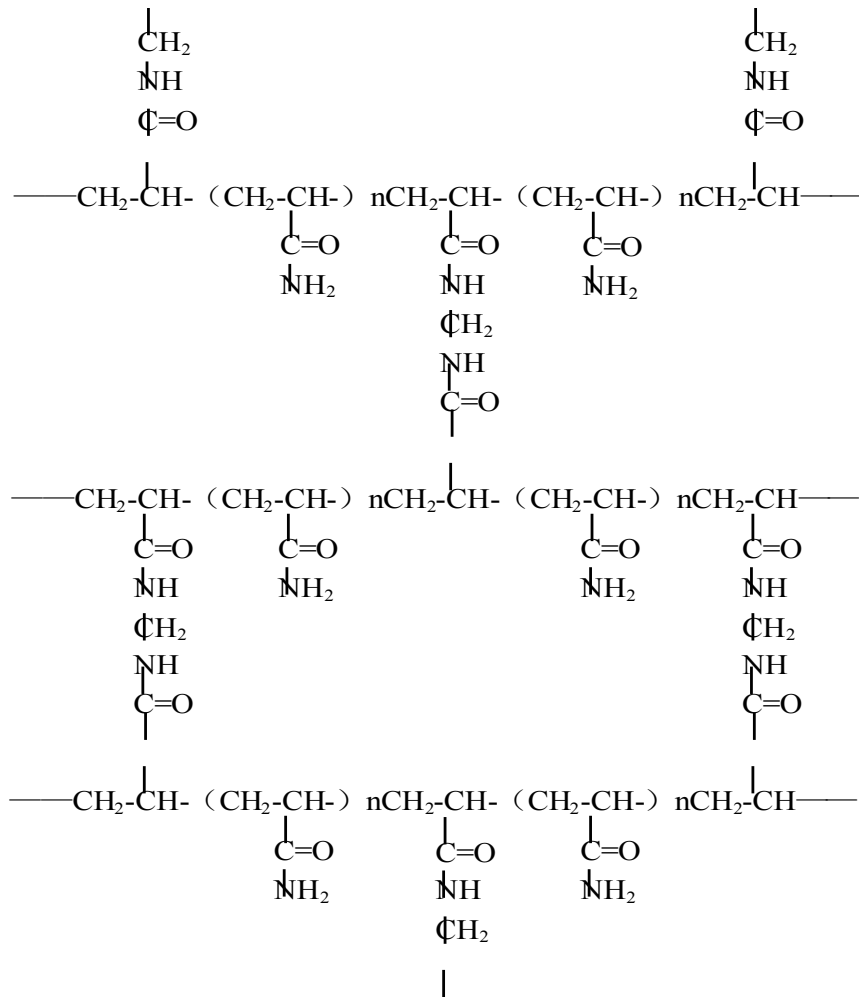
(四) 聚丙烯酰胺凝胶电泳

聚丙烯酰胺是丙烯酰胺和 N, N'-甲叉双丙烯酰胺的高分子聚合物。

单体丙烯酰胺 (acrylamide 简称 Acr) 及其交联剂 N, N'-甲叉双丙烯酰胺 (N, N'-methylene-bis-acrylamide, 简称 Bis) 的结构式是:



它们的聚合物有多孔的网状结构, 其网孔的大小可因单体及交联剂的浓度、比例以及聚合的条件不同而不同, 这些网孔对电泳时大分子物质的穿行产生一定阻力, 其阻力大小与大分子的大小、形状有关, 所以它具有有一定“分子筛”的作用, 从而使以它作支持物的电泳的分辨率得到提高。



