

区 带 电 泳 技 术* (一)

兰州生物制品研究所生化组

前 言

众所熟知,带有电荷的胶粒或分子在电场作用下,向阳极或阴极移动的现象,称为电泳。如果带电胶粒或分子的多种成份,在某种固态介质上经过电泳,由于各自的迁移速度不同,被分离于不同的区带,从而达到分析、制备的目的,这种实验技术就叫做区带电泳。

早在 1907 年,有人曾以琼脂凝胶为介质,研究白喉毒素和抗毒素的迁移特性。1923 年,也曾有人以琼脂电泳法研究无机元素的分离。1937 年,出现了 Tiselius 界面电泳仪,并将正常人血清分离为白蛋白(Alb)、甲球蛋白(α_1)、甲球蛋白(α_2)、乙球蛋白(β)及丙球蛋白(γ)等五个组份,这种分类命名法至今仍然沿用。1948 年以来,以滤纸、淀粉及其凝胶、醋酸纤维素膜、聚丙烯酰胺凝胶、葡聚糖凝胶等为介质的区带电泳法,各种不同类型的电泳装置,相继涌现和发展,在国内外得到迅速推广和应用。

本文仅就我们工作中的初步实践,着重对分辨率较好的醋酸纤维素膜电泳、淀粉凝胶电泳和聚丙烯酰胺盘电泳等实验方法分别简述,并对其他有关技术以及区带电泳在临床和免疫生化工作中的应用作简要介绍。

一、区带电泳的基本原理及主要类型

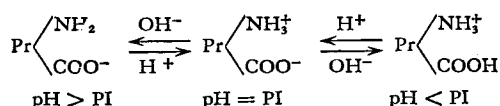
一般来说,带电质点(胶粒或分子)在电场中移动的方向,取决于它们所带电荷的性质,如果质点带负电荷,则移向阳极,反之则移向阴极。质点的电泳速度取决于它们所带的电荷量、电场的强度、介质的性质和温度,以及缓冲溶液的离子强度、pH 值和电渗等因素。如果质点所带的电荷量多、电场强度大、介质的粘度小、吸附性小、温度较高,缓冲溶液的离子强度较低、pH 值偏离样品(各种单纯的胶粒或分子)的等电点较远、电渗阻力小,则质点的电泳速度较快,反之则慢。

电泳的速度常以 $\frac{\text{厘米}^2}{\text{秒} \times \text{伏}} \times 10^{-5}$ 表示,称为电泳迁移率(或称电泳移动度)。迁移率是一个重要的物理常数,它的含意是指单位时间(秒)内单位电势梯度(伏特/厘米)下的电泳速度(厘米)。

现以血清蛋白质的琼脂电泳为例,加以说明:

1. 质点所带的电荷

蛋白质是由氨基酸组成的两性物质,具有两性游离的特性。当溶液的 pH 值高于它的等电点时,蛋白质分子游离呈负离子,反之则游离呈正离子,当溶液的 pH 值等于其等电点时,蛋白质分子则游离呈为双极离子。假如某一蛋白质分子只含有一个氨基和一个羧基,它的两性游离性质可用下式表示:



式中 Pr 代表蛋白质分子,PI 代表蛋白质的等电点。

由于一般采用的电泳缓冲液如巴比妥-巴比妥钠溶液的 pH 值偏向于蛋白质等电点的碱性侧,故蛋白质游离呈负离子,在电场中向阳极方向游动,负电荷量越多者,泳速也越快。同时,在一定 pH 值下,各种蛋白质分子所带的电荷不仅与末端上的自由氨基与羧基有关,也与暴露在分子表面的极化基团有很大关系。

2. 电渗

在上述体系中,蛋白质在琼脂凝胶中电泳时,实际上并非所有的蛋白质分子都是向阳极移动并保持其应有的速度,这是由于电渗作用的影响。所谓电渗是指在电场中,液体对于一个固体相的相对移动。由于琼脂并非中性物质,它具有一些极性基团,带有负电荷,并且是不能移动的固体相,而与琼脂相接触的液体相带正电荷,液体便向阴极移动,形成电渗作用。此时,蛋白

