

电泳技术简介

电泳法，是指带电荷的供试品（蛋白质、核苷酸等）在惰性支持介质（如纸、醋酸纤维素、琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶等）中，于电场的作用下，向其对应的电极方向按各自的速度进行泳动，使组分分离成狭窄的区带，用适宜的检测方法记录其电泳区带图谱或计算其百分含量的方法。

电泳技术的基本原理和分类

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 为介质粘度， v 为质点移动速度，当质点在电场中作稳定运动时： $F=F'$ 即 $QE=6 \pi r \eta v$

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，与其半径及介质粘度成反比。除了自身状态的因素外，电泳体系中其它因素也影响质点的电泳迁移率。

电泳法可分为自由电泳（无支持体）及区带电泳（有支持体）两大类。前者包括 **Tise-leas** 式微量电泳、显微电泳、等电聚焦电泳、等速电泳及密度梯度电泳。区带电泳则包括滤纸电泳（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。

自由电泳法的发展并不迅速，因为其电泳仪构造复杂、体积庞大，操作要求严格，价格昂贵等。而区带电泳可用各种类型的物质作支持体，其应用比较广泛。本节仅对常用的几种区带电泳分别加以叙述。

影响电泳迁移率的因素

1. 电场强度 电场强度是指单位长度（ cm ）的电位降，也称电势梯度。如以滤纸作支持物，其两端浸入到电极液中，电极液与滤纸交界面的纸长为 $20cm$ ，测得的电位降为 $200V$ ，那么电场强度为 $200V/20cm=10V/cm$ 。当电压在 $500V$ 以下，电场强度在 $2-10v/cm$ 时为常压电泳。电压在 $500V$ 以上，电场强度在 $20-200V/cm$ 时为高压电泳。电场强度大，带电质点的迁移率加速，因此省时，但因产生大量热量，应配备冷却装置以维持恒温。

2. 溶液的 pH 值 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（ $-COOH$ ），又有碱性基团（ $-NH_2$ ）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。

3.溶液的离子强度 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符合的离子聚集其周围，形成一个与运动质点符合相反的离子氛（ionic atmosphere），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。

4.电渗 在电场作用下液体对于固体支持物的相对移动称为电渗（electro-osmosis）。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。

电泳分析常用方法

（一）醋酸纤维素薄膜电泳

醋酸纤维素是提纤维素的羟基乙酰化形成的纤维素醋酸酯。由该物质制成的薄膜称为醋酸纤维素薄膜。这种薄膜对蛋白质样品吸附性小，几乎能完全消除纸电泳中出现的“拖尾”现象，又因为膜的亲水性比较小，它所容纳的缓冲液也少，电泳时电流的大部分由样品传导，所以分离速度快，电泳时间短，样品用量少， $5\mu g$ 的蛋白质可得到满意的分离效果。因此特别适合于病理情况下微量异常蛋白的检测。

醋酸纤维素膜经过冰醋酸乙醇溶液或其它透明液处理后可使膜透明化有利于对电泳图谱的光吸收扫描测定和膜的长期保存。

1.材料与试剂 醋酸纤维素膜一般使用市售商品，常用的电泳缓冲液为 pH8.6 的巴比妥缓冲液，浓度在 $0.05-0.09mol/L$ 。

2.操作要点

(1)膜的预处理：必须于电泳前将膜片浸泡于缓冲液，浸透后，取出膜片并用滤纸吸去多余的缓冲液，不可吸得过干。

(2)加样：样品用量依样品浓度、本身性质、染色方法及检测方法等因素决定。对血清蛋白质的常规电泳分析，每 cm 加样线不超过 $1\mu l$ ，相当于 $60-80\mu g$ 的蛋白质。

