

## 实验二

# 醋酸纤维膜凝胶电泳分离血清蛋白质

### 目的：

1. 掌握醋酸纤维膜电泳的基本原理及其临床意义
2. 熟悉电泳仪器的使用和操作

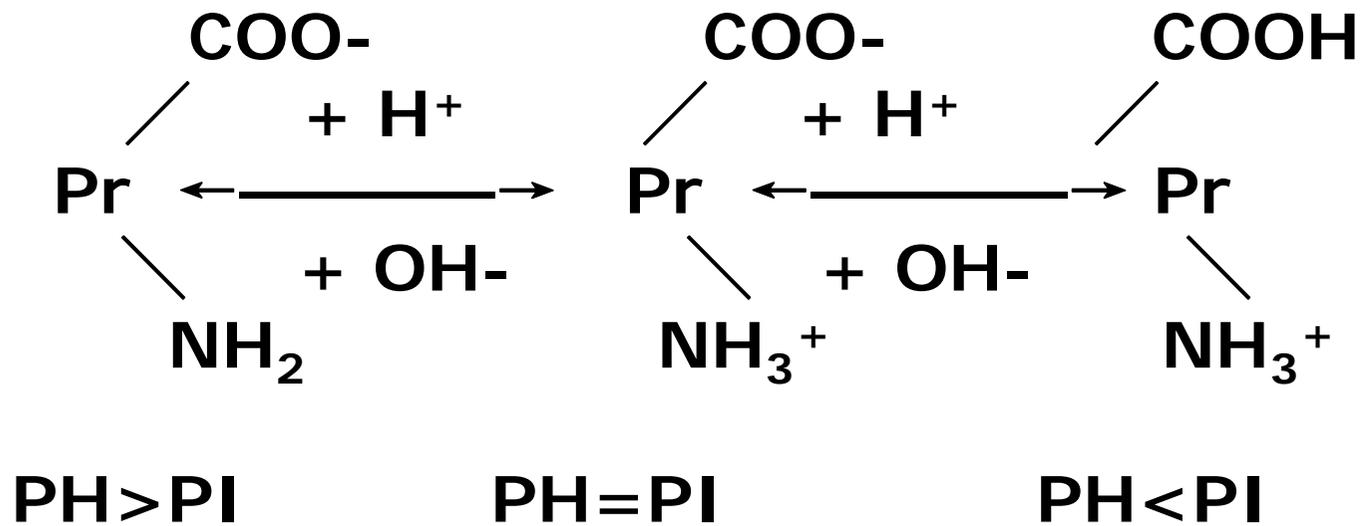
# 电泳

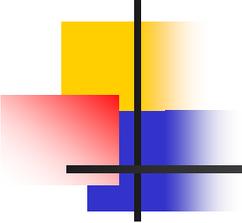
## (一) 原理

- 带电的颗粒在外加电场中，向带相反电荷的电极作定向移动的现象称为**电泳**。
- 生物分子都带电荷，其电荷的多少取决于分子性质及其所在介质（溶液）的pH及其组成。当溶液的pH小于等电点pH时，蛋白质将带有正电荷，在电场中作为一个正离子移动。当溶液的pH大于等电点pH时，蛋白质将带有负电荷，在电场中作为一个阴离子移动。

# 电泳用于分离物质的原理:

以生物大分子为例阐明电荷来源:





## (二) 电泳的分类

---

按**支持介质**的不同可分为：

- (1) 纸电泳 (Paper electrophoresis)
- (2) 醋酸纤维薄膜电泳 (Cellulose Acetate electrophoresis)
- (3) 琼脂凝胶电泳 (Agar Gel electrophoresis)
- (4) 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Polyacrylamide Gel electrophoresis) (**PAGE**)
- (5) SDS – 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS – PAGE) 。

