

# 蛋白质电泳实验技术

郭尧君 编著

科学出版社

北京

## 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

印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

1999年2月第一版 开本:850×1168 1/32

2003年1月第四次印刷 印张:11 3/8

印数:8 601—10 600 字数:292 000

定价:23.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈北燕〉)

## 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研究所

郭尧君

1998. 4. 16

# 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 <i>N, N</i> -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 )
<b>第四章</b>	<b>常规聚丙烯酰胺凝胶电泳 .....</b>	<b>( 54 )</b>
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 )
<b>第五章</b>	<b>SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 .....</b>	<b>( 123 )</b>
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 )
<b>第六章</b>	<b>载体两性电解质 pH 梯度等电聚焦 .....</b>	<b>( 161 )</b>
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 )
<b>第七章</b>	<b>固相 pH 梯度等电聚焦 .....</b>	<b>( 214 )</b>
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 )
<b>第八章</b>	<b>双向电泳</b> .....	( 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	双向间的平衡和转移	(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)
<b>第九章</b>	<b>滴定曲线</b>	<b>(287)</b>
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)
<b>第十章</b>	<b>免疫电泳</b>	<b>(294)</b>
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 )
<b>第十一章</b>	<b>蛋白质印迹</b>	( 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 )
<b>第十二章</b>	<b>制备电泳</b> .....	( 339 )
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 )

# 第一章 电泳概论

什么是电泳？我想借用著名瑞典物理化学家，诺贝尔奖金获得者 Arne Tiselius 1959 年为 *Electrophoresis Theory, Methods, and Applications*<sup>[1]</sup> 一书所写的序中的定义——电泳是指荷电的胶体颗粒在电场中的移动。

在离子移动的物理化学理论中，按照 Debye-Hückel 的理论，电泳决定于环绕每个离子的离子雾中的扩散双电层。当离子的尺寸越大、溶液的离子强度越高时，这种电泳现象就变得越明显。所以电泳现象中的表面电势和双电层的因素起着决定性的作用。Picton 和 Linder<sup>[2,3]</sup>、Hardy<sup>[4,5,6]</sup>、Ellis<sup>[7]</sup> 和 Powis<sup>[8]</sup> 的早期研究证明了这一点。Hardy<sup>[4,5,6]</sup> 发现，许多生物胶体，如蛋白质、酶等有特征的电泳迁移率（electrophoretic mobility）。此迁移率在很大程度上取决于溶液的 pH。因此利用这种电泳特征作为对物质的鉴定引起人们广泛的兴趣。特别在那个时候，关于蛋白质和酶的化学本质和物理性质还知道得不多。以后，电泳不仅作为一种现象，而且作为一种技术方法得到不断发展。从界面分离到各种区带电泳，开辟了混合物的电泳分析的可能性。由于电泳性质的高度特异性，甚至用结晶纯化的样品也可在电泳分析中分出两个或更多的电泳带。又由于电泳方法的温和性，对不稳定的生物大分子的分离纯化有时比其他分离技术如沉淀、离心、层析等更为方便、可靠，甚至可作为具有一定规模的制备方法。

Tiselius 教授<sup>[1]</sup> 在他的序中最后提到：电泳方法的发展及其应用是物理方法在生物化学和生物学问题的应用中的一个具有成果的不平常的范例。希望将来的发展是由不同科学领域间密切合作而获得益处。尽管很多工作仍待进行，但电泳鼻祖的这段结论与希望正在得到证实和实现。

## 1.1 电泳的早期历史

1809年，俄国物理学家 Reuß<sup>[9]</sup>进行了世界上第一次电泳实验。他用两根玻璃管插入一块湿粘土中，容器灌满水，管底放一层沙，然后封闭起来并通电。其结果是连接阳极的管中的水由于胶体粘土颗粒通过沙层的电泳迁移而变得混浊，而连接阴极的管中的水变得清澈，并且增加了体积，显示了电渗透现象。这个早期实验为电泳理论和技术的发展及其应用奠定了基础。

1816年 Porrett<sup>[10]</sup>在电泳实验中首次使用荷电的动物膜蛋白，为电泳在生物学中的应用打开了大门。在同一世纪，Hardy<sup>[4]</sup>报道了带有负电的变性卵白蛋白可以通过加酸而变成带正电，增加酸的浓度在迁移率变成零时的 pH 即为等电点，揭示了这些颗粒具有两性表面。Quincke<sup>[11]</sup>证实了带电颗粒在电场中的迁移与电位梯度成线性关系。Helmholtz<sup>[12]</sup>和 Smoluchowski<sup>[13]</sup>则用复杂的公式计算认为这些颗粒具有光滑的表面和不均匀的电荷分布。