(3)电泳：可在室温下进行。电压为 25V/cm，电流为 0.4-0.6mA/cm 宽。

(4)染色：一般蛋白质染色常使用氨基黑和丽春红，糖蛋白用甲苯胺蓝或过碘酸-Schiff 试剂，脂蛋白则用苏丹黑或品红亚硫酸染色。

(5)脱色与透明：对水溶性染料最普遍应用的脱色剂是 5%醋酸水溶液。为了长期保存或进行光吸收扫描测定，可浸入冰醋酸：无水乙醇=30:70 (V/V) 的透明液中。

(二) 凝胶电泳

以淀粉胶、琼脂或琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶等作为支持介质的区带电泳法称为凝胶电泳。其中聚丙烯酰胺凝胶电泳 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) 普遍用于分离蛋白质及较小分子的核酸。琼脂糖凝胶孔径较大，对一般蛋白质不起分子筛作用，但适用于分离同工酶及其亚型，大分子核酸等应用较广，介绍如下：

1.琼脂糖凝胶电泳的原理概述 琼脂糖是由琼脂分离制备的链状多糖。其结构单元是 D-半乳糖和 3,6-脱水-L-半乳糖。许多琼脂糖链依氢键及其它力的作用使其互相盘绕形成绳状琼脂糖束，构成大网孔型凝胶。因此该凝胶适合于免疫复合物、核酸与核蛋白的分离、鉴定及纯化。在临床生化检验中常用于 LDH、CK 等同工酶的检测。

2.琼脂糖凝胶电泳分离核酸的基本技术 在一定浓度的琼脂糖凝胶介质中，DNA 分子的电泳迁移率与其分子量的常用对数成反比；分子构型也对迁移率有影响，如共价闭环 DNA > 直线 DNA > 开环双链 DNA。当凝胶浓度太高时，凝胶孔径变小，环状 DNA (球形) 不能进入胶中，相对迁移率为 0，而同等大小的直线 DNA (刚性棒状) 可以按长轴方向前移，相对迁移率大于 0。

(1)设备与试剂：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，而且制胶与加样都比较方便，故应用比较广泛。核酸分离一般用连续缓冲体系，常用的有 TBE (0.08mol/L Tris · HCl, pH8.5, 0.08mol/L 硼酸, 0.0024mol/L EDTA) 和 THE (0.04mol/L Tris · HCl, pH7.8, 0.2mol/L 醋酸钠, 0.0018mol/L EDTA)。

(2)凝胶制备：用上述缓冲液配制 0.5%-0.8% 琼脂糖凝胶溶液，沸水浴或微波炉加热使之融化，冷至 55℃ 时加入溴化乙锭 (EB) 至终浓度为 0.5 μg/ml，然后将其注入玻璃板或有机玻璃板组装好的模子中，厚度依样品浓度而定。注胶时，梳齿下端距玻璃板 0.5-1.0mm，待脱凝固后，取出梳子，加入适量电极缓冲液使板胶浸没在缓冲液下 1mm 处。

(3)样品制备与加样：溶解于 TBE 或 THE 内的样品应含指示染料 (0.025% 溴酚蓝或桔黄橙)、蔗糖 (10%-15%) 或甘油 (5%-10%)，也可使用 2.5% Ficoll II 增加比重，使样品集中，每齿孔可加样 5-10 μg。

(4)电泳：一般电压为 5-15V/cm。对大分子的分离可用电压 5V/cm。电泳过程最好在低温条件下进行。

(5)样品回收：电泳结束后在紫外灯下观察样品的分离情况，对需要的 DNA 分子或特殊片段可从电泳后的凝胶中以不同的方法进行回收，如电泳洗脱法：在紫外灯下切取含核酸区带的凝胶，将其装入透析袋（内含适量新鲜电泳缓冲液），扎紧透析袋后，平放在水平型电泳槽两电极之间的浅层缓冲液中，100V 电泳 2-3 小时，然后正负电极交换，反向电泳 2 分钟，使透析袋上的 DNA 释放出来。吸出含 DNA 的溶液，进行酚抽提、乙醇沉淀等步骤即可完成样品的回收。

