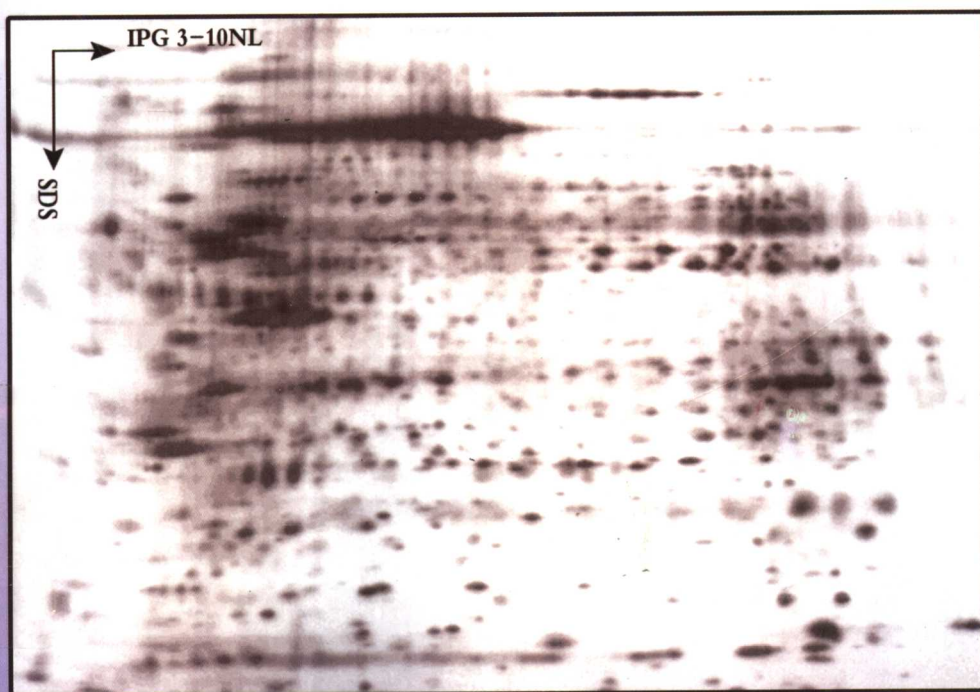


蛋白质双向电泳 实验手册

牛屹东 冯捷 崔恒 郭慧方 编著

北京大学人民医院妇科肿瘤中心



北京大学医学出版社

蛋白质双向电泳实验手册

牛屹东 冯捷 崔恒 郭慧方 编著

北京大学人民医院妇科肿瘤中心

北京大学医学出版社

DANBAIZHI SHUANGXIANG DIANYONG SHIYAN SHOUC

图书在版编目 (CIP) 数据

蛋白质双向电泳实验手册/牛屹东等编著. —北京:
北京大学医学出版社, 2006. 1

ISBN 7-81116-000-5

I. 蛋... II. 牛... III. 蛋白质—凝胶电泳—实验—技术手册 IV. Q510.3-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2005) 第 150539 号

蛋白质双向电泳实验手册

编 著: 牛屹东 冯捷 崔恒 郭慧方

出版发行: 北京大学医学出版社 (电话: 010-82802230)

地 址: (100083) 北京市海淀区学院路 38 号 北京大学医学部院内

网 址: <http://www.pumpress.com.cn>

E-mail: booksale@bjmu.edu.cn

印 刷: 北京东方圣雅印刷有限公司

经 销: 新华书店

责任编辑: 简 浦 责任校对: 蓝 叶 责任印制: 郭桂兰

开 本: 787mm×1092mm 1/16 印张: 6.75 字数: 166 千字

版 次: 2006 年 1 月第 1 版 2006 年 1 月第 1 次印刷 印数: 1—3000 册

书 号: ISBN 7-81116-000-5/R·000

定 价: 19.50 元

版权所有, 违者必究

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

内容简介

本书是一本蛋白质双向电泳实验方法的工具书。从介绍双向电泳的原理、实验技术的发展 and 电泳设备及相关配件材料的使用入手,着眼于实践,着重阐述了以 Multiphor II 系统为载体进行等电聚焦的实验操作和以垂直与水平两种方式进行第二向 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳的技术和具体应用。同时针对不同研究对象探讨了不同的蛋白质样品制备方法及其对双向电泳结果的影响。本书是作者实践经验和教训的总结,具有很强的实用性、指导性和可操作性,对从事蛋白质双向电泳技术的相关人员不失为一本很好的工具书。