按**支持介质形状**不同可分为：

- (1) 薄层电泳；
- (2) 板电泳；
- (3) 柱电泳

### (三) 电泳的影响因素

1. **待分离大分子的性质**：所带的电荷、分子大小和形状，分子带的电荷量越大、直径越小、形状越接近球形，则其电泳迁移速度越快
2. **缓冲液pH和离子强度**：pH值距离其等电点愈远，其所带净电荷量就越大，电泳的速度也就越大；但是pH过高或过低引起蛋白变性，缓冲液通常要保持一定的离子强度；强度过低，则缓冲能力差，不易维持PH恒定，离子强度过高，在待分离分子周围形成较强的带相反电荷的离子扩散层（即离子氛），降低了蛋白质的带电量，使电泳速度减慢。一般所用离子强度为0.02-0.2之间。

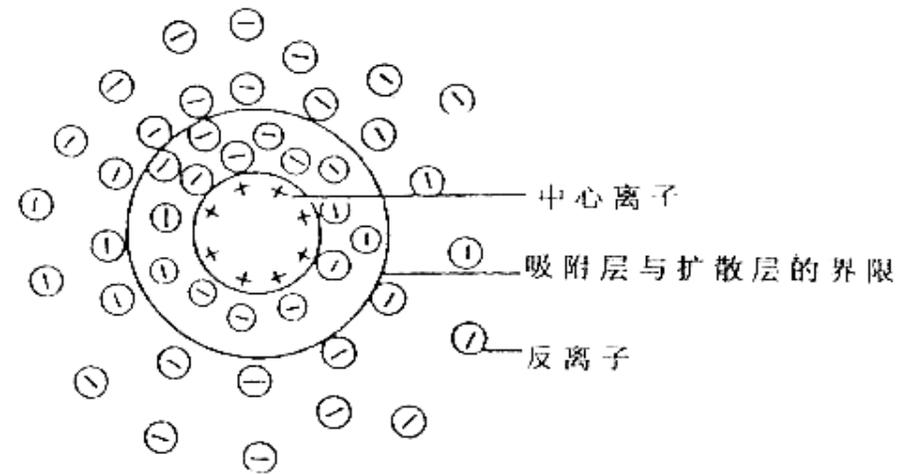
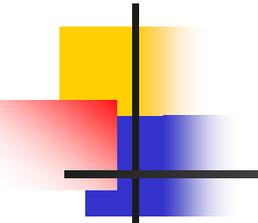


图 4—1 离子氛示意图



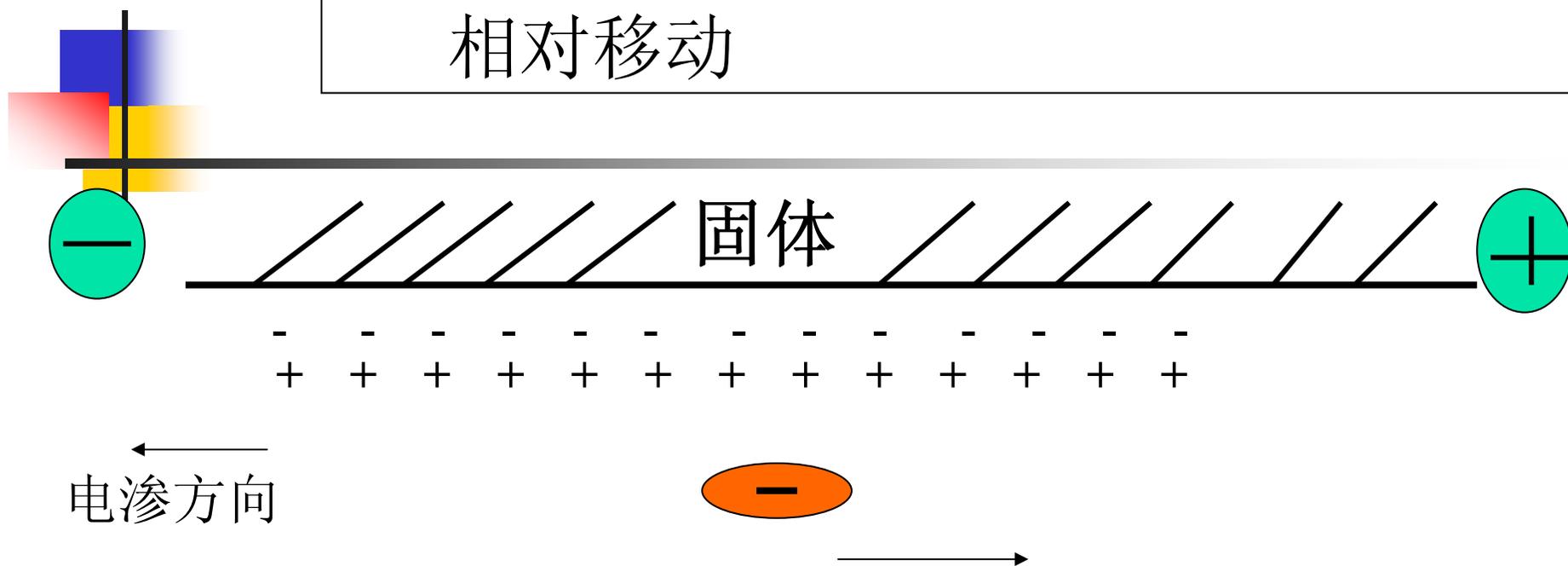
**3. 电场强度：**过高，产热，样品和Buffer扩散增加，条带增宽；蛋白变性。过低，电泳时间增加，扩散。当需要增大电场强度以缩短电泳时间时，需附有冷却装置