其它还有低熔点琼脂糖法、醋酸铵溶液浸出法、冷冻挤压法等，但各种方法都仅仅有利于小分子量 DNA 片段（<1kb）的回收，随着 DNA 分子量的增大，回收量显著下降。

（三）等电聚焦电泳技术

等电聚焦（isoelectric focusing, IEF）是 60 年代中期间世的一种利用有 pH 梯度的介质分离等电点不同的蛋白质的电泳技术。由于其分辨率可达 0.01pH 单位，因此特别适合于分离分子量相近而等电点不同的蛋白质组分。

1. IEF 的基本原理 在 IEF 的电泳中，具有 pH 梯度的介质其分布是从阳极到阴极，pH 值逐渐增大。如前所述，蛋白质分子具有两性解离及等电点的特征，这样在碱性区域蛋白质分子带负电荷向阳极移动，直至某一 pH 位点时失去电荷而停止移动，此处介质的 pH 恰好等于聚焦蛋白质分子的等电点（ pI ）。同理，位于酸性区域的蛋白质分子带正电荷向阴极移动，直到它们的等电点上聚焦为止。可见在该方法中，等电点是蛋白质组分的特性量度，将等电点不同的蛋白质混合物加入有 pH 梯度的凝胶介质中，在电场内经过一定时间后，各组分将分别聚焦在各自等电点相应的 pH 位置上，形成分离的蛋白质区带。

2. pH 梯度的组成 pH 梯度的组成方式有二种，一种是人工 pH 梯度，由于其不稳定，重复性差，现已不再使用。另一种是天然 pH 梯度。天然 pH 梯度的建立是在水平板或电泳管正负极间引入等电点彼此接近的一系列两性电解质的混合物，在正极端吸入酸液，如硫酸、磷酸或醋酸等，在负极端引入碱液，如氢氧化钠、氨水等。电泳开始前两性电解质的混合物 pH 为一均值，即各段介质中的 pH 相等，用 pH_0 表示。电泳开始后，混合物中 pH 最低的分子，带负电荷最多， pI_1 为其等电点，向正极移动速度最快，当移动到正极附近的酸液界面时，pH 突然下降，甚至接近或稍低于 pI_1 ，这一分子不再向前移动而停留在此区域内。由于两性电解质具有一定的缓冲能力，使其周围一定的区域内介质的 pH 保持在它的等电点范围。pH 稍高的第二种两性电解质，其等电点为 pI_2 ，也移向正极，由于 $pI_2 > pI_1$ ，因此定位于第一种两性电解质之后，这样，经过一定时间后，具有不同等电点的两性电解质按各自的等电点依次排列，形成了从正极到负极等电点递增，由低到高的线性 pH 梯度，如图 16-3 所示。

3.两性电解质载体与支持介质 理想的两性电解质载体应在 pI 处有足够的缓冲能力及电导,前者保证 pH 梯度的稳定,后者允许一定的电流通过。不同 pI 的两性电解质应有相似的电导系数从而使整个体系的电导均匀。两性电解质的分子量要小,易于应用分子筛或透析方法将其与被分离的高分子物质分开,而且不应与被分离物质发生反应或使之变性。

常用的 pH 梯度支持介质有聚丙烯酰胺凝胶、琼脂糖凝胶、葡聚糖凝胶等,其中聚丙烯酰胺凝胶为最常应用。

电泳后,不可用染色剂直接染色,因为常用的蛋白质染色剂也能和两性电解质结合,因此应先将凝胶浸泡在 5% 的三氯醋酸中去除两性电解质,然后再以适当的方法染色。

(四) 其他电泳技术

1. IEF/SDS-PAGE 双向电泳法 1975 年 O' Farrall 等人根据不同组份之间的等电点差异和分子量差异建立了 IEF/SDS-PAGE 双向电泳。其中 IEF 电泳(管柱状)为第一向,SDS-PAGE 为第二向(平板)。在进行第一向 IEF 电泳时,电泳体系中应加入高浓度尿素、适量非离子型去污剂 NP-40。蛋白质样品中除含有这两种物质外还应有二硫苏糖醇以促使蛋白质变性和肽链舒展。