聚丙烯酰胺凝胶和淀粉凝胶一样都有分子筛的作用,但聚丙烯酰胺凝胶的机械强度及化学稳定性好,可以人工控制网孔的大小以适应不同分离目的的要求。

聚丙烯酰胺凝胶电泳常用的方法是将凝胶装在玻璃管中垂直进行电泳,称为柱状电泳,但也可以铺成凝胶板,平卧或垂直进行电泳,称为板状电泳。

聚丙烯酰胺凝胶电泳可以和一般电泳那样采取缓冲液组成、pH 及孔径大小都均匀的介质这样的电泳方式称为“连续系统”(continuous system)的电泳,例如纸上电泳,醋酸纤维素薄膜电泳及琼脂凝胶电泳等都属于这类。但聚丙烯酰胺凝胶电泳还可以采用缓冲液组成、pH 和孔径都不均一的凝胶,这样的电泳方式称为“不连续系统”(discontinuous system)的电泳。它具有非常高的分辨率,在柱状电泳时每种蛋白质组分的色带非常狭窄,呈圆盘(disc)状,所以这类不连续系统柱状电泳亦称为盘状电泳(disc-electrophoresis),因为 disc 正好就是英文“不连续”这词的字头。目前,常用的聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAG 电泳)主要就是采用这种盘状电泳的技术。

盘状电泳所用的凝胶包括:(1)可利用凝胶分子筛效应及颗粒带有不同数量电荷的效应而达到分离目的凝胶层,称为分离胶(Separation gel)。这分离胶除了象普通电泳那样要有适合缓冲液 pH 值(通常为 pH 8~9),而且它的网孔较小以便发挥其分子筛效应来提高分辨率,所以这层凝胶层亦称为小孔胶(Smallpore gel)。(2)在分离胶前还要有可将样品中蛋白质压缩浓集成一扁层的凝胶层,称为浓缩胶(Stacking gel)。这层凝胶的网孔很大,分子筛效应极微,所以这层胶是大孔胶(Large-pore gel)。浓缩胶可以将样品压缩成扁的窄带,是盘状电泳具有高分辨率的重要原因,这种浓缩效应和凝胶的组成有密切关系。

浓缩胶除了网孔径与分离胶不同外,它的缓冲液组成及pH值也和分离胶不同,即缓冲液组成、pH和网孔孔径在这层凝胶中都是不连续的。浓缩胶的缓冲液pH值是偏酸的(pH 6.7),而且含有HCl和甘氨酸,HCl几乎完全电离成 Cl^- ,而甘氨酸因接近等电点而极少电离,这样在电场作用下, Cl^- 的泳动最快(先行离子),甘氨酸泳动最慢(随后离子),而样品中的蛋白质的泳动速度介于这两种离子之间。当 Cl^- 快速泳动时,在它的后面形成一个离子浓度低的低电导区,增大电位梯度,从而加速了蛋白质离子与甘氨酸离子的移动速度。就是这样,蛋白质离子就被这两种离子夹在中间迅速向前移动,浓缩成为一个薄层,直到遇到网孔小的分离胶为止。通过这种浓缩效应,可以使蛋白质浓缩好几百倍,集中到厚度仅为 10~100 微米的扁平区带中。在这区带中,由于各种蛋白质所带电荷不同,泳动速度不同,所以也是按一定顺序排列起来的。

当电泳过程继续进行,到达小孔分离胶界面后,蛋白质的泳动速度减慢,但甘氨酸的分

子量小就可以越过蛋白质而向前移动，而且由于分离胶的 pH 值偏碱，甘氨酸的电离能力增大，泳动速度大大超过蛋白质。所以在分离胶中上述浓缩效应即告消失，而是由电荷效应和分子筛效应进一步将各种蛋白质组分进行分离，完成电泳的分离过程。

盘状电泳的具体操作过程包括如下几个基本步骤：

1、仪器的准备—盘状电泳所用的电泳槽分为上下两槽，分别在中央装有铂丝电极，上槽底部开有若干安装凝胶的小孔。凝胶管一般采用内径 5~7 毫米，长为 8~10 厘米的管径均匀的玻璃管，两端用金钢砂磨平。