首先使用 V 型槽和 U 型管槽的是 Picton 和 Linder<sup>[2,3]</sup>。他们研究了  $As_2S_3$ 、虫胶片 (shellac)、高铁水合物、血红蛋白和一些胶体颗粒的电流方向和酸碱特性的相互关系。通过电流方向的变化证实了它们的两性现象的可逆性。1909年 Michaelis<sup>[14]</sup>把胶体离子在电场中的迁移定名为“电泳”。他在 U 型管槽中通过在不同 pH 的迁移速度测定了转移酶和催化酶的等电点，甚至想纯化这些物质，但在那时还不可能。Abramson<sup>[15]</sup>和 Michaelis 一起<sup>[16]</sup>用多个实验观察了由蛋白膜包裹的显微颗粒的尺寸、形状和方向对电泳迁移率的影响。他们发现，即使它们在形状、尺寸上有很大的变化，也不能观察到电泳迁移率的差别，但电泳对检测病毒、细菌、精子、细胞表面的生物处理或化学处理引起的变化是一个很灵敏的技术。经突变或化学处理颗粒的表面，其电荷密度的不同用显微镜或移动界面电泳法都能被分辨。

20 世纪的 20 年代和 30 年代，电泳理论和实践有了很大的发展。瑞典乌普萨拉 (Uppsala) 大学的物理化学教授 Svedberg 和他的同事 Jette<sup>[17]</sup>、Scott<sup>[18]</sup> 利用在长波紫外光激发时蛋白质发绿色荧光的现象，在电泳过程中，对卵白蛋白进行照相。考虑到荧光污染和需要长时间曝光的困难，Svedberg 教授和他的学生 Tiselius<sup>[19]</sup> 使用了光学方法观察卵白蛋白的电泳迁移过程，以便直接测量感光板上电泳带的迁移距离。以后这个装置又由

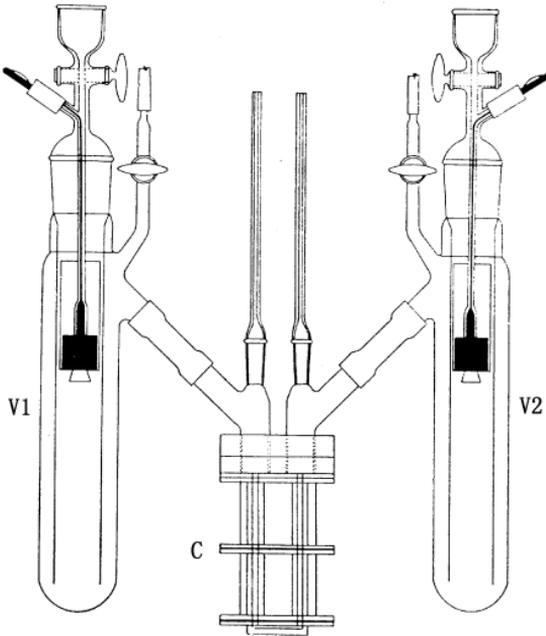


图1.1 Tiselius 电泳槽(C)和电极(V1 和 V2)<sup>[20]</sup>

Tiselius 教授修改 (见图1.1)<sup>[20]</sup>。他用这个装置首先证明了血清是由白蛋白， $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$  球蛋白组成的<sup>[20]</sup>。为此他在 1948 年荣获了诺贝尔奖。移动界面电泳方法是用一个 U 形玻璃管，在 U 形管的下面部分放胶体溶液，如蛋白溶液。U 形管的管臂连接到电极上，这样在已知电位梯度的影响下，缓冲系统中蛋白质界面的移动就能被观察到。Tiselius 把 U 形管分成几个部分，每个部

