

# 醋酸纤维薄膜电泳法分离血清蛋白

南昌大学生物学实验教学中心 汪艳璐



# 实验目的

- 掌握电泳法分离血清蛋白质的原理；
- 掌握血清蛋白醋酸纤维素薄膜电泳的操作方法。



# 实验原理

吉祥如意

1. **电泳**：是指带电粒子在电场中向本身所带电荷相反的电极移动的现象。

在一定pH条件下，不同的蛋白质由于具有不同的等电点而带不同性质的电荷，因而在一定的电场中它们的移动方向和移动速度也不同，即它们的电泳迁移率不同，因此，可使它们分离。

2. **影响电泳迁移率的因素**：

**内在因素**：蛋白所带净电荷的量、蛋白的大小和形状

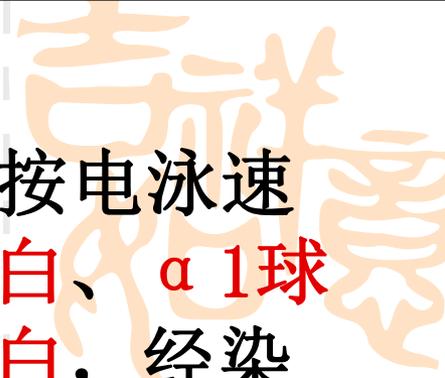
**外界因素**：电场强度、溶液的pH值、溶液的离子强度和电渗现象

吉祥如意

吉祥如意

吉祥如意

3. 血清中各种蛋白质的等电点在pH4.0~7.3之间，在pH8.6的缓冲溶液中均带**负**电荷，在电场中向**正极**泳动。血清中各种蛋白质的等电点不同，所以带电荷量也不同。此外各种蛋白质的分子大小各有差异，因此在同一电场中泳动的速度不同。分子小而带电荷多者，泳动较快；反之，则较慢。
4. 醋酸纤维素溶于有机溶剂（如：丙酮、氯仿、氯乙稀、乙酸乙酯等）后，涂抹成均匀的薄膜则成为醋酸纤维素薄膜。该膜具有均一的泡沫状的结构，厚度约为120  $\mu\text{m}$ ，有很强的通透性，对分子移动阻力很小。该薄膜电泳具有**微量、快速、简便、分辨力高**，对样品**无拖尾和吸附现象**等优点。现已广泛用于血清蛋白、糖蛋白、脂蛋白、血红蛋白、酶的分离和免疫电泳等方面。



5. 经醋酸纤维素薄膜电泳可将血清蛋白按电泳速度分为5条区带，从正极端依次为清蛋白、 $\alpha_1$ 球蛋白、 $\alpha_2$ 球蛋白、 $\beta$ 球蛋白及 $\gamma$ 球蛋白，经染色可计算出各蛋白质的百分含量。

人血清中蛋白质的等电点及分子量

蛋白质名称	等电点 (pI)	分子量
血清蛋白	4.88	6900
$\alpha_1$ —球蛋白	5.06	$\alpha_1$ —200 000 $\alpha_2$ —300 000
$\beta$ —球蛋白	5.12	90 000—150 000
$\gamma$ —球蛋白	6.85—7.50	156 000—300 000



# 实验器材

吉祥

1. **电泳仪**：为电泳提供直流电源。
2. **电泳槽**：为电泳提供场所。
3. **血清加样器**：可用盖玻片或微量加样器。
4. **醋酸纤维素薄膜**：2cm×8cm
5. **其它**：培养皿（直径9-10cm）、滤纸、镊子等。

吉祥

吉祥

吉祥

吉祥

吉祥

# 实验材料和试剂

材料：牛血清

试剂：

1、巴比妥-巴比妥钠缓冲液 (pH8.6)

2、0.5% 氨基黑10B染色液

3、漂洗液

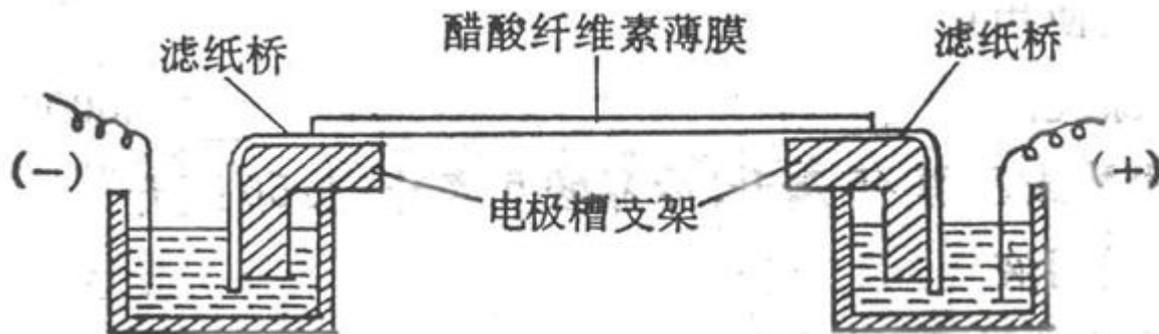


# 实验操作

吉祥如意

## 1. 电泳槽的准备

电泳槽有两个互相隔离的槽，各自装有缓冲液，接不同的电极，红色为正极，黑色为负极。每个槽上都有一根可移动的横杆，滤纸的一头搭在横杆上，另一头浸入缓冲液中，形成了滤纸桥。点好样的醋酸纤维素薄膜就搭在滤纸桥上。