**4. 电渗：**在电场中液体对固体支持物的相对移动；当电渗方向与电泳方向一致时，会加快颗粒泳动速度，反之，当两者方向相反时，会减慢颗粒泳动速度。

**5. 支持介质的筛孔：**筛孔越小，则颗粒在移动的过程中所受到的阻力也就越大

# 电渗现象对电泳的影响

电渗: 液体在电场中对**固体支持物**的相对移动

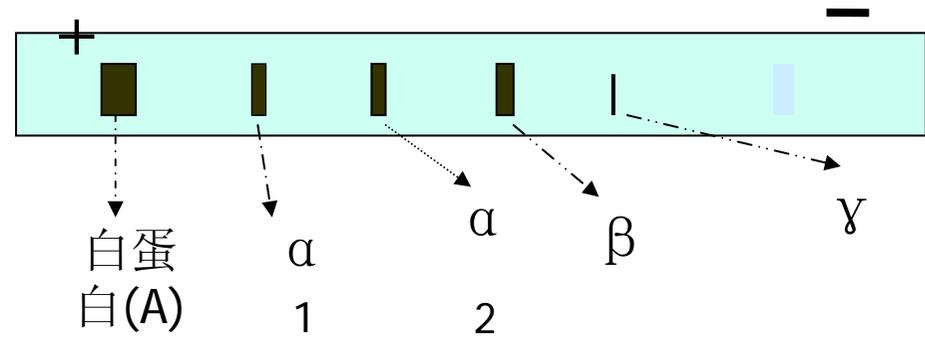
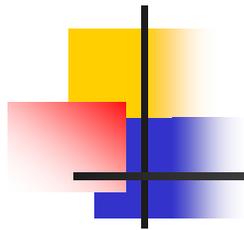


# 血清蛋白醋酸纤维薄膜电泳

(cellulose acetate membrane electrophoresis)

本实验以醋酸纤维膜为电泳支持物，分离各种血清蛋白。临床医学常用血清蛋白间相对百分比的改变或异常区带的出现作为临床鉴别诊断的依据。

醋酸纤维膜是由醋酸纤维加工制成的一种细密且薄的微孔膜。广泛应用于医学临床中各种生物分子的分离分析中，如血清蛋白、血红蛋白、球蛋白、脂蛋白、糖蛋白、甲胎蛋白、类固醇及同工酶等。它具有微量、快速、简便、分辨力高，对样品无拖尾和吸附现象等优点。电渗作用虽然较高但很均一，不影响样品的分离效果。不足之处是分辨率比聚丙烯酰胺凝胶电泳低，由于薄膜厚度小（约 $10\sim 100\mu\text{m}$ ），样品用量很少，不适于制备。