分填以研碎的玻璃珠 (ground glass joints)。当一定组分的蛋白质移到 U 形管的特定位置时, 此组分就被分离。Tiselius 装置中最重要的改进是利用叫做“纹影法 (schlieren)”或“阴影照相法 (shadow)”来观察蛋白质界面的移动。当光束通过一个具有不同折射指数的两种液体的界面时, 光就被折射到具有比较大折射指数的液体侧。蛋白质和缓冲液具有不同的折射指数, 并且这种差异与蛋白质浓度成比例, 因此蛋白质和缓冲液的界面将是不透明的, 界面的位置就能呈现一条黑带而准确地定位在玻璃底板上。虽然纹影黑带的垂直宽度是与蛋白质浓度成正比, 但在那时还不能准确计算蛋白质的浓度。为了准确定量, 以后又由 Philpot<sup>[21]</sup> 和 Svensson<sup>[22]</sup> 改进为圆柱形透镜系统和 Longsworth<sup>[23~24]</sup> 的扫描方法。

人血清蛋白用界面移动方法分离的最佳条件是 0.1 mol/L (pH 8.6) 的巴比妥缓冲液。此时白蛋白具有最快的迁移速度, 接着是  $\alpha_1$ 、 $\alpha_2$ 、 $\beta$  和  $\gamma$  球蛋白<sup>[24~27]</sup>。健康人群的血清蛋白的组成比例是白蛋白 56%~62%;  $\alpha_1$ -球蛋白 4%~7%;  $\alpha_2$ -球蛋白 9%~11%;  $\beta$ -球蛋白 11%~15%;  $\gamma$ -球蛋白 12%~16%<sup>[27~29]</sup>。这些组分有时可能与别的分子结合, 如白蛋白可能与胆红素、胆汁盐等结合。 $\alpha_1$ -球蛋白中可能含有酸性糖蛋白、胆红素球蛋白和脂蛋白等。 $\alpha_2$ -球蛋白中含有糖蛋白以及和碳水化合物结合的粘蛋白。 $\beta$ -球蛋白占血浆中所有脂的 75%。在  $\beta_1$ -球蛋白中有结合金属的铁和铜蛋白。一些抗原和  $\beta_2$ -球蛋白结合。 $\gamma$ -球蛋白的组分中可能含有抗原、抗毒血清、抗体和过敏反应素等。

移动界面电泳技术的应用使解决生理学和医学问题达到了一个新的水平, 并且改变了许多陈旧的概念, 使与蛋白有关的研究得到了极好的结果。尽管在 50 年代以后电泳方法开始使用固体介质, 但这无碍于我们回顾在将近 200 年来为此技术做出贡献的杰出的物理学家、化学家、物理化学学家和生理学家们。

表 1.1 早期电泳技术和装置的发展历史

作 者	年 代	贡 献
Reüss <sup>[9]</sup>	1809	第一次电泳实验
Porrett <sup>[10]</sup>	1816	首次使用荷电的包有膜的动物蛋白
Quincke <sup>[11]</sup>	1861	证实带电颗粒的迁移与电位梯度成线性关系
Helmholtz <sup>[12]</sup>	1879	用公式计算颗粒表面的电荷分布
Picton 和 Linder <sup>[2,3]</sup>	1892~1897	首先使用 V 型池和 U 型管池
Hardy <sup>[4]</sup>	1899	揭示了颗粒的两性表面和卵白蛋白的等电点
Smoluchowski <sup>[13]</sup>	1903	用公式计算颗粒表面的电荷分布
Michaelis <sup>[14]</sup>	1909	测定了酶的等电点和胶体离子在电泳中的迁移
Ellis <sup>[7]</sup>	1912	观察电泳迁移
Powis <sup>[8]</sup>	1915	观察电泳迁移
Svedberg <sup>[17,18]</sup>	1923~1924	在电泳时对白蛋白荧光照相
Abramson <sup>[15,16]</sup>	1934	电泳迁移和颗粒的形状和尺寸无关
Tiselius <sup>[20]</sup>	1937	移动界面方法和将血清分离成血清白蛋白和球蛋白
Philpot <sup>[21]</sup>	1938	使用圆柱形透镜系统
Svensson <sup>[22]</sup>	1939	使用圆柱形透镜系统
Longworth <sup>[23,24]</sup>	1939~1942	扫描方法
Longworth <sup>[30]</sup>	1946	利用红外线
Kegeles 和 Gosting <sup>[31]</sup>	1947	使用 Gouy 光学系统
Labhart 和 Staub <sup>[32]</sup>	1947	微电泳
Coulson 等 <sup>[33]</sup>	1948	用低浓度溶液
Moore 和 White <sup>[34]</sup>	1948	使用折叠光学系统
Lotmar <sup>[35]</sup>	1949	微电泳
Reiner 等 <sup>[36]</sup>	1950	使用折叠光学系统