IEF 电泳结束后,将圆柱形凝胶在 SDS-PAGE 所应用的样品处理液(内含 SDS、 β -巯基乙醇)中振荡平衡,然后包埋在 SDS-PAGE 的凝胶板上端,即可进行第二向电泳。

IEF/SDS-PAGE 双向电泳对蛋白质(包括核糖体蛋白、组蛋白等)的分离是极为精细的,因此特别适合于分离细菌或细胞中复杂的蛋白质组分。

2. 毛细管电泳 Neuhoff 等人于 1973 年建立了毛细管均一浓度和梯度浓度凝胶用来分析微量蛋白质的方法,即微柱胶电泳,均一浓度的凝胶是将毛细管浸入凝胶混合液中,使凝胶充满总体积的 $2/3$ 左右,然后将其插入约厚 2mm 的代用粘土垫上,封闭管底,用一支直径比盛凝胶的毛细管更细的硬质玻璃毛细管吸水铺在凝胶上。聚合后,除去水层并用毛细管加蛋白质溶液($0.1-1.0 \mu l$,浓度为 $1-3mg/ml$)于凝胶上,毛细管的空隙用电极缓冲液注满,切除插入粘土部分,即可电泳。

目前毛细管电泳分析仪的诞生,特别是美国生物系统公司的高效电泳色谱仪为 DNA 片段、蛋白质及多肽等生物大分子的分离、回收提供了快速、有效的途径。高效电泳色谱法是将凝胶电泳解析度和快速液相色谱技术融为一体,在从凝胶中洗脱样品时,连续的洗脱液流载着分离好的成分,通过一个联机检测器,将结果显示并打印记录。高效电泳色谱法既具有凝胶电泳固有的高分辨率,生物相容性的优点,又可方便地连续洗脱样品。

各电泳法,除另有规定外,照下述方法操作。

一、纸电泳法 1.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如图,包括两个电泳槽 A 和一个可以密封的玻璃(或相应材料)盖 B;两侧的电泳槽均用有机玻璃(或相应材料)板 C 分成两部分;外格装有铂电极(直径 0.5~0.8cm)D;里格为可放滤纸 E 的有机玻璃电泳槽架 F,此架可从槽中取出;两侧电泳槽 A 内的铂电极 D 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 100~500V,高压电泳一般在 500~10 000V。

2. 操作法 (1) 电泳缓冲液 枸橼酸盐缓冲液(pH3.0) 取枸橼酸 ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) 39.04g 与枸橼酸钠($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$)4.12g,加水 4000ml,使溶解。(2) 滤纸 取色谱滤纸置 1mol/L 甲酸溶液中浸泡过夜,次日取出,用水漂洗至洗液的 pH 值不低于 4,置 60℃烘箱烘干,备用。可按需要裁成长 27cm、宽 18cm 的滤纸,或根据电泳室的大小裁剪,并在距长度方向一端 5~8cm 处划一起始线,每隔 2.5~3cm 处做一记号各点样用。(3) 点样 有湿点法和干点法。湿点法是将裁好的滤纸全部浸入枸橼酸盐缓冲液(pH3.0)中,湿润后,取出,用滤纸吸干多余的缓冲液,置电泳槽架上,使起始线靠近阴极端,将滤纸两端浸入缓冲液中,然后用微量注射器精密点加供试品溶液,每点 10 μ l,共 3 点,并留 2 个空白位置。干点法是将供试品溶液点于滤纸上,吹干、再点,反复数次,直至点完规定量的供试品溶液,然后用喷雾器将滤纸喷湿,点样处最后喷湿,本法适用于稀的供试品溶液。(4) 电泳 于电泳槽中加入适量电泳缓冲液,浸没铂电极,接通电泳仪稳压电源挡,调整电压梯度为 18~20V/cm,电泳约 1 小时 45 分钟,取出,立即吹干,置紫外光灯(254nm)下检视,用铅笔划出紫色斑点的位置。(5) 含量测定 剪下供试品斑点和与斑点位置面积相近的空白滤纸,剪成细条,分别置试管中,各精密加入 0.01mol/L 盐酸溶液 5ml,摇匀,放置 1 小时,用 3 号垂熔玻璃漏斗滤过,也可用自然沉降或离心法倾取上清液,按各药品项下的规定测定吸收度,并按吸收系数计算含量。