吉祥如意

吉祥如意

吉祥如意

吉祥如意

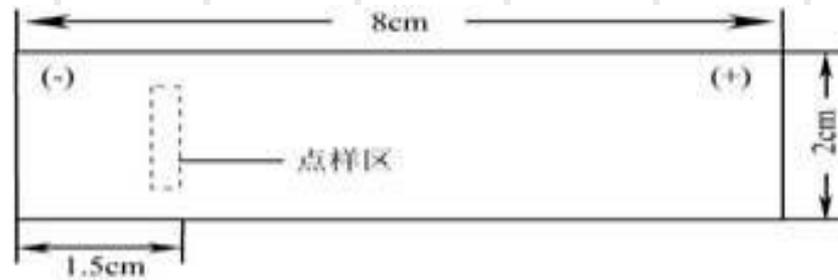
吉祥如意

## 2. 醋酸纤维素薄膜的润湿

将醋酸纤维素薄膜完全浸泡于缓冲液中约30min后，用镊子小心夹住薄膜一端，放在折叠的滤纸中，并用滤纸吸干表面液体。

## 3. 点样

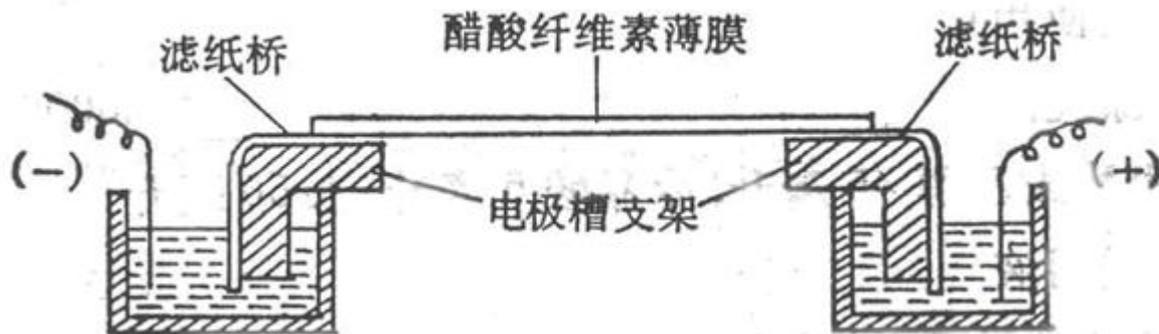
把膜条铺在玻璃板上（无光泽面朝上），将点样器在血清中沾一下（量薄薄一层为好），再在膜条一端1.5-2cm处轻轻水平地落下并随即提起，这样即在膜条上点上了细条状的血清样品。此步是实验的关键。



## 4. 电泳

将点样端的薄膜平贴在阴极电泳槽支架的滤纸桥上（点样面朝下），另一端平贴在阳极端支架上（见下图）。要求薄膜紧贴滤纸桥并绷直，中间不能下垂。

连接好电泳仪。在室温下电泳，打开电源开关，调节电流强度 $0.3\text{mA}/\text{cm}$ 膜宽度电泳时间约为1h。电泳后，关闭电泳仪切断电源。

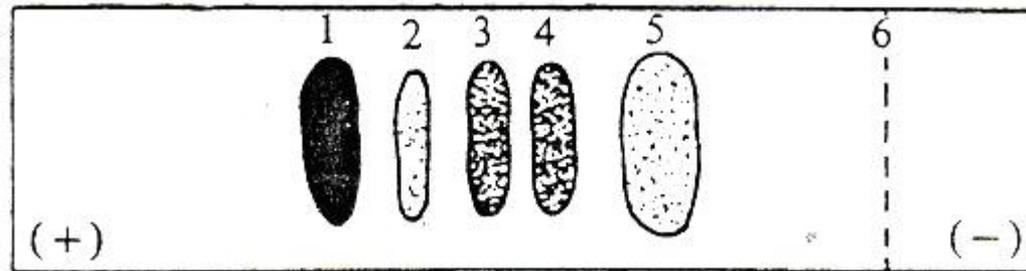


## 5. 染色:

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5-10min。(染色液回收)

## 6. 漂洗:

将薄膜从染色液中取出, 自来水下冲洗除去多余的染色液后放入盛有漂洗液的培养皿中漂洗, 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。



正常血清醋酸纤维素薄膜电泳示意图

1. 为清蛋白, 2, 3, 4, 5, 分别为 $\alpha_1$ —,  $\alpha_2$ —,  $\beta$ —, 及 $\gamma$ —球蛋白, 6为点样原点

# 注意事项

吉祥如意

- 1、薄膜的浸润与选膜是电泳成败的关键之一。
- 2、点样时，应将薄膜表面多余的缓冲液用滤纸吸去，吸水量以不干不湿为宜。
- 3、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。
- 4、点样应点在薄膜的毛面上，点样量要适量，不宜过多或过少。
- 5、电泳时应将薄膜的点样端置于电泳槽的负极端，且点样面向下。
- 6、应控制染色时间。时间长，薄膜底色不易脱去；时间太短，着色不易区分，或造成条带染色不均匀，必要时可进行复染。

吉祥

吉祥

吉祥

# 思考题



- 1、比较醋酸纤维薄膜电泳与纸电泳的异同点。
- 2、指出醋酸纤维薄膜用作电泳的支持物有何特点？