## 1.2 电泳的简单原理

生物大分子如蛋白质、核酸、多糖等常以颗粒分散在溶液中，它们的净电荷取决于介质的  $H^+$  浓度或与其他大分子的相互作用。在电场中，带电颗粒向阴极或阳极迁移，迁移的方向取决于它们带电的符号，这种迁移现象即谓电泳。迁移的方式目前可以分为三类：根据分子尺寸大小和形状、分子所带的电荷或分子的生物学与化学特性。

如果把生物大分子的胶体溶液放在一个没有干扰的电场中，使颗粒具有恒定迁移速率的驱动力来自于颗粒上的有效电荷  $Q$  和电位梯度  $E$ 。它们与介质的摩擦阻力  $f$  抗衡。在自由溶液中，这种抗衡服从斯托克斯定律 (Stokes' Law)。

$$f = 6\pi r v \eta$$

这里  $v$  是在介质粘度为  $\eta$  中半径为  $r$  的颗粒的移动速度。但在凝胶中，这种抗衡并不完全符合斯托克斯定律。 $f$  还取决于介质中的其他因子，如凝胶厚度、颗粒尺寸、甚至介质的内渗等<sup>[37]</sup>。

电泳迁移率 (mobility)  $\mu$  规定为在电场强度  $E$  的影响下，颗粒在时间  $t$  中的迁移距离  $d$ 。

$$\mu = \frac{d}{t \cdot E}$$

或

$$\mu = V/E$$

这个参数的单位是  $cm^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$ 。它的符号决定于颗粒的净电荷。迁移率的不同提供了从混合物中分离物质的基础，迁移距离正比于迁移率。但在不同实验中，迁移距离或迁移率的比较只能在  $t$  和  $E$  都相同的条件下才能进行。理想的情况是如果其他条件都相同，则第二个实验用第一个实验的双倍电压和一半时间时，迁移距离  $d$  应该相等，但实际上只可能是大致相等，因为还有其他因素的干扰，如由于增加电压而产生的热等影响。但是

用这两个因子的乘积可用于很快地寻找电泳分离的最佳条件。所以电泳的电源采用“伏·小时”而不单纯采用“小时”作为电泳参数是可取的。

电场强度  $E$ 、电流密度  $J$  和导电性  $K$  有关，所以带电颗粒的移动速度也能表示为：

$$V = E \cdot m = m \cdot J / K$$

大部分的生物大分子都有阳离子和阴离子基团，称为两性离子。这些基团的解离常数不同，所以大分子的净电荷取决于环境的 pH。且其 pH 将影响分子的迁移率。离子强度则决定大分子颗粒的电动电位，带电颗粒的迁移率与离子强度的平方根成反比。低离子强度时，迁移速率快。高离子强度时，迁移速率慢，但电泳谱带要比低离子强度时细窄<sup>[37]</sup>。缓冲液的 pH 和离子强度的选择是很重要的，它们对电泳参数的设置考虑将起关键的作用。

电泳是离子在电场中通过介质的移动，但以上讨论的一些因子都将影响各种形式的电泳。不管是在自由溶液中的移动界面电泳或有支持介质（如淀粉、聚丙烯酰胺、醋酸纤维素、纸）的电泳，特别在用支持介质时，有更多的因素影响迁移率和分离带的细窄程度，包括支持介质的吸附效应、材料的不均一性以及支持介质分子本身带电基团的离子交换和电内渗等。

从以上可以看到电泳的基本原理是很简单的，但是由于带电颗粒在电场中通过介质的迁移要受很多因素的制约而变得复杂。但也正因为这些不同因素的制约，能使电泳技术应用于不同的研究中。如分子的大小是一个重要影响因素，所以 SDS 电泳能用于测定生物大分子的分子量。再如阴离子基团和阳离子基团的平衡使分子的净电荷等于零，据此用等电聚焦技术可以分离不同等电点的蛋白质。所以根据电泳的原理和影响因素可以设计不同的电泳方法以达到预期的目的。

### 1.3 电泳的大致分类

原则上按电泳的原理来分，现在有三种形式的电泳分离系统：即移动界面电泳（moving boundary electrophoresis）、区带电泳（zone electrophoresis）和稳态电泳（steady state electrophoresis）或称置换（排代）电泳（displacement electrophoresis）。