* 曾载入《临床检验资料汇编》,甘肃人民出版社,1977 年。本文对原稿略加修改。

质胶粒(或分子)电泳的表面速度,实际上是它们本身向阳极移动的电泳速度与由于液体向阴极移动的电渗速度的差值。如果蛋白质的电泳速度大于电渗速度,则向阳极移动,反之则向阴极移动;如果蛋白质的电泳速度等于电渗速度,则位于样品原点不动。一般人血清经琼脂电泳后,白蛋白向阳极移动,丙种球蛋白向阴极移动,乙种球蛋白往往位于样品原点不动。但是,由于电渗的移动是有规则的,因而对电泳物质中各种组份的相对分布并无妨碍,不过各组份的相对位置乃是由于电泳作用和电渗作用相互影响的结果。琼脂电泳时电渗作用示意图见图 1。

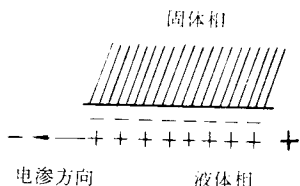


图 1 电渗作用示意图

3. 电场强度

电场强度是每厘米介质所产生的电位差,也称电势梯度。在琼脂电泳时,如果琼脂板两端相距 20 厘米处测得电位降为 250 伏,则电场强度(电势梯度)为 $250/20=1.25$ 伏特/厘米。电场强度对电泳速度起主要作用,电场强度越高,则带电质点移动越快。

4. 缓冲溶液的离子强度

溶液的离子强度是指溶液中各离子的克分子浓度与离子价数平方值的乘积总和的二分之一。它也是影响带电质点电泳速度的一个重要因素,离子强度愈高,电泳速度愈慢,反之则愈快。常用巴比妥缓冲液的离子强度控制在 0.03—0.12 之间。其计算公式如下:

$$\mu = \frac{1}{2} \sum CZ^2$$

式中 μ = 溶液的离子强度;

C = 离子的克分子浓度;

Z = 离子的价数;

Σ 表示算式中各项数值相加。

例 1. 一个单价化合物(例如 NaCl)的离子强度等于其克分子浓度 C 。

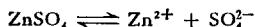


$$\mu = \frac{1}{2} \sum CZ^2 = \frac{1}{2} [C(1)^2 + C(-1)^2]$$

$$= \frac{2C}{2} = C$$

如 $C = 0.12M$, 则 $\mu = 0.12$

例 2. 一个双价化合物(例如 ZnSO_4)的离子强度等于其克分子浓度 C 的 4 倍。

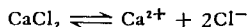


$$\mu = \frac{1}{2} \sum CZ^2 = \frac{1}{2} [C(2)^2 + C(-2)^2]$$

$$= \frac{8C}{2} = 4C$$

如 $C = 0.05M$, 则 $\mu = 4 \times 0.05 = 0.2$

例 3. 一个双单价化合物(例如 CaCl_2)的离子强度等于其克分子浓度 C 的 3 倍。



$$\mu = \frac{1}{2} \sum CZ^2 = \frac{1}{2} [C(2)^2 + 2C(-1)^2]$$

$$= \frac{6C}{2} = 3C$$

如 $C = 0.04M$, 则 $\mu = 3 \times 0.04 = 0.12$

5. 其他因素

除上述因素外,尚有缓冲液的粘度、缓冲液、介质与样品的相互作用、介质结构的疏松或紧密程度、导电系统是否连续等因素,也都在一定程度上影响着电泳速度和分离效果。

由于区带电泳实验技术,设备简易、操作方便、分辨力较好,在实际应用中发展很快,目前已出现有很多类型。如按常用支持介质的不同物理性状,大体可以分为四类:

1. 滤纸或其他纤维纸电泳 适用于小量样品的分析鉴定。

2. 凝胶电泳 如琼脂凝胶、琼脂糖凝胶、淀粉凝胶、聚丙烯酰胺凝胶、葡聚糖凝胶电泳等,常用于小量样品的分离制备及分析鉴定。

3. 粉末电泳 如纤维素粉、淀粉、玻璃粉电泳,用途同 2。

4. 薄膜电泳 如醋酸纤维素膜电泳,用途同 1。

如按支持介质的常用装置形式和方法,又可分为多种:(1)平板电泳——将支持物铺在长方形的玻璃或有机玻璃平板上进行电泳;(2)垂直板形电泳——将支持物铺在上述平板上,作垂直装置后,再进行电泳;(3)垂直柱形电泳——将支持物装在垂直的圆形玻柱内进行电泳;(4)连续液流电泳——将样品和缓冲液连续虹吸到垂直的滤纸上,进行连续电泳;(5)盘电泳——将支持物装入同一规格的玻璃管内,在一不连续系统中进行电泳,样品分离后的区带类似圆盘,等等。以上前四种多用于小量样品的分离制备和鉴定,第(5)种则多用于分析鉴定。(未完待续)