

双向凝胶电泳的原理是第一向基于蛋白质的等电点不同用等电聚焦分离，第二向则按分子量的不同用 SDS-PAGE 分离，把复杂蛋白混合物中的蛋白质在二维平面上分开。近年来经过多方面改进已成为研究蛋白质组的最有使用价值的核心方法。

分离蛋白质组所有蛋白的两个关键参数是其分辨率和可重复性。在目前情况下，双向凝胶电泳的一块胶板（16cm×20cm）可分出 3~4 千个，甚至 1 万个可检测的蛋白斑点，这与 10 万个基因可表达的蛋白数目相比还是太少了。80 年代开始采用固定化 pH 梯度胶，克服了载体两性电解质阴极漂移等许多缺点而得以建立非常稳定的可以随意精确设定的 pH 梯度。由于可以建立很窄的 pH 范围（如 0.05U/cm），对特别感兴趣的区域可在较窄的 pH 范围内做第二轮分析，从而大大提高了分辨率。此种胶条已有商品生产，因此基本上解决了双向凝胶电泳重复性的问题。这是双向凝胶电泳技术上的一个非常重要的突破。第二向 SDS-PAGE 有垂直板电泳和水平超薄胶电泳两种做法，可分离 10~100kD 分子量的蛋白质。

其中灵敏度较高的银染色法可检测到 4ng 蛋白，最灵敏的还是用同位素标记，20ppm 的标记蛋白就可通过其荧光或磷光的强度而测定。用图像扫描仪、莱赛密度仪、电荷组合装置可把用上述方法得到的蛋白图谱数字化，再经过计算机处理，去除纵向和横向的曳尾以及背景底色，就可以给出所有蛋白斑点的准确位置和强度，得到布满蛋白斑点的图像，即所谓“参考胶图谱”。蛋白质组研究的主要困难是对用双向凝胶电泳分离出来的蛋白，进行定性和定量的分析。最常用的方法是先把胶上的蛋白印迹到 PVDF(polyvinylidene difluoride)膜上后再进行分析，确定它们是已知还是未知蛋白。现在的分级分析法是先做快速的氨基酸组成分析，也可先做 4~5 个循环的 N 末端微量测序，再做氨基酸组成分析；结合在电泳胶板上估计的等电点和分子量，查对数据库中已知蛋白的数据，即可作出判断。有文献报道，N 末端 4 个残基序列的数据就可以给出很多的信息而得到相当准确的结果。如再结合 C 末端序列，判断结果的准确性会更高。对分离得到的蛋白质作进一步的确切鉴定需要有足够数量的纯蛋白，电泳时蛋白质已经过了高度纯化。现在一块胶板可允许上到高达 mg 数量级的样品，因此每个分离的蛋白斑点可有  $\mu$ g 数量的蛋白，这样使本来是微量的蛋白也可希冀被鉴定。

蛋白质的翻译后修饰和加工，是指在肽链合成完成后进行的化学反应，如磷酸化、羟基化、糖基化、二硫键形成，以及最近发现的蛋白质自剪接等等，可能有一百种以上。翻译后修饰和加工对蛋白质的正常生理功能是必需的，它们的变化往往和疾病的发生有关。用双向凝胶电泳可以进行翻译后修饰的研究，如用 32P 标记可以研究磷酸化蛋白的变化。双向凝胶电泳中常可发现的蛋白质拖曳现象，很可能是一个蛋白的不同翻译后修饰产物所造成的。拖曳图像变化在疾病诊断上可能提供重要的信息。

双向凝胶电泳技术当前面临的挑战是：(1)低拷贝蛋白的鉴定。人体的微量蛋白往往还是重要的调节蛋白。除增加双向凝胶电泳灵敏度的方法外，最有希望的还是把介质辅助的激光解吸/离子化质谱用到 PVDF 膜上，但当前的技术还不足以检出拷贝数低于 1000 的蛋白质。(2)极酸或极碱蛋白的分离。(3)极大 (>200kD) 或极小 (<10kD) 蛋白的分离。(4)难溶蛋白的检测，这类蛋白中包括一些重要的膜蛋白。(5)得到高质量的双向凝胶电泳需要精湛的技术，因此迫切需要自动二维电泳仪的出现。