2、凝胶管的制备—首先将玻璃管下口用玻璃纸或其它材料封住，垂直固定在架上。然后按选择好的配方制备凝胶。制备凝胶除需要一定浓度的单体和交联剂外，还需要加入少量催化剂与加速剂。常用催化剂有两种：(1) 过硫酸铵，它能氧化单体生成游离基而促进聚合，这催化反应要在碱性及无氧条件下才易进行，所以要先将溶液减压除气再混合制胶；(2) 核黄素，它在光线照射下可产生游离基，促进聚合反应的进行。常用的加速剂是 N, N, N', N'-四甲基乙二胺 (N, N, N', N'-tetramethyl ethylene diamine, 简称为 TEMED)，也可以用 β -二甲基丙腈 (β -dimethylamino-propionitile, 简称 DMPN) 或三乙醇胺代替。制备凝胶柱时，首先将制分离胶的溶液除气混合好，迅速用滴管小心移入前面准备好的凝胶柱玻璃管内，再复以约 0.5 厘米的蒸馏水层 (隔绝空气并使胶面平整)，静置半~小时使聚合成凝胶。将蒸馏水吸弃后，再按同样方法再在分离胶上注入浓缩胶液 (约 1 厘米高的液柱，根据加样的容量大小而适当增减注入量)，上面再复以蒸馏水层。然后在日光灯下照射 (浓缩胶通常用核黄素作催化剂) 使凝胶聚合，凝胶柱即告制成，可用橡皮垫 (或橡皮塞) 将柱安装在上层电泳槽的底部小孔上，并使柱顶刚露出橡皮垫上。然后将凝胶柱插入盛有缓冲液的下电泳槽内。

3、加样—为了避免被缓冲液冲散，样品通常要用浓缩胶液 (以样品液代替其中的蔗糖液) 混合，按制备浓缩胶方式在浓缩胶层上面再铺制样品胶。也可以用分离胶的缓冲液和蔗糖将样品适当稀释和制成浓蔗糖液，这样加到浓缩胶面上也可以有效地防止样品的冲散。通常每根凝胶柱加样量为 10~100 微克蛋白质，而且要求加样液的离子强度要低，最好要和浓缩胶有相同的缓冲组成，pH 和离子强度，否则不能很好地发挥其浓缩效应，使分离的区带模糊和松散，得不到良好的分离效果。

4、通电—加样后将电极槽缓冲液小心放在样品层上 (也可以放缓冲液，然后用长注射器针小心将样品蔗糖注入缓冲液下面的凝胶面上)，并在上电泳槽中倾入适量电极槽缓冲液，使液体足以和盖上的铂丝电极接触。为了便于观察，还要向上槽缓冲液中加入少量溴酚蓝作

示踪指示剂。然后将电极接上电源，上槽接负极，下槽接正极。开始保持电流为每管约 1 毫安，待示踪染料进入浓缩胶并开始进入分离胶后，将电流增大到每管 2~3 毫安。待示踪染料将近到达凝胶管下口时，停止通电，切断电源。

5、剥胶—取下凝胶管，用带有长注射针头的注射器盛蒸馏水，将针头插入凝胶与管壁的间隙，边旋转玻璃管边慢慢沿管壁注入蒸馏水，使胶与管壁脱离，然后用压缩空气将凝胶条吹出。

6、固定和染色—取出的凝胶条迅速放入三氯醋酸溶液固定，然后再用适合的染色液染色，最后再用稀醋酸漂洗或进行电解脱色。也可以不经固定直接放入用三氯醋酸配置的染色液中进行染色如用考马斯蓝的三氯醋酸溶液染色，还可以经漂洗而得到清晰的染色带。最后凝胶条可放入稀醋酸浸泡保存。

盘状电泳不但分辨率高，而且灵敏度高，只要有蛋白质 1 微克甚至更少些即足以得到清晰可辨的一个染色带，因此它已成为目前生物大分子研究的重要方法之一。

聚丙烯酰胺凝胶电泳应用的另一种常见形式是直板型电泳，详见下篇。

此外，聚丙烯酰胺凝胶电泳由于其机械强度高和化学稳定性好，它还可以添加其它化合物而扩大电泳技术的应用范围。例如，添加去污剂十二烷基硫酸钠（简称 SDS），蛋白质因为和 SDS 结合而带有大量电荷而消除蛋白质原有的电荷量差别，其泳动速度便主要和分子大小有关，这种 SDS—聚丙烯酰胺电泳广泛应用来测定蛋白质的分子量。又如，添加人工合成的两性电解质混合物，通电后就可使这些两性电解质按等电点的不同而形成 pH 梯度，使各种蛋白质因等电点不同而分别聚集在其相应的 pH 区带中，即可以用于蛋白质的分离，也可用作蛋白质等电点的测定，这种技术就称为凝胶等电聚集电泳（Gel isoelectric focusing electrophoresis）。