二、醋酸纤维素薄膜电泳法 1.仪器装置 电泳室及直流电源同纸电泳。

2.试剂 (1) 巴比妥缓冲液(pH8.6)取巴比妥 2.76g,巴比妥钠 15.45g,加水溶解使成 1000ml。(2) 氨基黑染色液 取 0.5g 的氨基黑 10B,溶于甲醇 50ml、冰醋酸 10ml 及水 40ml 的混合液中。(3) 漂洗液 取乙醇 45ml、冰醋酸 5ml 及水 50ml,混匀。(4) 透明液 取冰醋酸 25ml,加无水乙醇 75ml,混匀。 3.操作法 (1) 醋酸纤维素薄膜 取醋酸纤维素薄膜,裁成 2cm×8cm 的膜条,将无光泽面向下,浸入巴比妥缓冲液(pH8.6)中,待完全浸透,取出夹于滤纸中,轻轻吸去多余的缓冲液后,将膜条无光泽面向上,置电泳槽架上,经滤纸桥浸入巴比妥缓冲液(pH 8.6)中。(2) 点样与电泳 于膜条上距负极端 2cm 处,条状滴加蛋白含量约 5% 的供试品溶液 2~3 μ l,在 10~12V/cm 电位梯度下电泳。电泳区带距离以 4~5cm 为宜。(3) 染色 电泳完毕,将膜条取下浸于氨基黑染色液中,2~3 分钟后,

用漂洗液浸洗数次，直至脱去底色为止。(4) 透明 将洗净并完全干后的膜条浸于透明液中 10~15 分钟，取出平铺于洁净的玻板上，干后即成透明薄膜，可于分光光度计上测定和作标本长期保存。(5) 含量测定 未经透明处理的醋酸纤维素薄膜电泳图可按各药品项下规定的方法测定，一般采用洗脱法或扫描法，测定各蛋白质组分的相对百分含量。洗脱法 将洗净的膜条用滤纸吸干，剪下供试品溶液各电泳图谱的电泳区带，分别浸于 1.6% 的氢氧化钠溶液中，振摇数次，至洗脱完全，于一定波长下测定吸收度。同时剪取与供试品膜条相应的无蛋白部位，同法操作作对照。先计算吸收值总和，再计算各蛋白组分所占百分率。扫描法 将干燥的醋酸纤维素薄膜用色谱扫描仪通过反射（未透明薄膜）或透射（已透明薄膜）方式在记录器上自动绘出各蛋白组分曲线图，横坐标为膜条的长度，纵坐标为吸收度，计算各蛋白组分的百分含量。亦可用微机处理积分计算。