在自由移动界面电泳中，电场是加在大分子溶液和缓冲溶液之间的一个非常窄的界面上。带电分子的移动速率通过观察界面的移动来测定。如果大分子的离子溶液是不均一的，就能观察到多个移动的界面。缓冲液的选择是很重要的，它必须与大分子的离子溶液形成鲜明的界面。要准确测量界面的移动，还必须使界面两边的电场和 pH 大体恒定，电泳过程中在电极上不产生气泡，而电泳过程中产生的焦耳热借对流循环可以不扰动界面。对界面的移动备有观察和照相设备。图1.1所示的 Tiselius 电泳槽正是进行自由移动界面电泳的最理想的设备。

区带电泳是在半固相或胶状介质上加一个点或一薄层样品溶液，然后加电场，分子在支持介质上或支持介质中迁移。支持介质的作用主要是为了防止机械干扰和由于温度变化以及大分子溶液的高密度而产生的对流。但是支持介质有时会吸附不同分子或起分子筛作用（层析效应）而对分离起破坏或帮助的作用。区带电泳使用不同的支持介质，早期有滤纸、玻璃珠、淀粉粒、纤维素粉、海砂、海绵、聚氯乙烯树脂；以后有淀粉凝胶、琼脂凝胶、醋酸纤维素膜，现在则多用聚丙烯酰胺和琼脂糖凝胶。

80年代末发展起来的毛细管电泳（capillary electrophoresis）是一种新型的区带电泳方法，又称毛细管区带电泳（capillary zone electrophoresis）。它是在毛细管中装入缓冲液，在其一端注入样品，在毛细管两端加直流高电压实现对样品的分离，分离后的样品依次通过设在毛细管一端的检测器检出。

稳态电泳或称置换电泳的特点是分子颗粒的电泳迁移在一定

时间后达到一个稳态。在稳态达到后，带的宽度不随时间而变化，等电聚焦和等速电泳应该是属于这一类<sup>[38]</sup>。

## 1.4 凝胶电泳技术的历史

从 19 世纪初到 20 世纪中的 150 年中，早期电泳技术虽然得到了发展，但从 20 世纪 50 年代后，使用凝胶作为支持介质的电泳技术得到了更快地发展和应用，见表 1.2。

表 1.2 凝胶电泳技术的发展历史

作 者	年 代	内 容
Svesson H. <sup>[39]</sup>	1948	提出 pH 梯度理论
Grabar P. 和 Williams C.A. <sup>[40]</sup>	1953	免疫电泳
Kolin A. <sup>[41~44]</sup>	1954~1958	人工 pH 梯度
Raymond S. 和 Weintraub L. <sup>[45]</sup>	1959	使用聚丙烯酰胺作为电泳支持介质
Svesson H. <sup>[46]</sup>	1961	载体两性电解质的理论基础
Hjerf n S. <sup>[47]</sup>	1962	$T$ 和 $C$ 的计算公式
Hjerf n S. <sup>[48]</sup>	1963	不连续电泳
Fazekas de st 等 <sup>[49]</sup>	1963	考马斯亮蓝染色(用于纸、琼脂等)
Orenstein L. <sup>[50]</sup>	1964	不连续电泳
Davis B.J. <sup>[51]</sup>	1964	不连续电泳
Vesterberg O. <sup>[52]</sup>	1964	合成载体两性电解质
Ferguson K.A. <sup>[53]</sup>	1964	Ferguson 作图法(用于淀粉凝胶)
Meyer T.S. 等 <sup>[54]</sup>	1965	考马斯亮蓝染色(用于聚丙烯酰胺凝胶)
瑞典 LKB 公司 <sup>[55]</sup>	1966	Ampholine 专利
Shapiro A.L. 等 <sup>[56]</sup>	1967	SDS 电泳
Hedrick J.L. 等 <sup>[57]</sup>	1968	Ferguson 作图法(用于聚丙烯酰胺凝胶)