血清蛋白的 pI 大多在 7.5 以下，在 pH8.6 的巴比妥缓冲液中以负离子形式存在，并且蛋白质的分子量、立体构象、等电点及形状也有差异，在电场中迁移速度不同，可以在醋酸纤维薄膜上分离成 A、 $\alpha_1$ 、 $\alpha_2$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  五条区带。

蛋白质名称	等电点	分子量
清蛋白	4.88	69000
$\alpha$	5.06	$\alpha_1$ —200000 $\alpha_2$ —300000
$\beta$	5.12	90000—150000
$\gamma$	6.85—7.50	156000—300000

血清在 pH8.6 的缓冲体系中电泳 1h 左右，染色后可显示 5 条带。清蛋白泳动最块，其余依次  $\alpha_1$ 、 $\alpha_2$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  球蛋白。

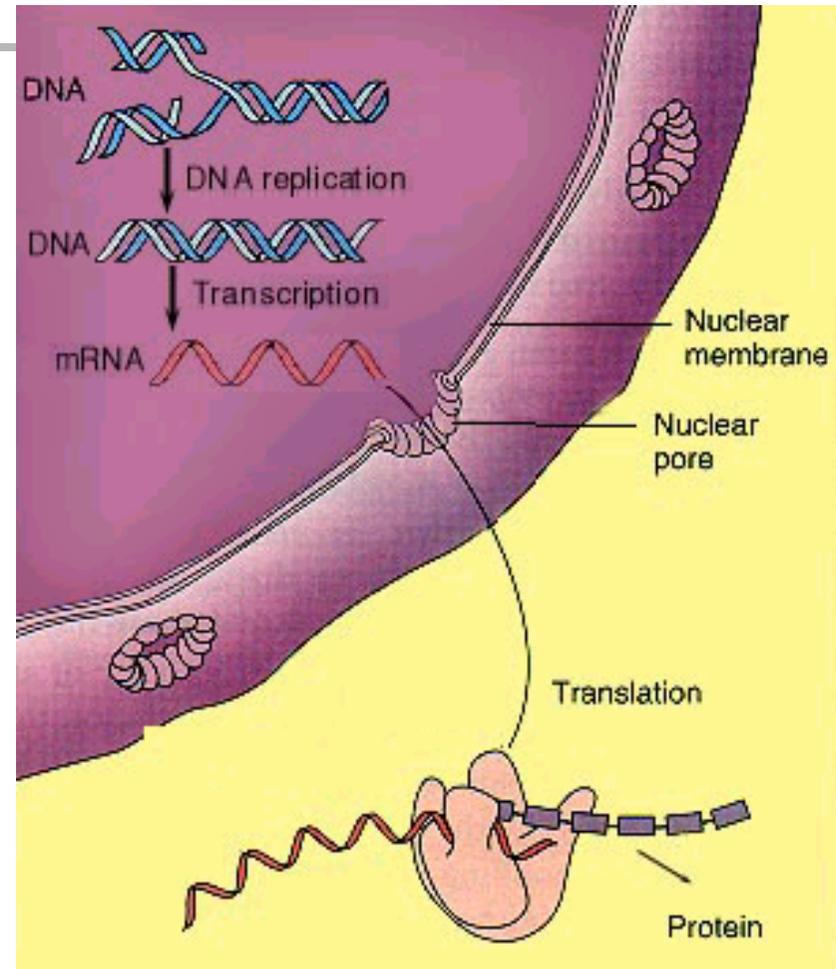
人血浆蛋白质的等电点及迁移率

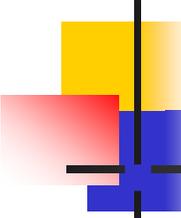
蛋白质名称	等电点	泳动度/ ( $\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )	分子量
清蛋白	4.88	$-5.9 \times 10^{-5}$	69000
$\alpha_1$ -球蛋白	5.06	$-5.1 \times 10^{-5}$	200000
$\alpha_2$ -球蛋白	5.06	$-4.1 \times 10^{-5}$	300000
$\beta$ -球蛋白	5.12	$-2.8 \times 10^{-5}$	9000—150000
$\gamma$ -球蛋白	6.85—7.50	$-1.0 \times 10^{-5}$	156000—300000
纤维蛋白元	5.40	$-2.1 \times 10^{-5}$	