三、琼脂糖凝胶电泳法 1. 仪器装置 电泳室及直流电源同纸电泳。

2. 试剂 (1) 醋酸—锂盐缓冲液(pH3.0) 取冰醋酸 50ml，加水 800ml 混合后，用氢氧化锂调节 pH 至 3.0，再加水至 1000ml。(2) 甲苯胺蓝溶液 取甲苯胺蓝 0.1g，加水 100ml 使溶解。3. 操作法 (1) 制胶 取琼脂糖约 0.2g，加水 10ml，置水浴中加热使溶胀完全，加温热的醋酸—锂盐缓冲液(pH3.0)10ml，混匀，趁热将胶液涂布于大小适宜(2.5cm×7.5cm 或 4cm×9cm)的玻璃板上，厚度约 3mm，静置，待凝胶结成无气泡的均匀薄层，即得。(2) 标准品溶液及供试品溶液的制备 照各药品项下规定配制。(3) 点样与电泳 在电泳槽内加入醋酸—锂盐缓冲液(pH3.0)，将凝胶板置于电泳槽架上，经滤纸桥浸入缓冲液。于凝胶板负极端分别点样 1 μ l，立即接通电源，在电压梯度约 30V/cm，电流强度 1~2mA/cm 的条件下，电泳约 20 分钟，关闭电源。(4) 染色与脱色 取下凝胶板，用甲苯胺蓝溶液染色，用水洗去多余的染色液至背景无色为止。

四、聚丙烯酰胺凝胶电泳法 1. 仪器装置 通常由稳流电泳仪和圆盘或平板电泳槽组成。其电泳室有上、下两槽，每个槽中都有固定的铂电极，铂电极经隔离电线接于电泳仪稳流挡上。

2. 试剂 (1) 溶液 A 取三羟甲基氨基甲烷 36.6g，四甲基乙二胺 0.23ml，加 0.1mol/L 盐酸溶液 48ml，再加水溶解并稀释至 100ml，置棕色瓶内，在冰箱中保存。(2) 溶液 B 取丙烯酰胺 30.0g、次甲基双丙烯酰胺 0.74g，加水溶解并稀释至 100ml，滤过，置棕色瓶内，在冰箱中保存。(3) 电极缓冲液(pH8.3) 取三羟甲基氨基甲烷 6g、甘氨酸 28.8g，加水溶解并稀释至 1000ml，置冰箱中保存，用前稀释 10 倍。(4) 溴酚蓝指示液 取溴酚蓝 0.1g，加 0.05mol/L 氢氧化钠溶液 3.0ml 与 90% 乙醇 5ml，微热使溶解，加 20% 乙醇制成 250ml。(5) 染色液 取 0.25%(W/V) 考马斯亮蓝 G<[250]>溶液 2.5ml，加 12.5%(W/V) 三氯醋酸溶液至 10ml。(6) 稀染色液 取上述染色液 2ml，加 12.5%(W/V) 三氯醋酸溶液至 10ml。(7) 脱色液 7% 醋酸溶液。

3.操作法 (1)制胶 取溶液 A2ml, 溶液 B5.4ml, 加尿素 2.9g 使溶解, 再加水 4 ml, 混匀, 抽气赶走溶液中气泡, 加 0.56%过硫酸铵溶液 2ml, 混匀制成胶液, 立即用装有长针头的注射器或细滴管将胶液沿管壁加至底端有橡皮塞的小玻璃管(10×0.5cm)中,使胶层高度达 6~7cm, 然后徐徐滴加水少量, 使覆盖胶面, 管底气泡必须赶走, 静置约 30 分钟, 待出现明显界面时即聚合完毕, 吸去水层。

(2)标准品溶液及供试品溶液的制备 照各药品项下的规定。(3)电泳 将已制好的凝胶玻璃管装入圆盘电泳槽内, 每管加供试品或标准品溶液 50~100 μ l, 为防止扩散可加甘油或 40%蔗糖溶液 1~2 滴及 0.04%溴酚蓝指示液 1 滴,也可直接在上槽缓冲液中加入 0.04%溴酚蓝指示液数滴, 玻璃管的上部用电极缓冲液充满, 上端接负极、下端接正极。调节起始电流使每管为 1mA, 数分钟后, 加大电流使每管为 2~3mA, 当溴酚蓝指示液移至距玻璃管底部 1cm 处, 关闭电源。(4)染色和脱色 电泳完毕, 用装有长针头并吸满水的注射器,自胶管底部沿胶管壁将水压入, 胶条即从管内滑出, 将胶条浸入稀染色液过夜或用染色液浸泡 10~30 分钟, 以水漂洗干净, 再用脱色液脱色至无蛋白区带凝胶的底色透明为止。(5)结果判断 将胶条置灯下观察, 根据供试品与标准品的色带位置和色泽深浅程度进行判断。相对迁移率 供试品和标准品的电泳区带有时可用相对迁移率($R'_{[m]}$)进行比较。其计算式如下: 进胶端到供试品或标准品区带的距离 相对迁移率($R'_{[m]}$)=—