本书可供生物化学、分子生物学、生物技术、医药卫生以及农、林、牧等实验室工作人员及相关领域的科研、教学人员参考。

序

1994年提出的“蛋白质组”概念和相关的研究，这几年有了飞速发展，成为目前生物医学研究的热点。蛋白质组分的分离是蛋白质组研究的关键步骤。虽然近年来相继出现了一些可供选择的如高容量生物芯片包括蛋白质芯片技术，基质辅助光解吸离子化—飞行时间—质谱（MALDI-TOF-MS），以及多维蛋白质鉴定技术等，但双向电泳仍是研究蛋白质组学的基础和常规选择。

双向电泳技术难度比较大，国内研究人员多半参考生物技术公司提供的使用手册，或各种培训班提供的内部资料。急需出版一本针对双向电泳专业和实用性强的技术手册。北京大学人民医院妇科肿瘤中心牛屹东、冯捷、崔恒、郭慧方等科研人员和教授，分析、归纳了他们在科研实验中的有关数据、资料和心得体会，结合新近在文献上发表的有关内容，编著了《蛋白质双向电泳实验手册》一书。这本书着重介绍了双向电泳的原理，实验技术的进展，电泳设备及相关配件材料的使用，结果的分析以及常遇到的问题和解决办法等。内容丰富，图文并茂，针对性和可操作性强，其讨论部分更含有大量作者们的实践经验。例如：（1）基础扎实，重视和尽量避免外来因素对结果产生的影响，严格掌握条件；（2）重视实验的每个环节，如蛋白质标本的制备、缓冲液的离子浓度、胶条的规格、电泳仪的生产厂家、规格、型号以及影响蛋白质组分聚焦清晰度或影响结果背景的原因等；（3）对双向电泳，尤其对其第一向的内容，作了相当详细的介绍。分析了不同条件对电泳结果的影响，包括应用不同厂家生产的双向电泳仪分别检测同一样本，对比所取得的结果，寻找差别，积累经验；（4）严格控制条件，结果可比性强，查找发生问题的原因比较确切，解决问题的办法针对性强。这部分的内容，既有丰富的实践经验，也有不少教训，很有参考价值。

蛋白质组学今后的发展前程远大，但也面对着很多困难，不但需要不断提高对蛋白质低含量组分聚焦的清晰度，更要提高对新发现组分的辨识能力。打好双向电泳技术的基础，非常重要。我认为这是一本有很高参考价值的工具书。相信该书的出版，将为研究工作提供有益的帮助，也会受到广大研究、教学以及实验室工作人员的欢迎。

中国医学科学院基础医学研究所

中国协和医科大学基础医学院

2005年11月

前 言

继基因组计划之后,蛋白质组学已经成为当今生命科学领域中的又一热点和核心,具有广泛的应用价值。随着科学的不断发展,蛋白质组学研究手段日新月异,但双向电泳仍然是公认的最有使用价值的核心方法,被喻为蛋白质组研究的“开门技术”。然而,双向电泳的技术难度很大,不经过长期大量的实践摸索很难得到理想的电泳结果。国际电泳学会理事 Angelika Görg 博士,对固相 pH 梯度等电聚焦颇有研究,在互联网上载有双向电泳的操作技术指南,但缺少中文版。国内相继出版了很多涉及生物技术的图书,但有关双向电泳的文字仅占部分篇幅,尚未见一部以固相 pH 梯度等电聚焦为第一向的双向电泳实验指导。虽然目前很多研究室购进了双向电泳设备,但由于技术上的原因,仍需求助于生物技术公司,使研究费用增加。

我们在实践中也遇到过诸多实验技术方面的困难,在不断地摸索改进以及阅读大量文献的基础上深刻地体会到,如果有一本浅显易懂,操作性强的双向电泳实验指导,将会使我们更容易上手,少走很多弯路。

经过大量实践,我们积累了相当的实验资料和体会,竟然成册,作为本研究中心的内部资料,供实验人员使用。然而有很多其他科室甚至外单位的研究生、技术员上门索取。鉴于此,我们决定将实验记录和心得体会加以整理出版,为实验者提供一本实用、有效的双向电泳实验手册。

本书说理浅显,图文并茂,具有很强的操作性。内容包括双向电泳的原理、技术发展、蛋白质样品制备、双向电泳实验步骤(等电聚焦、SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳)、双向电泳应用实例、故障分析等,共计六章。书尾附有各种溶液的配方,便于查找与应用。由于作者水平有限,加之时间仓促,书中内容难免有不妥之处,恳请读者批评指正。