## 双向电泳操作方法

### 1 蛋白质样品制备

秧苗蛋白质样品的提取按 Davermal 等 (1986) 的方法进行。100mg 材料剪碎后加入 10mgPVP-40(聚乙烯吡咯烷酮)及少量石英砂，用液氮研磨成粉，加入 1.5 ml 10% 三氯乙酸（丙酮配制，含 10mM 即 0.07% $\beta$ -巯基乙醇），混匀，-20℃沉淀 1 小时，4℃，15000 r/min 离心 15 min，弃上清，沉淀复溶于 1.5ml 冷丙酮(含 10 mM $\beta$ -巯基乙醇)，再于-20℃沉淀 1 小时，同上离心弃上清，(有必要再用 80%丙酮(含 10 mM $\beta$ -巯基乙醇)所得沉淀低温冷冻真空抽干。

按每 mg 干粉加入 20 $\mu$  l (可调) UKS 液[9.5 M 尿素, 5mM 碳酸钾, 1.25%SDS, 0.5%DTT(二硫苏糖醇), 2% Ampholine (Amersham Pharmacia Biotech Inc, pH3.5-10), 6% Triton X-100], 37 $^{\circ}$ C 育 30min, 期间搅动几次, 28 度 (温度低, 高浓度的尿素会让溶液结冰) 16000 r/min 离心 15 min, 离心力越大时间长一点越好! 上清即可上样电泳。或者-70 度保存

## 2 蛋白质浓度测定

按 Garrels (1983) 的程序, 稍加改动。10 $\mu$  l 上述用 UKS 液制得的蛋白质样品中加入 40 $\mu$  l 水及 50 $\mu$  l 20% 三氯乙酸, 冰浴 30min 后, 4 $^{\circ}$ C, 4000 r/min 离心 15min, 弃上清, 再加入 100 $\mu$  l 冷丙酮, 同上离心 5min, 弃上清, 冻干沉淀, 用 100 $\mu$  l PBS 溶液复溶, 并按 Bradford (1976) 的程序测定蛋白质浓度。

### 2.3.1 电聚焦 (IEF)

#### 2.3.1.1 玻管准备

干净玻管(18cm $\times$ 1.5mm)用 Parafilm 封口膜封好底部, 在 16cm 处作好标记, 垂直放在泡沫板上。电聚焦的管子, 买原装的也可以, 实在不行自己也可以做的, 1ml 的移液管, 内径 1.5mm 左右的, 长度取 18cm, 用玻璃刀做, 玻璃管的处理, 先用 2M 的 NaOH 泡至少 1hr, 用自来水冲后;用双蒸水冲, 用双蒸水泡至少 1hr, 中间至少换 2, 3 次水;后用 2M 的 HCL 泡至少 1 个小时, 用双蒸水冲, (不能用自来水冲), 然后双蒸水泡至少 1 个小时, 中间换 3, 4 次水, 可多泡一会。最后泡在无水乙醇里面 1hr, 烘干就可以用了。

#### 2.3.1.2 凝胶制备与电聚焦

灌 IEF 的配方

为 3.09 克尿素

1.125 ml 10%NP-40

1.125ml 水

0.735ml 30%屏息现象 (ACR 28.38 BIS 1.62)

0.15 ml Am 3.5-10

0.375ml Am 5-7

8 卫生 10%AP

1.8 卫生 TEMED

用注射器吸好胶液, 装上 7 号针头, 将 7 号针头插入玻管底部, 边推注射器边提针头, 直到标记处, 用微量进样器小心加入少量水, 可见明显的界面出现, 让其聚合 1 小时以上, 适当长一点的时间更好。待胶聚合好后, 除去 Parafilm 并吸去顶部的覆盖液, 加样 80 $\mu$  g, 上面再小心加入 50m mol/L NaOH 至管口, 不要破坏样品与 NaOH 的界面。即可进行电泳。电极液为: 上槽 (负极) 为 50m mol/L NaOH 液, 下槽 (正极) 为 25m mol/L H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>。按 200V $\times$ 15min, 300V $\times$ 30min, 400V $\times$ 18h, 1000V $\times$ 1h 的程序进行电聚焦。或者直接 400V 17hr 1000V 2hr very important thing is 跑第一向一定要在保持在 37 度左右, 第一向温度特别重要, 不然, 电聚焦肯定不好。