进胶端到溴酚蓝区带的距离 扫描 将清晰的胶条置双波长薄层扫描仪或凝胶电泳扫描仪中扫描并积分, 由各组分的峰面积计算百分含量。

五、SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳法 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳测定蛋白分子量,是根据大多数蛋白都能与阳离子表面活性剂十二烷基硫酸钠(SDS)按重量比结合成复合物,使蛋白分子所带的负电荷远远超过天然蛋白分子的负电荷, 消除了不同蛋白分子的电荷效应,使蛋白分子相对迁移率($R'_{[m]}$)的大小完全取决于分子量的高低, 因此可从已知分子量的标准蛋白的对数和相对迁移率所作的标准曲线中求出供试品的分子量。

1.仪器装置 除另有规定外, 同聚丙烯酰胺凝胶电泳。

2.试剂 (1)丙烯酰胺液溶 称取丙烯酰胺 22.2g 与双丙烯酰胺 0.6g, 溶于 100ml 水中, 贮于褐色瓶中低温保存。(2)凝胶缓冲液 称取磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)8.82g、磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)51.55g 与十二烷基硫酸钠 2.0g, 加水至 1000ml(若有沉淀析出,可加温至 37 $^\circ\text{C}$ 溶解)。(3)电泳缓冲液 将凝胶缓冲液稀释 1 倍。(4)染色液 称取 25mg 考马斯亮蓝 $R_{[250]}$,溶于 57%乙醇与 9.2%醋酸混合液 100ml 中。(5)脱色液 取无水乙醇 75ml, 加冰醋酸 50ml, 用水稀释至 1000ml。

3.操作法 除下列规定外, 其他均同聚丙烯酰胺凝胶电泳。(1)制胶 用丙烯酰胺溶液—凝胶缓冲液—水—1.6%过硫酸铵溶液-四甲基乙二胺(需冷却)(10.1 : 15.0 : 3.4 : 1.5 : 0.045) 配制而成。(2)标准蛋白溶液及供试品溶液的制备 取标准

蛋白，加水制成每 1ml 中含 2~5mg 的溶液，与水解液(取尿素 21.6g 和十二烷基硫酸钠 0.04g，溶于 40ml 水中)1：3 混合，置冰箱中过夜。供试品照上述方法配制。(3)电泳 调节电流使每管为 8mA。

4.相对迁移率和分子量计算 将电泳脱色后的区带用卡尺或用扫描定位法测量染料移动的距离、染色前胶条长度、蛋白移动距离和脱色后的胶条长度。按下式计算相对迁移率：
$$\text{相对迁移率}(R'_{[m]}) = \frac{\text{蛋白移动的距离}}{\text{脱色后的胶条长度}} \times \frac{\text{染料移动的前沿距离}}{\text{染色前的胶条长度}}$$
以 $R'_{[m]}$ 为横坐标,已知分子量标准蛋白的对数为纵坐标,在半对数坐标纸上绘图,由标准曲线中查出供试品分子量。

地址：杭州市西湖科技园西园八路 11 号

邮编：310030

售后服务专线：400-672-1817

销售电话：0571-86056609 86059660

86054117 86055117

传真：0571-86059660 86823529

网址：www.top17.net