# 血浆蛋白质

## (一) 血浆蛋白的来源

- 大多数血浆蛋白在肝脏细胞和网状内皮细胞内合成并释放入血的。



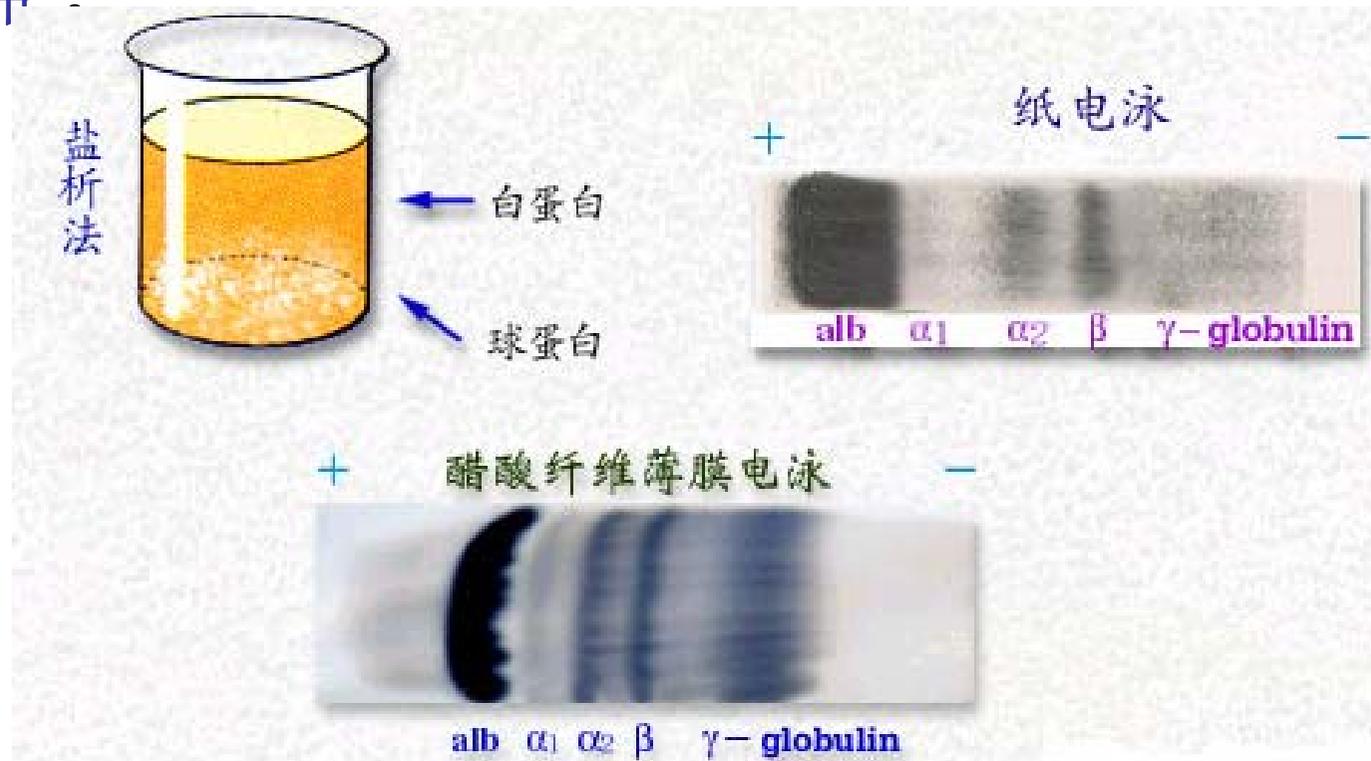


## (二) 血浆蛋白质的功能

1. 营养功能。
- 2. 缓冲与胶渗功能。
- 3. 运载功能（包括类固醇、甲状腺激素、维生素A与D、脂类、金属与微量元素、药物等）。
- 4. 免疫与防御功能（包括免疫球蛋白和补体）。
- 5. 凝血与纤溶功能。
- 6. 各种酶的特殊功能。
- 7. 代谢调节功能等。