续表

作 者	年 代	内 容
Clarke M. H. G. 等 <sup>[58]</sup>	1968	交叉免疫电泳
Weber K. 和 Osborn M. <sup>[59]</sup>	1969	SDS 电泳技术的改进
Laemmli U. K. <sup>[60]</sup>	1970	不连续 SDS 电泳
Laurell C. B. 等 <sup>[61]</sup>	1972	火箭电泳
瑞典 LKB 公司 <sup>[62]</sup>	1973	水平电泳槽 Multiphor I
Rilbe H. <sup>[63]</sup>	1973	等电聚焦分辨率公式
O'Farrell P. <sup>[64]</sup>	1975	ISO-DALT 双向电泳
Southern E. <sup>[65]</sup>	1975	Southern 印迹法(DNA)
Gasparic V. 等 <sup>[66]</sup>	1975~1981	Immobiline 合成专利
Rosengren A. 等 <sup>[67]</sup>	1976~1977	滴定曲线
Towbin H. 等 <sup>[68]</sup>	1979	Western 印迹法(蛋白质)
Switzer R. C. <sup>[69]</sup>	1979	银染色
Merril C. R. 等 <sup>[70]</sup>	1979	银染色
Oakley B. R. 等 <sup>[71]</sup>	1980	银染色
Bjellqvist B. 等 <sup>[72]</sup>	1982	固相 pH 梯度技术
Görg A. 等 <sup>[73]</sup>	1985	IPG-DALT 双向电泳
Mocremans M. 等 <sup>[74]</sup>	1985	金染色
瑞典 Pharmacia 公司 <sup>[75]</sup>	1986	半干技术

## 参 考 文 献

- [1] Bier M. Electrophoresis Theory: Methods And Application. New York. Academic Press, 1959 XV ~ XX
- [2] Picton H Linder S E. J. Chem. Soc., 1892 (61): 148
- [3] Picton H, Linder S E. J. Chem. Soc., 1897 (71): 568
- [4] Hardy W B. Physiol J. (London), 1899 (24): 288
- [5] Hardy W B. Proc. Roy. Soc., 1900 (66): 110
- [6] Hardy W B. Physiol J. (London), 1905 (33): 251
- [7] Ellis R, Physik Z. Chem. (Leipzig), 1912 (80): 597

- [8] Powis F. *Physik Z. Chem. (Leipzig)*, 1915 (89): 186
- [9] Reüss F F. *Mem. Soc. Imperiale Naturalistes Moskau*, 1809 (2): 327
- [10] Porrett R. *Ann. Philos.*, 1861 (74): 25
- [11] Quincke G. *Pogg. Ann.*, 1861 (113): 513
- [12] Helmholtz H. *Wied. Ann.*, 1879 (7): 337
- [13] Smoluchowski M. *Bull. Acad. Sci. Cracovie*, 1903 (182): 66
- [14] Michaelis L. *Biochem. Z.*, 1909 (16): 81
- [15] Abramson H A. *Electrokinetic Phenomena*. Reinhold. New York. 1934. 267
- [16] Abramson H A, Michaelis L. *J. Gen. Physiol.*, 1929 (12): 587
- [17] Svedberg T, Jette E R. *J. Am. Chem. Soc.*, 1923 (45): 954
- [18] Scott N D, Svedberg T. *J. Am. Chem. Soc.*, 1924 (46): 2700
- [19] Svedberg T, Tiselius A. *J. Am. Chem. Soc.*, 1926 (48): 2272
- [20] Tiselius A. *Trans. Faraday Soc.*, 1937 (33): 524
- [21] Philpot J S L. *Nature*, 1938 (141): 283
- [22] Svensson H. *Kolloid Z.*, 1939 (87): 181
- [23] Longworth L G. *J. Am. Chem. Soc.*, 1939 (61): 529
- [24] Longworth L G. *Chem. Rev.*, 1942 (30): 323
- [25] Armstrong S H, Jr Budka M J E, Morrison K C. *J. Am. Chem. Soc.*, 1947 (69): 416
- [26] Ricketts W E, Sterling K. *J. Clin. Invest.*, 1949 (28): 1477
- [27] Marrack J R, Hoch H. *J. Clin. Pathol.*, 1949 (2): 161
- [28] Cooper G R, Craig H W, Beard J W. *Am. J. Syph. Gonorrhea Vener. Dis.*, 1946 (30): 555
- [29] Reiner M. *Int. Rec. Med.*, 1957 (170): 374
- [30] Longworth L G. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, 1946 (18): 219
- [31] Kegeles G, Gosting L J. *J. Am. Chem. Soc.*, 1947 (69): 2516
- [32] Labhart H, Staub H. *Helv. Chim. Acta*, 1947 (30): 1954
- [33] Coulson C A, Cox J T, Ogston A G, Philpot J S L. *Proc. R. Soc. London. A* 1949 (192): 382
- [34] Moore D H, White J U. *Rev. Sci. Instrum.*, 1948 (19): 700
- [35] Lotmar W. *Helv. Chim. Acta.*, 1949 (32): 1847
- [36] Reiner M, Fenichel R L, Stern K G. *Acta Haematol.*, 1950 (3): 202
- [37] MAURER H. R. *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 1968. 349, 115
- [38] Gaál ö, Medgyesi G A, Vereczkey L. *Electrophoresis in the Separation of Biological Macro molecules*. New York: John Wiley & Sons. Chichester. 1980. 18