本书的出版得到了北京安波特基因工程技术有限公司许纳豪董事长和北京大学医学出版社庄鸿娟主任的鼎力支持,在此一并表示感谢。

编 者

2005 年 11 月

目 录

第一章 双向电泳概述	1
第一节 双向电泳的概念和原理	1
第二节 双向电泳技术概述	2
一、等电聚焦 (IEF)	2
二、SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)	6
第三节 蛋白质样品制备	7
一、组织细胞破碎方法	8
二、组织细胞裂解变性缓冲液	8
三、分步提取 (Sequential extraction) 缓冲液	12
四、应用组织细胞裂解液需要注意的问题	13
第四节 双向电泳的优势、局限性及应用	13
第五节 建立 IPG-DALT 双向电泳需要考虑的问题	14
第二章 蛋白质样品制备	15
第一节 实验材料、仪器和试剂	15
一、实验材料	15
二、实验仪器与设备	15
三、实验试剂	16
四、实验用酶类、分子量标准和试剂盒	17
第二节 不同实验材料蛋白质提取方法	17
一、SKOV ₃ 细胞蛋白质提取	17
二、血清样品	18
三、组织样品蛋白提取	18
第三节 蛋白质浓度测定	20
一、实验过程	20
二、实验结果	21
第四节 糖蛋白处理对策	22
一、概述	22
二、实验步骤	23
第五节 蛋白质样品 SDS-PAGE 检测	23
一、灌制 SDS 聚丙烯酰胺凝胶 (垂直平板电泳)	23
二、SDS-PAGE 过程	26
三、蛋白质检测	27
四、凝胶干燥	27

五、电泳结果	29
六、讨论	31
第三章 IPG-Dalt 双向电泳之第一向——IPG 等电聚焦	32
第一节 仪器设备	32
一、IEF 仪器及配件	32
二、常规仪器	33
第二节 实验耗材、试剂及溶液配制	33
一、实验耗材和试剂	33
二、溶液配制	33
第三节 IPG 胶条溶胀	34
一、IPG 胶条溶胀（不含样品）	34
二、IPG 胶条溶胀（含样品）	36
第四节 IEF 实验操作	36
一、IEF 产品盒组装	36
二、IEF 程序及参数设置	41
第四章 IPG-Dalt 双向电泳之第二向——SDS-PAGE	45
第一节 IPG 胶条平衡	45
一、器材和试剂	45
二、平衡缓冲液配制（参见附录 T、U）	45
三、实验过程	45
第二节 SDS-PAGE 实验操作——垂直板 SDS-PAGE 系统	46
一、北京六一仪器厂电泳系统	46
二、Amersham Biosciences 公司垂直电泳系统	48
第三节 SDS-PAGE 实验操作——Multiphor II 水平 SDS-PAGE 系统	50
一、灌胶模具（瑞典 Amersham Biosciences 公司）	50
二、模具组装	50
三、灌制凝胶	50
四、电泳操作过程	52
第四节 蛋白质点检测和凝胶保存	59
第五章 实验结果和讨论	60
第一节 实验结果	60
一、SKOV ₃ 细胞蛋白双向电泳结果	60
二、血清样品双向电泳结果	64
三、组织样品双向电泳结果	67
第二节 讨 论	72
一、样品材料对双向电泳的影响	72

二、不同的蛋白质提取方法比较	73
三、配基修饰蛋白检测	74
四、IPG 胶条 pH 范围和长度选择	74
五、上样方式比较	75
六、垂直 SDS-PAGE 和水平 SDS-PAGE 比较	76
七、不同浓度 SDS 凝胶对分离效果的影响	78
八、两种交联剂对银染背景的影响	78
九、水质对银染的影响	79
 第六章 故障及排除方法	 80
 参考文献	 86
 附录 储备液配制	 91

第一章 双向电泳概述

第一节 双向电泳的概念和原理

双向电泳全称为聚丙烯酰胺凝胶双向电泳，是一种由任意两个单向聚丙烯酰胺凝胶电泳组合而成的、在第一向电泳后继而在与第一向垂直的方向进行第二向电泳的分离方法。这种组合的目的是对混合的样品，如蛋白质混合组分进行精细地分离，但如果组成双向电泳的两个单向电泳所依据的分离原理相同，那么所得到的分离斑点基本成对角线分布，分离效果并不比单向的聚丙烯酰胺凝胶电泳优越，因此两个单向电泳所依据的分离原理必须有很大不同（何忠效，张树政，1999）。据此，广义的双向电泳可分为三类，见表 1-1。

表 1-1 双向电泳的种类

第一向	第二向
1. 等电聚焦 (载体两性电解质 pH 梯度或固相 pH 梯度)	常规电泳 SDS 电泳 免疫电泳 等速电泳 电泳转移
2. SDS 电泳	等电聚焦
3. 不连续电泳	不连续电泳

(自郭尧君，2005)