### (三) 血浆蛋白的分类

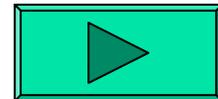
- 通过盐析法将血浆蛋白质分为清蛋白和球蛋白两大类。
- 通过醋酸纤维膜电泳或琼脂糖凝胶电泳将血浆蛋白质分成清蛋白和  $\alpha_1$ 、 $\alpha_2$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ -球蛋白等五个主要区带。



# 醋酸纤维素较纸电泳的优点

醋酸纤维素是纤维素（纸）的醋酸酯

- 电渗现象影响小
- 醋酸纤维素膜对蛋白的吸附小，几无“拖尾”。
- 由于醋酸纤维素亲水性小，所容纳的缓冲液也较少，电流大部分是由样品传导，所以分离速度快。



## 血清蛋白电泳的正常组分

- 正常血清蛋白电泳后可分为清蛋白、 $\alpha_1$ 球蛋白、 $\alpha_2$ 球蛋白、 $\beta$ 球蛋白、 $\gamma$ 球蛋白五个区带。各条区带中多个蛋白质组分可有重叠、覆盖；两区带之间也有少量蛋白质；某些蛋白质组份染色很浅。
- 用醋酸纤维素薄膜电泳测得血清各区带蛋白质的参考值：