#### 2.3.1.3 电泳后的凝条处理

电聚焦完毕后, 用注射器吸满水, 套上一个 200 $\mu$  l 的枪头, 当然枪头与注射器间用 parafilm 封住防漏气。从顶部向下注水使胶条向下滑出注射器 枪头 玻璃管必须为一直线。取一胶条, 用双蒸水洗净两端, 按酸端到碱端的顺序切成 0.5cm 的小段, 各自浸入含 1.3ml 抽气后双蒸水的 Eppendorf 管中过夜, 次日用酸度计分别测定各段的 pH 值, 以凝胶长度为横坐标, pH 值为纵坐标作图, 即为等电点标准曲线。漫漫挤, 管子, 200 卫生枪头, 注射器, 要成一直线,, 要用一手扶着管子, 一手拿住 200 卫生枪头, 保证水不从枪头和管子处流出来, 注

射器顶在胸前把胶条挤出后,放在 12%TCA 里面,在 4 度可以保存很久, 在平衡之前,要用 dd water 泡 30min,而且还要换至少 5 次水,每次用不同的小平皿。

对要进行第二向 SDS-PAGE 的胶条则必须用平衡液[2.3%SDS, 62.5m mol/L Tris-HCL (pH6.8), 10%甘油, 5%β-巯基乙醇, 0.1%溴酚蓝]进行二次平衡, 第一次 20min, 第二次 25min。第 2 次的溶液为新的。平衡过程中每隔几 min 轻轻的晃一下小平皿。

### 2.3.2 第二向 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

分离胶浓度为 12%, 无浓缩胶。待胶聚合后, 将电聚焦后已经平衡的胶条平放于浓缩胶顶端 (避免胶条拉直), 并用 1%琼脂糖 (电极缓冲液配制) 封胶, 特别应注意避免胶条与分离胶上沿产生气泡。61 厂板子之灌胶: 坚决不用凡士林, 用透明胶将两端 (板子的 2 边) 封住, 再用 2%琼脂之 SDS-PAGE 电极液封底, 待琼脂凝固后再灌胶, 最后用水封胶。

1, 灌胶不会有任何问题, 不能漏, 2, 不用浓缩胶, 只用分离胶。3, 分离胶用水封, 要保证凝聚好的 PAGE 胶, 为一平的线。用透明胶 (约 4cm 宽), 封住两边, 下面还是用 2%的琼脂封。灌好电极缓冲液[25m mol/LTris, 192m mol/L 甘氨酸及 0.1%SDS], 按 25mA/板胶恒流进行电泳, 待溴酚兰离底部 1cm 时即可停止电泳, 一般电泳耗时约 4-5h。

银染: 凝胶于 40%甲醇, 10%醋酸中固定 1h 以上或者过夜; 用水洗 1 次, 5min; 30%乙醇洗 2×20min; 水洗 6×5min; 0.02%硫代硫酸钠 1min; 水洗 3×20s; 0.2%硝酸银, 0.02%甲醛快速的润洗一次, 就是过一下的意思, 到这个溶液进去, 马上又倒掉; 0.2%硝酸银, 0.02%甲醛 20min; 水洗 3×20s; 显色液(3%碳酸钠, 0.05%甲醛, 0.0005%硫代硫酸钠)快速的润洗一次, 就是过一下的意思, 到这个溶液进去, 马上又倒掉; 显色液(3%碳酸钠, 0.05%甲醛, 0.0005%硫代硫酸钠)显色到你希望的程度, 自己看, 背景好, 点又多的话就可以了; 水洗 20 秒; 0.05%甘氨酸停显。染色理想温度: 最好是 20 度左右。