20 世纪 70 年代中期，O'Farrell 首先建立了以聚丙烯酰胺凝胶为介质的双向电泳 (two dimensional electrophoresis, 2-DE) 技术，其原理是根据蛋白质的等电点和分子量的不同，在 pH 梯度胶中进行等电聚焦 (isoelectric focusing, IEF)，然后再在 SDS 聚丙烯酰胺凝胶中进行第二向分离 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels electrophoresis, SDS-PAGE) (O'Farrell P. 1975)。样品经过电荷和质量两次分离后，可以得到分子的等电点 (isoelectric point, pI)、分子量 (molecular weight, MW) 等信息。与通常的 SDS 电泳相比，分离得到的是点，而不是条带 (图 1-1)。目前，双向电泳大都是指这种

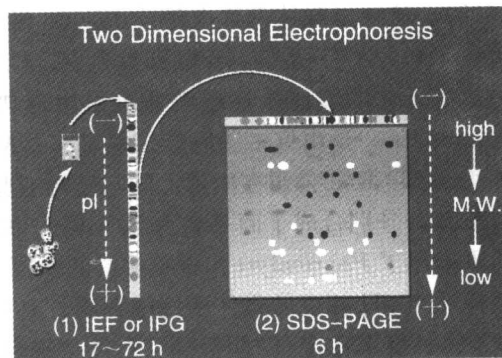


图 1-1 双向电泳原理示意图

(自 <http://www.lecb.ncifcrf.gov/phosphoDB/2d-description.html>)

第一向为等电聚焦，第二向为 SDS 聚丙烯酰胺凝胶的电泳，简称为 IEF/SDS-PAGE，它是目前所有电泳技术中分辨率最高、信息最多的技术（郭尧君，2005）。

第二节 双向电泳技术概述

作为 IEF 与 SDS-PAGE 相结合的双向电泳，其发展与完善是与 IEF 和 SDS-PAGE 的发展密不可分的。

一、等电聚焦（IEF）

等电聚焦是 20 世纪 60 年代建立的蛋白质分离技术，基本原理是利用蛋白质分子或其他两性分子等电点的不同，在一个稳定的、连续的 pH 梯度中进行分离和分析。IEF 具有分辨率高（0.01 pH 单位）、抵消扩散作用、可使浓度较低的样品达到高度浓缩等优点，不仅可以用来分离两性大分子，还可以通过测定等电点来鉴定蛋白质（何忠效，张树政，1999）。根据建立 pH 梯度的原理不同，可以分为载体两性电解质 pH 梯度（Carrier ampholytes pH gradients）和固相 pH 梯度（Immobilized pH gradients）。前者是在电场中通过两性缓冲离子建立 pH 梯度，后者是将缓冲基团作为凝胶介质的一部分，分辨率比前者提高一个数量级（郭尧君，2005）。根据电泳方式的不同，IEF 可分为管状、薄层、垂直和水平等电聚焦。

1. 载体两性电解质 pH 梯度 IEF

载体两性电解质是一类可溶性的两性小分子，在其等电点附近具有很高的缓冲能力。其 pH 梯度形成原理是：没有电场时，由于载体两性电解质分子所带正负电的基团数目相等，总净电荷为零，溶液的 pH 值大约是该溶液 pH 范围的平均值；引入电场后，载体两性电解质分子将向阴极或阳极移动，当到达净电荷为零的位置停止，由于具有很高的缓冲能力，使溶液环境的 pH 等于其本身的等电点（pI），这样，所有的载体两性电解质分子用增加 pI 级数的方法在阴、阳极之间达到其各自的位置而给出一个 pH 梯度（郭尧君，2005）。这种以载体两性电解质 IEF 和 SDS-PAGE 为基础的双向电泳被称为 O'Farrell 系统或 ISO-DALT 系统（ISO 即等电点，DALT 即道尔顿）。

市场化的载体两性电解质最早由瑞典 LKB 公司于 20 世纪 60 年代推出，商品名为 Ampholine，是由许多脂肪族多氨基多羧酸的异构体和同系物组成的。随后，德国 Serva 和美国 Bio-Rad 公司在丙烯乙胺与乙烯亚胺缩合并蒸馏得到的多胺混合物中引入磺酸基或磷酸基，分别合成了商品名为 Servalyte 和 Biolyte 的载体两性电解质，瑞典 Pharmacia 公司则推出了 Pharmalyte。介质材料的研制开发，促进了 IEF 的发展，人们可以根据需要选择适当 pH 梯度的载体两性电解质分离目的蛋白质。然而由于操作复杂繁琐、实验过程中 pH 梯度不稳定（“阴极漂移”或“平台现象”）、重复性差等原因，在很长一段时间里，IEF 仅局限于数量有限的实验室。