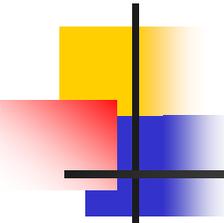
清蛋白 (Alb) : 57%~68%、35~52 g/L

$\alpha_1$ 球蛋白: 1.0%~5.7%、1.0~4.0 g/L

$\alpha_2$ 球蛋白: 4.9%~11.2%、4.0~8.0 g/L

$\beta$ 球蛋白: 7%~13%、5.0~10.0 g/L

$\gamma$ 球蛋白: 9.8%~18.2%、6.0~13.0g/L。

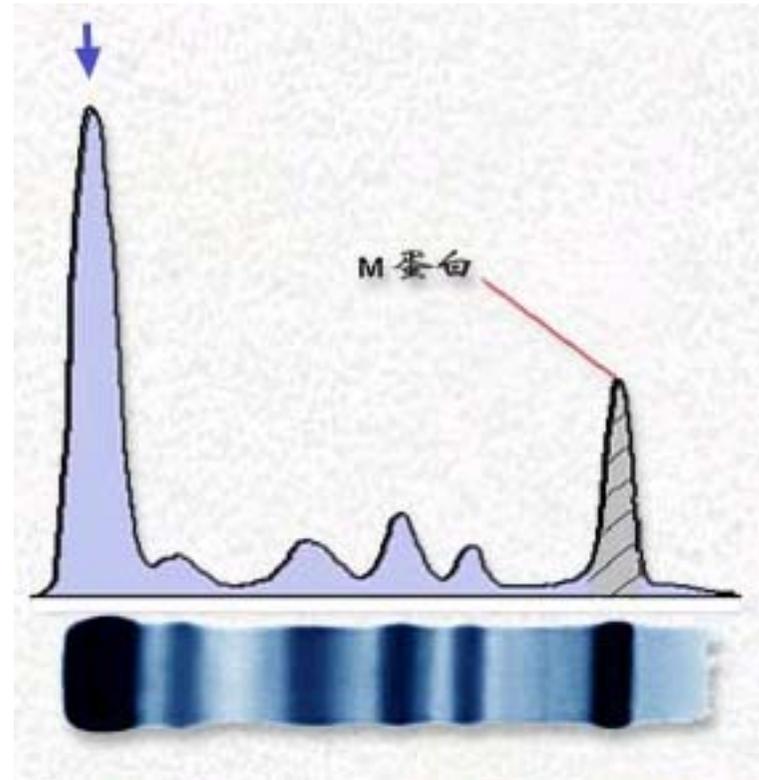


## 醋酸纤维膜电泳蛋白组分变化的临床意义

- **肝病** 包括急慢性肝炎和肝硬化。主要表现为白蛋白降低、 $\gamma$ 球蛋白增高。
- **M蛋白血症** 主要见于多发性骨髓瘤、巨球蛋白血症、重链病以及一些良性M蛋白增多症。可见在 $\beta$ 球蛋白区、 $\gamma$ 球蛋白区或两者之间出现一条致密浓集的电泳带，称为M蛋白带。
- **肾病** 见于急慢性肾炎、肾病综合症、糖尿病、肾病和肾功能衰竭等。表现为白蛋白降低， $\alpha_2$ 球蛋白和 $\beta$ 球蛋白明显升高， $\gamma$ 球蛋白相对降低。
- **急慢性炎症**  $\alpha_1$ 球蛋白、 $\alpha_2$ 球蛋白和 $\beta$ 球蛋白均增高。
- **蛋白缺乏症** 主要见于 $\alpha_1$ 抗胰蛋白酶缺乏症、 $\gamma$ 球蛋白缺乏症等，临床上较少见。电泳图谱表现为 $\alpha_1$ 球蛋白或 $\gamma$ 球蛋白显著降低。
- **其它** 脐带血清、胎儿血清、部分原发性肝癌血清，在A1b与 $\alpha_1$ 球蛋白之间可增加一条甲胎蛋白带。

## 例：多发性骨髓瘤血浆蛋白电泳图谱

- 多发性骨髓瘤是由浆细胞恶性增生所至的一种肿瘤。
- 总的蛋白电泳图谱表现为：
  - ①在原 $\gamma$ 区带外出现一特征性的M蛋白峰；
  - ②白蛋白区带下降。



# 实验操作

## (一) 仪器与薄膜的准备

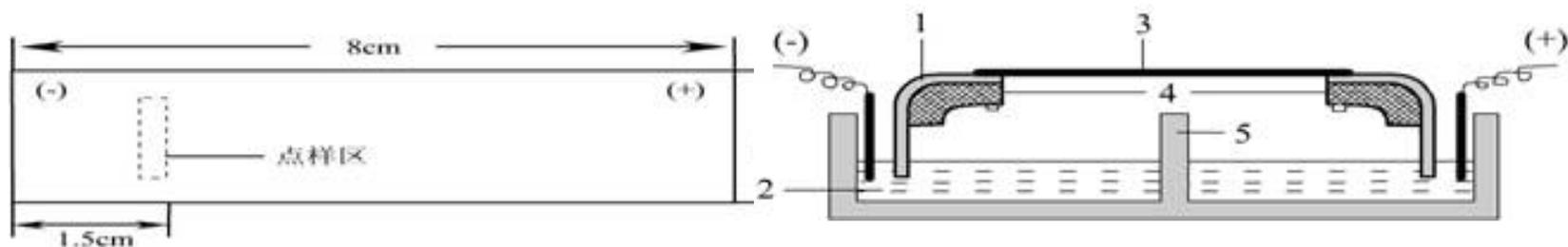
1. 醋酸纤维素薄膜的润湿与选择 将膜迎着光辨别光泽面和无光泽面。在无光泽面距短边一端1.5 cm处用铅笔轻轻画一条点样线，将之置于盛有缓冲液的平皿中，浸泡30 min方可用于点样。

2. 电泳槽的准备 在两个电极槽中，各倒入等体积的电极缓冲液，在电泳槽的两个膜支架上各放两层滤纸条，使滤纸一端的长边与支架前沿对齐，另一端浸入电极缓冲液内。当滤纸条全部润湿后，用玻璃棒轻轻挤压在膜支架上的滤纸以驱逐气泡，使滤纸的一端能紧贴在膜支架上。滤纸条是两个电极槽联系醋酸纤维素薄膜的桥梁，故称为滤纸桥。