- [39] Svensson H. In: *Advances in Protein Chemistry*; Anson, M. L. and Edsall, J. T. eds. (Academic Press, New York) Vol. IV, 1948; 251
- [40] Grabar P, Williams C A Jr. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1953 (10); 193
- [41] Kolin A. J. *Chem. Phys.*, 1954 (22); 1628
- [42] Kolin A. J. *Chem. Phys.*, 1955 (23); 407
- [43] Kolin A. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, 1955 (41); 101
- [44] Kolin A. In: *Methods of Biochemical Analysis*; Glick, D., ed (Wiley, Interscience, New York) Vol. 1958 (6); 259~288
- [45] Raymond S, Weintraub L. *Science*, 1959 (130); 711
- [46] Svensson. II. *Acta Chem. Scand*, 1961 (15); 325~341
- [47] Hjerten S.; *Arch. Biochem. Biophys. Suppl.*, 1962 (1); 147
- [48] Hjerten S.; *J. Chromatog.* 1963, (11); 66
- [49] Fazekas de St. Groth, S Webster, R G, Datyner. A. *Biochim. Biophys. Acta (Amst.)*, 1963 (71); 377
- [50] Ornstein L. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1964 (121); 321
- [51] Davis B J. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1964 (121); 404
- [52] Righetti P G. *Isoelectric Focusing: Theory, Methodology and Applications*. Elsevier, Amsterdam. 1983. preface
- [53] Ferguson K A. *Metabolism*, 1964 (13); 985
- [54] Meyer T S, Lamberts B L. *Biochim. Biophys. Acta (Amst.)* 1965 (107); 144
- [55] Righetti P G. *Isoelectric Focusing: Theory, Methodology and Applications*. Elsevier, Amsterdam. 1983. 33
- [56] Shapiro A L, Vinuela E, Maizel J V, Jr *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1967 (28); 815
- [57] Hedrick J L and Smith A J. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1968 (126); 155
- [58] Clarke M H G & Freeman T. *Clin. Sci.*, 1968 (35); 403
- [59] Weber K, Osborn M J. *Biol. Chem.*, 1969 (244); 4406
- [60] Laemmli U K. *Nature*, 1970 (227); 680
- [61] Laurell C B, *Scand J Clin. Lab. Invest.* 29. *Suppl.*, 1972 (124); 21~37
- [62] LKB Catalogue. LKB Producter AB Sweden Stockholm, 1973
- [63] Rilbe H, *Ann N Y, Acad. Sci.*, 1973 (209); 11~22
- [64] O'Farrell P. J. *Biol. Chem.*, 1975 (250); 4007~4021
- [65] Southern E; *J. Mol. Biol.*, 1975 (98); 503~517
- [66] Gasparic V, Bjellqvist B, Rosengren A. Swedish patent 140 49 - 1 (1975), US patent 4, 130, 470 (1978), French patent 7637402 (1980), British patent 1570698 (granted) and German patent 2656162 (1981)

- [67] Rosengren A, Bjellqvist B, Gasparic V. In: *Electrofocusing and Isotachopheresis*; Radola, B. J. and Graesslin, D., eds. (de Gruyter, Berlin) 1977. 165~171
- [68] Towbin H, Staehelin T, Gordon G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979 (76): 4350~4354
- [69] Switzer R C, Merrill C R, Shifrin. S. *Anal. Biochem.* 1979 (98): 231
- [70] Merrill C R, Switzer R C, Van Keuren M L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979 (76): 4335~4339
- [71] Oakley B R, Kirsch D R, Morris N R. *Anal. Biochem.*, 1980 (105): 361
- [72] Bjellqvist B, Ek K, Righetti P G, Gianazza E, Görg A, Westermeier R, Postel W. *J. Biochem. Biophys. Methods* 1982 (6): 317~339
- [73] Görg A, Postel W, Günther S et al. *Electrophoresis* 1985 (6): 599~604
- [74] Moeremans M, Daneels G et al. *Anal Biochem.*, 1985 (145): 315~321
- [75] "Phast System<sup>TM</sup> Owners Manual" Pharmacia AB. Uppsala, Sweden. 1986