2. 固相 pH 梯度 IEF

20 世纪 70 年代末、80 年代初建立的固相 pH 梯度（Immobilized pH gradients, IPG）等电聚焦克服了传统载体两性电解质 IEF 的缺点，已成为目前 IEF 的主要手段。固相 pH 梯度与载体两性电解质 pH 梯度的区别在于前者的介质不是两性分子，pH 梯度在

凝胶聚合时形成。原理是利用一系列具有弱酸或弱碱性质的丙烯酰胺衍生物在其滴定终点附近形成 pH 梯度并参与丙烯酰胺共价聚合，从而形成固定的 pH 梯度（郭尧君. 2005）。这种以固相 pH 梯度 IEF 和 SDS-PAGE 为基础的双向电泳被称为 IPG-DALT 系统。

与传统载体两性电解质 IEF 相比，固相 pH 梯度范围可以事先计算，具有极高的分辨率（可达 0.001 pH 单位），pH 梯度稳定不漂移，上样量大（可达毫克级），对碱性蛋白有很好分离，盐离子干扰小，使用灵活，操作简单，重复性好等优点。但是 IPG 的导电性比载体两性电解质低 100 倍左右，需要使用高电压（2 000 V 以上）才能使蛋白质聚焦。曾有报道，与两性电解质电泳相比，使用 IPG 作介质进行 IEF 会损失很多疏水性蛋白质，并推测 IPG 混合物中的碱性丙烯酰胺衍生物与某些蛋白质发生疏水相互作用而使蛋白质富集于 IPG 之上（Rimpilainen MA, Righetti PG. 1985; Righetti PG, et al. 1987）。但近年的研究显示，样品最初溶解程度以及由第一向到第二向转移的程度与疏水性蛋白质丢失有关（Adessi C, et al. 1997; Wilkins MR, et al. 1998）。

IPG 凝胶制备比载体两性电解质凝胶复杂，类似于常规 SDS 聚丙烯酰胺梯度凝胶的灌制，一般实验室多用预制胶。目前商品化的 IPG 凝胶一般制成有塑料膜支持的干胶条（Dry strip），便于运输和保存（-20℃ 保存，有效期为 1 年）。按 pH 范围可分为宽 pH 范围、窄 pH 范围、微小 pH 范围胶条（表 1-2），宽范围胶条主要用于组织细胞全蛋白质的分离（如 pH 3~10, pH3~11 NL），窄范围和微小范围胶条可接受更高上样量，进一步提高分辨率，对目标蛋白有更好分离（如 pH 4~7, pH 5.5~6.7）（Langen H, Röder D. 2000）。

表 1-2 市场出售的 IPG 胶条规格和厂商

生产商	Amersham Biosciences	Bio-Rad Laboratories Inc.	Severn Biotech	Sigma	Invitrogen
商品名	Immobiline™ Dry Strips	ReadyStrip™ IPG Strips	Severn IPG Strips	ProteoGel™ IPG Strips	Zoom® Strips
pH 范围*	宽范围 3~10, 3~10 NL**, 3~11 NL	3~10, 3~10 NL	3~10, 3~10 NL	3~10	3~10 NL
	窄范围 4.0~5.0, 4~7, 6~9, 6~11, 3~7 NL, 7~11 NL	3~6, 4~7, 5~8, 7~10	3~6, 5~8, 7~10	3~5, 4~7, 5~8, 6~11, 8~11	4~7, 6~10
	微小范围 3.5~4.5, 4.5~5.5, 5.0~6.0, 5.3~6.5, 5.5~6.7, 6.2~7.5, 3~5.6 NL	3.9~5.1, 4.7~5.9, 5.5~6.7, 6.3~8.3	3.9~4.9, 4.7~5.7, 5.5~6.5, 6.3~7.3, 8.0~9.0, 8.8~9.8, 9.5~10.5		
干胶长度* (mm)	70, 110, 130, 180, 240	70, 110, 170, 180, 240	70, 110, 170, 210, 240	110, 180	70

*：统计资料截止至 2005 年 8 月；

**：非线性（nonlinear）。

3. 等电聚焦运行方式

以两性电解质为介质的等电聚焦多采用管状方式运行，可分为液相和固相两种，Invitrogen 公司的 ZOOM® IEF 组分分离器即采用水平管状液相方式对样品进行粗聚焦，以达到组分分离的目的。Bio-Rad 公司推出的管式凝胶 IEF 双向电泳系统（Mini-

PROTEAN® 2-D Electrophoresis Cell 和 PROTEAN® II xi 2-D Electrophoresis Cell) 提高了效率, 可使 IEF 和 SDS-PAGE 在 1d 内完成。IPG 等电聚焦多采用水平方式, Amersham Biosciences 公司的 Multiphor II 和 IPGphor 系统, Bio-Rad 公司的 PROTEAN IEF Cell 都为水平等电聚焦提供了良好的平台, 是目前双向电泳首选仪器。Invitrogen 公司的 ZOOM® IPGRunner™ Mini-Cell 则支持以 IPG 为载体的垂直等电聚焦。