10%TCA, 0.07%2-ME 丙酮 (100ml):

100%TCA 10ml

2-ME 0.07ml

丙酮 90ml

0.07%2-ME 丙酮 (100ml):

2-ME 0.07ml

丙酮 100ml

0 Farrel 液(9.5M Urea, 2%NP-40, 0.4%Am3.5~10, 1.6%5~7, 5% 2-ME)

50ml

Urea 28.5g

NP-40 1ml

Ampholine 5~7 2.0ml

3.5~10 0.5ml

2-ME 2.5ml

定容, 配好后用 1.5ml 管分装! -70 度保存

UKS 液 (含 9.5M Urea, 5mMK<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1.25%SDS, 0.5%DTT, 2%Ampholine(3.5~10), 6%Triton X-100)

25ml 50ml

Urea 14.25g 28.5g

K2CO3 17.25mg 34.5mg

SDS 0.3125g 0.625g

DTT 0.125g 0.25g

2-ME

Ampholine(3.5~10) 1.25ml 2.5ml

Triton X-100 1.5ml 3ml(0.86ml 2 枪, 4 枪)

2-ME 可适当加一些! 注意定容! 配好后用 1.5ml 管分装! -70 度保存!

双向电泳 IPG (summer)

一、样品提取: 三氯醋酸—丙酮沉淀法

- (1) 在液氮中研磨叶片
- (2) 加入样品体积 3 倍的提取液在-20℃的条件下过夜, 然后离心 (4℃8000rpm 以上 1 小时) 弃上清。
- (3) 加入等体积的冰浴丙酮 (含 0.07%的 $\beta$ -巯基乙醇), 摇匀后离心 (4℃8000rpm 以上 1 小时), 然后真空干燥沉淀, 备用。
- (4) 上样前加入裂解液, 室温放置 30 分钟, 使蛋白充分溶于裂解液中, 然后离心 (15℃8000rpm 以上 1 小时或更长时间以没有沉淀为标准), 可临时保存在 4℃待用。
- (5) 用 Bradford 法定量蛋白, 然后可分装放入-80℃备用。

二、一向电泳 (13cm 的 holder)

- (1) 取大约 70-100ng 的蛋白与溶胀液混合总体积达到 250 $\mu$ l
- (2) 将上述溶液加到 holder 的两个电极之间。
- (3) 去掉胶条的保护膜, 胶面朝下, 先将胶条尖端朝胶条槽的尖端方向放入胶条槽中, 慢慢下压胶条, 并前后移动, 避免生成气泡, 最后放下胶条平端, 使溶液浸湿整个胶条。
- (4) 在胶条上覆盖适量的覆盖油, 盖上盖子。
- (5) 将胶条槽平放于一向仪器上, 与水平方向垂直。
- (6) 设置仪器的运行参数:

三、胶条的平衡 (由一向到二向)

- (1) 将胶条放入 10ml 平衡缓冲液中 (加入 10mgDTT) 封口, 在振荡仪上振荡 15 分钟。
- (2) 将胶条取出放入 10ml 新的平衡缓冲液中 (加入 250mg 的碘乙酰胺) 封口, 在振荡仪上振荡 15 分钟。
- (3) 用去离子水润洗胶条一秒钟, 将胶条的边缘置于滤纸上几分钟, 以去除多余的平衡缓冲液。

四、二向电泳

- (1) 将平衡好的胶条直接转移到第二向制好的 SDS 胶上, 然后用琼脂糖封顶, 准备第二向电泳。
- (2) 设置仪器的运行参数:

五、平板胶的染色

硝酸银染色: (整个操作在摇床上进行)