## 第二章 凝胶电泳的支持介质

电泳的早期形式，即在自由溶液中进行的移动界面电泳已成为历史，代之以采用支持介质（或称稳定介质）的区带电泳现在被广泛地使用。采用支持介质的目的是防止电泳过程中的对流和扩散，以使被分离的成分得到最大分辨率的分离。为此，支持介质应具备以下特性：化学惰性；不干扰大分子的电泳过程；化学稳定性好，均匀；重复性好；电内渗小等。

固体支持介质可以分为两类：一类是如纸、醋酸纤维素薄膜、硅胶、矾土、纤维素等。这些介质相对来说是化学惰性的，能将对流减到最小，使用这些支持介质进行蛋白质分离和在自由溶液中一样是基于 pH 环境中的蛋白质的电荷密度。但在有些情况下，它们也会与迁移颗粒发生相互作用而参与分离过程。另一类是淀粉、琼脂糖和聚丙烯酰胺凝胶。与上述相比，这些凝胶不仅能防止对流，把扩散减到最小，而且它们是多孔介质，孔径尺寸和生物大分子具有相似的数量级，因而具有分子筛效应。使用这些凝胶进行分离不仅取决于大分子的电荷密度，还取决于分子尺寸。如具有相同电荷密度和不同尺寸的两种蛋白质使用纸电泳不可能分离好，而使用梯度凝胶电泳来分离，由于分子筛效应，小分子会比大分子跑得快而使分辨率提高。为此第一类支持介质现在已被第二类支持介质所代替，而淀粉凝胶又由于其批号之间的质量相差甚大，很难得到重复的电泳结果，且胶层厚、分辨率低、电泳时间长、操作麻烦，实验室中已很少使用。琼脂糖凝胶孔径较大，对大部分蛋白质只有很小的筛效应。自从 1959 年 Raymond 和 Weintraub<sup>[1]</sup>首次使用聚丙烯酰胺作为电泳的支持介质，特别是 1964 年 Ornstein<sup>[2]</sup>和 Davis<sup>[3]</sup>发表他们有关的基础工作以来，聚丙烯酰胺已成为目前生化实验室最常用的支持介质。

由于它的高分辨率，不仅能分离含有各种大分子物质的混合物，而且可以研究生物大分子的特性，诸如电荷、分子量、等电点以至于构象。可以说它是电泳过程中的“雷锋”，起了铺路石子的作用。

## 2.1 聚丙烯酰胺凝胶的形成和结构

聚丙烯酰胺凝胶 (polyacrylamide gel, PAG) 是由丙烯酰胺 (acrylamide) 和交联试剂  $N, N'$ -甲叉双丙烯酰胺 ( $N, N'$ -methylenebisacrylamide) 在有引发剂和增速剂的情况下聚合而成的。丙烯酰胺的单体形成长链，由  $N, N'$ -甲叉双丙烯酰胺的双功能基团和链末端的自由功能基团反应而发生交联。聚丙烯酰胺凝胶的化学结构式和三维网状结构见图 2.1<sup>[4]</sup> 和图 2.2<sup>[5]</sup>，两个单体的物理化学特性见表 2.1。

表 2.1 丙烯酰胺和  $N, N'$ -甲叉双丙烯酰胺的物理化学特性

特 性	丙 烯 酰 胺	$N, N'$ -甲叉双丙烯酰胺
分子式	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$	$(\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH})_2\text{CH}_2$
分子量	71.08	154.17
外 观	白色结晶粉末	白色结晶粉末
气 味	无	无
pH	>5(5%水溶液)	>5(2.5%水溶液)
可溶性 (g·ml <sup>-1</sup> , 30℃)	2.0(水) 1.1(甲醇) 0.4(丙酮) 0.4(氯仿)	0.31(水)
熔点或沸点℃	84.5±0.3	185(聚合时)
密度(D <sub>4</sub> <sup>30</sup> )	1.122	—
保存要求	密封、避光	冷、密封、避光
毒性	中枢神经毒物	中枢神经毒物