4. IPG 等电聚焦上样方式及三种仪器性能比较

对于目前广泛应用的 IPG 水平等电聚焦, 根据研究目的和胶条 pH 范围, 上样方式可选择溶胀上样、样品杯上样或滤纸桥上样 (表 1-3 和表 1-4)。IPGphor 和 PROTEAN IEF Cell 都配有不同长度的胶条槽 (Strip Holder), 适于溶胀上样, 使溶胀、上样、等电聚焦一步完成。如果采用样品杯上样, 这两个系统都需配置独立的样品杯上样胶条槽。Multiphor II 为多功能电泳系统, 即可进行等电聚焦, 也可进行常规 SDS 凝胶电泳和 Western 杂交的电转移过程。与之匹配的 Immobiline Drystrip Kit 很适于样品杯上样或滤纸桥上样, 但胶条的溶胀则需配置 Immobiline DryStrip Reswelling Tray (溶胀盘) (表 1-5)。Görg A 等 (2003) 介绍了直接在 Multiphor II 冷却盘上进行等电聚焦的方法, 省去覆盖大量石蜡油的烦琐操作。通常的溶胀上样, 高分子蛋白质难于进入 IPG 胶条, 解决办法是在溶胀时加以 30~50 V 低电压促进其进入凝胶, 即主动溶胀上样 (Active in-gel rehydration), 由于 Multiphor II 的溶胀盘是外置的, 目前仅 IPGphor 和 PROTEAN IEF Cell 可进行这项操作。也可采用样品杯上样加以克服。有报道, 在酸性端和碱性端同时上样比仅在一端上样可检测出更多的蛋白质点 (Langen H, et al. 1997), 但对于含有大量酸性或碱性蛋白的特殊样品, 最佳的选择是在距其 pI 远的一端上样, 否则会有大量蛋白沉积在其 pI 附近而堵塞样品杯出口。

表 1-3 Multiphor II 系统上样方式选择 (Amersham Biosciences)

pH 范围	分析性研究		制备性研究
3.5~4.5			
4.0~5.0			
4.5~5.5			
5.0~6.0			
5.5~6.7	溶胀上样	样品杯上样	溶胀上样
4~7, 3~7			
3~10			
3~10 NL			
6~9			滤纸桥上样
6~11			

表 1-4 IPGphor 系统上样方式选择 (Amersham Biosciences)

pH 范围	分析性研究		制备性研究
	Strip Holder	Cup Loading Strip Holder	Cup Loading Strip Holder
3.5~4.5			
4.0~5.0			
4.5~5.5			
5.0~6.0			
5.5~6.7	溶胀上样	溶胀上样	样品杯上样
4~7, 3~7			
3~10			
3~10 NL			
6~9			滤纸桥上样
6~11			

表 1-5 等电聚焦上样方式选择

IEF 系统	上样方式
Multiphor II	溶胀、样品杯、滤纸桥
IPGphor	
Strip Holder	(主动) 溶胀
Cup Loading Strip Holder	溶胀、样品杯、滤纸桥
PROTEAN IEF Cell	
Focusing Tray	(主动) 溶胀
Cup Loading Tray	样品杯

Leila HC 和 Kelvin HL (2000) 对三个系统比较后发现，Multiphor II 检测出的蛋白质点最多，PROTEAN IEF cell 次之；而 PROTEAN IEF Cell 具有最好的重复性，IPGphor 次之。这三个系统的配置和参数比较参见表 1-6。

表 1-6 Multiphor II、IPGphor 和 PROTEAN IEF cell 配置和参数比较

仪 器	Multiphor II (Amersham Biosciences)	IPGphor (Amersham Biosciences)	PROTEAN IEF Cell (Bio-Rad)
电 源	外置 (EPS3500 或 EPS3500XL)	内置	内置
电 压	35~3 500 V	0~10 000 V	50~10 000 V
电 流	1~150 mA	0~1.5 mA	0~3 mA
功 率	1~100 W	0~12 W	0~3 W