- (1) 固定: 25ml 的冰醋酸, 100ml 甲醇, 125ml 去离子水, 60 分钟。
- (2) 敏化: 75ml 甲醇, 0.5g 硫代硫酸钠 (使用之前加入), 17g 醋酸钠, 165ml 去离子水, 30 分钟。
- (3) 清洗: 用 250ml 的去离子水清洗 3 次每次 5 分钟。
- (4) 银染: 0.625g 硝酸银, 250 去离子水, (使用之前配制) 20 分钟。
- (5) 显色: 6.25g 碳酸钠, 100 $\mu$ l 的甲醛 (使用之前加入), 250ml 去离子水。
- (6) 终止: 5%的醋酸。
- (7) 照相分析。
- (8) 保存制作干胶。

药品:

提取液：含 10%TCA 和 0.07%的 $\beta$ -巯基乙醇的丙酮裂解液：2.7g 尿素 0.2gCHAPS 溶于 3ml 灭菌的去离子水中（终体积为 5ml），使用前再加入 1M 的 DTT65ul/ml。

平衡缓冲液：1.5MTris-Cl pH8.8 6.7ml，尿素 72.07g，87%的甘油 69ml，SDS 4g，溴酚蓝少许。溶胀液：尿素 12g，CHAPS0.5g，溴酚蓝少许溶于无菌水中，总体积为 25ml。使用之前再加入 IPG 缓冲液 0.5vl/100vl，DTT1.5vl/100vl。

制作平板胶：

分离胶的配制方法：

药品/浓度 5% 7.5% 10% 12.5% 15%

丙烯酰胺 6.7ml 10ml 13.3ml 16.7ml 20ml

分离胶缓冲液 10ml 10ml 10ml 10ml 10ml

10 $\times$ SDS 0.4ml 0.4ml 0.4ml 0.4ml 0.4ml

无菌水 22.7ml 19.4ml 16.1ml 12.8ml 9.5ml

10%过硫酸胺\* 200vl 200vl 200vl 200vl 200vl

TEMED\* 13.3vl 13.3vl 13.3vl 13.3vl 13.3vl

\*在灌胶之前加入

药品配制：

丙烯酰胺单体储液：丙烯酰胺 60g 甲叉双丙烯酰胺 1.6g 溶于无菌水中总体积 200ml 分离胶缓冲液：Trisbase181.5g 溶于 750ml 无菌水中调 PH8.8 总体积 1000ml10%SDS：SDS5g 溶于无菌水中总体积 50ml10%的过硫酸胺：0.1g 溶于无菌水中总体积 1mlSDS 电泳缓冲液：Trisbase15.1g 甘氨酸 72.1gSDS5g 溶于无菌水中总体积 5000ml

封胶溶液：SDS 电泳缓冲液 100ml 琼脂糖 0.5g 溴酚蓝少许附：蛋白质含量测定的方法（Bradford 方法）

原理：这一方法基于 2 考马斯亮蓝 G-250 有红蓝两种不同的形式。在一定浓度的乙醇及酸性条件下，可配成淡红色的溶液，当与蛋白质结合后，产生蓝色化合物，反应迅速而稳定。反应化合物在 465-595nm 处有最大的光吸收值，化合物颜色的深浅与蛋白浓度的高低成正比关系，因此可检测 595nm 的光吸收值的大小计算蛋白的含量。

溶液：

1) Bradford 储存液

100ml95%乙醇

200ml88%磷酸

350mgServaG 蓝

室温下长期保持稳定。

2) Bradford 工作液

425ml 双蒸水

15ml95%乙醇

30ml88%磷酸

30ml Bradford 储存液

用滤纸过滤，保存于室温棕色瓶中，可保存数周，但在使用前需要过滤。

3) 配制 1mg/ml 牛血清蛋白（BSA）

做标准曲线：

取样品即可测量。

注意事项:

- 1、样品制备，样品制备是做好 2-d 的关键，样品中离子浓度不能过大，最好用新鲜的样品提取蛋白质，如果不确定蛋白提取情况，建议先跑 sds-page 检验。
- 2、上样量的问题， ipg 胶条是 13 厘米的上样量在 50ng-80ng 之间，上样量不合适，丰度低的将会被丰度高的所遮盖。
- 3、ipg 胶条 pH 的选择，根据不同样品选择不同 pH 值，
- 4、针对不同的蛋白质，分离胶的浓度需调整。