3. 电极槽的平衡

## (二) 点样

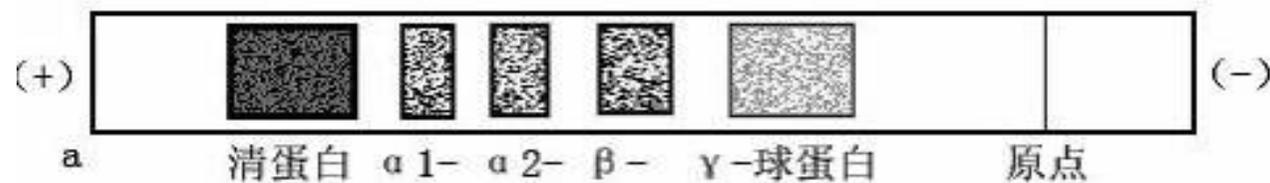
用镊子将已充分浸透的膜取出，用滤纸吸去多余的缓冲液。将湿的膜两端搭在电泳槽的支架上，相成一个横跨缺口的桥。在膜的粗糙面距一端1.5cm处点样。用点样器蘸血清一下（可来回移动一次，不能看见有液滴形成），再将点样器轻轻印在点样处（点样要与膜边缘垂直，且大小均匀）。使血清完全渗透至薄膜内，形成一定宽度、粗细均匀的直线。此步是实验的关键，是获得具有清晰区带的电泳图谱的重要环节。

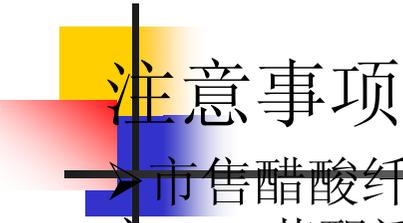


(三)电泳：通电，电压，150V，1 h。

(四)染色：电泳完毕后将薄膜取下，放在含氨基黑10B染色液的培养皿中浸泡3 min。

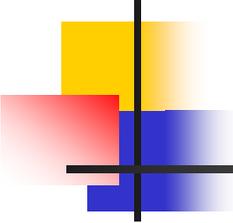
(五)漂洗：将薄膜从染色液中取出后移至5%乙酸(现配)的浅盘中漂洗数次，直至背景蓝色脱尽，条带清晰为止，可得到色带清晰的电泳图谱。





## 注意事项

- ▶市售醋酸纤维素薄膜均为干膜片，薄膜的浸润与选膜是电泳成败的关键之一。若飘浮于液面的薄膜在15~30 s内迅速润湿，整条薄膜色泽深浅一致，则此膜均匀可用于电泳
- ▶醋酸纤维素薄膜电泳常选用pH8.6巴比妥—巴比妥钠缓冲液，其浓度为0.05~0.09 mol/L。选择何种浓度与样品和薄膜的厚薄有关。缓冲液浓度过低，则区带泳动速度快区带扩散变宽；缓冲液浓度过高，则区带泳动速度慢，区带分布过于集中，不易分辨
- ▶点样时，应将薄膜表面多余的缓冲液用滤纸吸去，以免引起样品扩散。但不宜太干，否则样品不易进入膜内，造成点样起始点参差不齐，影响分离效果。点样时，动作要轻、稳，用力不能太大，以免损坏膜片或印出凹陷影响电泳区带分离效果
- ▶电泳时应选择合适的电流强度，一般电流强度为0.4~0.6mA/cm膜宽度。电流强度高，则热效应高；电流过低，则样品泳动速度慢且易扩散
- ▶操作过程为防止指纹污染，应戴手套



## 【实验思考】

---

- 电泳时，点样端置于电场的正极还是负极？为什么？
- 电泳后，泳动在最前面的是何种蛋白质？各谱带为何种成分？请分析原因。
- 用醋酸纤维薄膜电泳做电泳支持物有什么优点？
- 电泳图谱清晰的关键是什么？如何正确操作？