续表

仪 器	Multiphor II (Amersham Biosciences)	IPGphor (Amersham Biosciences)	PROTEAN IEF Cell (Bio-Rad)
控温设备	外置 (MultiTemp III)	内置	内置
控温方式	循环水浴	半导体模块	半导体模块
控温范围	5~90℃	18~25℃	10~25℃
必需配件	Immobiline DryStrip Reswelling Tray 和 Immobiline Drystrip Kit	Strip Holders and Covers 和 IPGphor Manifold	Rrhydration Tray, Focusing Tray 和 Cup Loading Tray
主动溶胀上样	不可	可	可
IPG 胶条规格	7 cm、11 cm、13 cm、18 cm、24 cm	7 cm、11 cm、13 cm、18 cm、24 cm	7 cm、11 cm、17 cm、18 cm、24 cm
电泳胶条数量	1~12 条	1~12 条	24 条 (7 cm)、1~12 条 (11 cm、17 cm、18 cm、24 cm)

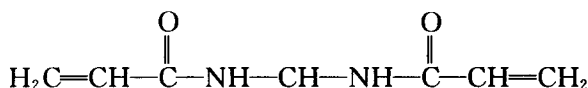
二、SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 全称十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels electrophoresis, SDS-PAGE), 是目前大家所接受的测定蛋白质亚基分子量的有效方法。其原理是作为变性剂和助溶试剂的阴离子去污剂 SDS 破坏蛋白质二、三级结构, 并与蛋白质结合消除了不同分子间的电荷差异。这种 SDS-蛋白质亚基结合体在 SDS 聚丙烯酰胺凝胶系统中的迁移不再受蛋白质原有电荷的影响, 而主要取决于蛋白质或亚基分子量的大小, 从而得到分离。当蛋白质分子量在 15~200 kDa 之间时, 电泳迁移率与分子量的对数呈线性关系 (郭尧君, 2005), 因此可通过 SDS-PAGE 推测蛋白质的分子量。

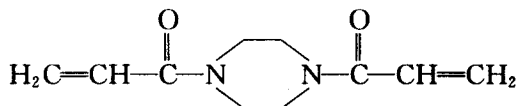
与 IEF 相比, SDS-PAGE 是相当成熟的电泳技术, 广泛应用于教学、科研、食品、医药检测等领域。作为双向电泳第二向, SDS-PAGE 技术的发展更多体现在凝胶机械强度的提高、厚度降低、凝胶面积增加、电泳仪器改进、染色背景降低等方面。

1. 交联剂与 SDS 聚丙烯酰胺凝胶机械强度和银染背景的关系

聚丙烯酰胺凝胶是丙烯酰胺和交联剂在增速剂 N, N, N', N'-四甲基乙二胺 (TEMED) 存在情况下由过硫酸铵 (APS) 产生游离氧自由基引发单体丙烯酰胺聚合。目前已知的交联剂不下十余种 (Hochstrasser DF, et al. 1988a), 其中 N, N'-甲叉双丙烯酰胺 (N, N'-methylene-bis-acrylamide, Bis) 最为常用。然而以 Bis 作交联剂灌制的凝胶在银染后会产生较高背景, 这与其分子所携带的酰胺基团有关。不含酰胺基或酰胺基完全被替代的交联剂可以很好降低银染背景, 在这类交联剂中, 哌嗪双丙烯酰胺 (piperazine diacrylamide, PDA 或 PIP) 是最好的选择。PDA 易于合成纯化, 具有很高的水溶性, 以 PDA 作交联剂灌制的凝胶不仅降低了银染背景、提高了双向电泳分辨率, 而且增加了凝胶的韧性, 便于大型凝胶的制备和操作 (Hochstrasser DF, et al. 1988a, 1988b)。



Bis



PDA

2. SDS-PAGE 缓冲系统

目前 SDS-PAGE 使用最多的缓冲系统为 Tris-甘氨酸 (0.025 mol/L Tris, 0.192 mol/L 甘氨酸, 0.1% SDS, pH 8.3) 系统 (Laemmli UK. 1970), 它可以满足一般蛋白质分离的需要, 但是对于分子量小于 15 kDa 的小蛋白或多肽, Tris-甘氨酸系统则无法很好地分离。而 Tris-Tricine 缓冲系统在分离小蛋白和多肽方面具有优势, 它通过降低多肽-SDS 复合物迁移速度而获得良好的分辨率 (Schägger H, Von Jagow G. 1987)。目前, Amersham Biosciences 公司用于水平半干 SDS-PAGE 的缓冲液条即可提供 Tris-Tricine 缓冲系统。

此外, 在制胶缓冲液中添加尿素或甘油在一定程度上也可提高多肽和小蛋白的分辨率 (Swank RT, Munkres KD. 1971)。也有报道, 乙二醇可以替代甘油用于小蛋白的分离 (Separation Technique File 112, PhastSystem, Amersham Biosciences)。

3. SDS-PAGE 运行方式

第二向 SDS-PAGE 有垂直和水平两种运行方式。垂直 SDS-PAGE 可以同时走两块以上, 甚至 12 块凝胶 (如 Ettan DALT*twelve* 系统, Amersham Biosciences), 提高了工作效率, 可以运行较厚的凝胶 (1 mm 以上), 增大上样量便于电泳后分析鉴定, 电泳过程中不需移动 IPG 胶条和电极, 操作简单, 因此垂直 SDS-PAGE 是目前双向电泳第二向的主要运行方式。水平 SDS-PAGE 则以分辨率高、速度快、灵敏度高、可使用半干技术、凝胶薄、便于保存等优点独树一帜 (郭尧君, 余添. 1996; 郭尧君. 2005; 赵从建等. 2000)。Multiphor II 系统以水平 SDS-PAGE 见长, 并可在一块 SDS-PAGE 胶板上同时走两到三根短的 IPG 胶条 (如 7 cm 或 11 cm), 减小了误差。

据 Görg A 等 (1985) 研究, 当第一向 IEF 采用同一种仪器, 第二向 SDS-PAGE 无论采用垂直方式还是水平方式, 蛋白质点的分辨率、点的大小和分布没有区别。

第三节 蛋白质样品制备

除电泳介质和仪器设备对双向电泳产生重要影响外, 样品制备也是双向电泳成功与否的关键。对于组织细胞, 首先需将其破碎, 尽可能地将蛋白质组分溶解在缓冲液中, 以便在适当的电泳条件下分离。组织细胞破碎方法包括低渗、匀浆、超声、反复冻融等, 可参见《蛋白质技术手册》(汪家政, 范明. 2000) 和《2-D Electrophoresis—Principles and

Methods》(Amersham Biosciences)。而对于体液成分,如血清、腹水、尿液等,仅需经过稀释、加热变性、溶解于适当缓冲液便可用于双向电泳 (Sanchez JC. 1998)。

一、组织细胞破碎方法

组织细胞的破碎方法取决于样品的特性 (如样品的组成、坚韧程度、实验目的等),对于易于破裂的细胞可以选择温和的裂解方法,而对坚硬的组织细胞和具有细胞壁的植物或微生物材料应选择剧烈的裂解方法 (表 1-7)。同时确保蛋白质组分不被降解和丢失,这将在第二部分中详述。

表 1-7 组织细胞破碎方法

	方法	适用对象	一般步骤
温和的裂解方法	渗透法	血细胞、组织培养细胞	将样品置于低渗液中即可使细胞破碎
	冻融法	细菌、组织培养细胞	将细胞在液氮中反复多次冻融
	去污剂法	组织培养细胞	将细胞悬浮于含有去污剂的裂解液中。如果使用的是 SDS, IEF 前可用含有过量非离子型或两性离子型去污剂的溶液稀释,或用丙酮沉淀法去除样品中的 SDS,否则会干扰 IEF
	酶法	植物组织、细菌、真菌	在等渗溶液中用合适的酶处理细胞,如用溶菌酶处理细菌细胞,溶细胞酶破碎酵母细胞等
剧烈的裂解方法	超声波法	细胞悬液	在冰浴上,用超声波短时间多次冲击细胞悬液,注意不要产生泡沫
	高压法	具有细胞壁的微生物	将细胞悬液置于预冷的压力室中,通过小孔对细胞的压力破碎细胞
	研磨法	组织、微生物	于液氮中冷冻过的样品在研钵中研碎,如果添加 Al_2O_3 或细沙将有助于研磨
	匀浆法	组织	将组织尽量剪碎,在匀浆器中加入相当于组织 5~20 倍预冷的裂解液,快速破碎细胞,以离心或过滤方式收集裂解物
	玻璃珠匀浆法	细胞悬液、微生物	将细胞悬浮于等体积预冷的裂解液中,每克细胞加入 1~3 g 预冷的玻璃珠,震荡 1 min,冰浴 1 min,重复 2~4 次

二、组织细胞裂解变性缓冲液

对双向电泳而言,如何获取组织细胞的全部蛋白质组分信息一直是人们关注的热点,也是双向电泳技术发展应用的关键。对于水溶性蛋白, PBS 和 Tris 缓冲液即可将其完全溶出,然而组织细胞中还有大量的疏水性蛋白 (如膜蛋白),很难溶于常规的缓冲液,因此增加疏水性蛋白质的溶解度一直是很多学者奋斗的目标。目前增加蛋白质溶解性的方法主要是使用离液剂 (Chaotropic agents)、去污 (垢) 剂 (Detergents)、还原剂 (Reducing agents) 和载体两性电解质 (Carrier ampholytes) 等混合缓冲液。

1. 组织细胞裂解常规组分

离液剂: 一类可以破坏蛋白质高级结构,打断非共价连接的变性剂。尿素是应用最为