

## 双向电泳操作步骤及相关试剂配制

### A. 实验过程

#### 一、实验原理：

2-DE 的第一向电泳等电聚焦是基于等电点不同而将蛋白粗步分离, 第二向 SDS-PAGE 是基于蛋白质分子量不同, 而将一向分离后的蛋白进一步分离。这样就可以得到蛋白质等电点和分子量的信息。

#### 二、实验步骤：

##### 1.样品的溶解

取纯化后的晶体蛋白 3.0mg, 加入 300 $\mu$ l 裂解液(1mg 蛋白:100 $\mu$ l 裂解液)振荡器上振荡 10min 左右,共处理一个小时。其中每隔 10 ~ 15 分钟振荡一次,然后 13200rpm 离心 15min 除杂质, 取上清分装, 每管 70 $\mu$ l, —80℃保存。

##### 2.Bradford 法测蛋白含量

取 0.001g BSA (牛血清白蛋白) 用 1ml 超纯水溶解,测定 BSA 标准曲线及样品蛋白含量。

取 7 个 10ml 的离心管, 首先在 5 个离心管中按次序加入 0 $\mu$ l,5 $\mu$ l,10 $\mu$ l,15 $\mu$ l,20 $\mu$ l 的 BSA 溶解液, 另 2 管中分别加入 2 $\mu$ l 的待测样品溶液, 再在每管中加入相应体积的双蒸水 (总体积为 80 $\mu$ l), 然后, 各管中分别加入 4ml 的 Bradford 液 (原来配好的 Bradford 液使用前需再取需要的剂量过滤一遍方能使用), 摇匀, 2min 在 595nm 下, 按由低到高的浓度顺序测定各浓度 BSA 的 OD 值, 再测样品 OD 值。(测量过程要在一个小时内完成)。例如：

编号	蛋白量 (ul)	Buffer(ul)Bradford(ml)	OD595 值
1	0	4	0
2	5	4	0.024
3	10	4	0.061

4	15	4	0.091
5	20	4	0.116

Bt4            2    78    4    0.079

Bt4            4    76    4

转 Bt4    2    78    4    0.075

转 Bt4    4    76        4

标准曲线方程式:  $Y = aX + b$ . 其中 Y 为 OD 值, X 为蛋白含量。a、b 通过作图输入数据可知

相关系数通过输入数据, 作图, 软件分析可得

OD 值测量过程:

比色皿用 70%的乙醇保存, 待用时用双蒸水冲洗, 再用无水乙醇冲洗, 双蒸水冲洗, 再加入待测样品溶液润洗, 然后, 加入样品, 测定 OD 值。

3.双向电泳第一向---IEF (双向电泳中一律使用超纯水)

### 3.1 水化液的制备

称取 2.0mg 的 DTT, 用 700 $\mu$ l 水化液储液溶解后,加入 8 $\mu$ l 0.05% 的溴酚兰, 3.5 $\mu$ l (0.5%v/v) IPG buffer (pH 3-10)振荡混匀, 13200rpm 离心 15min 除杂质, 取上清。

在含 300 $\mu$ g 蛋白 (经验值) 的样品溶解液中加入水化液, 至终体积为 340 $\mu$ l, 振荡器上振荡混合,13200rpm 离心 15min 除杂质, 取上清。

### 3.2 点样, 上胶

分两次吸取样品, 每次 170 $\mu$ l,按从正极到负极的顺序加入点样槽两侧, 再用镊子拨开

Immobiline DryStrip gels (18cm, pH 3—10)胶条, 从正极到负极将胶条压入槽中,胶面接触加入的样品。注意: 胶条使用前, 要在室温中平衡 30 分钟; 加样时, 正极要多加样, 以防气泡的产生; 压胶时不能产生气泡; 酸性端对应正极, 碱性端对应负极; 样品加好后, 加同样多的覆盖油(Bio-Rad), 两个上样槽必须与底线齐平。

### 3.3 IPG 聚焦系统跑胶程序的设定 (跑胶温度为 20°C)

S1 (30v,12hr,360vhs,step)

S2 (500v,1hr,500vhs,step)

S3 (1000v,1hr,1000vhs,step)

S4 (8000v,0.5hr,2250vhs,Grad)

S5 (8000v,5hr,40000vhs,step)共计 44110vhs,19.5 小时

其中 S1 用于泡胀水化胶条, S2 和 S3 用于去小离子, S4 和 S5 用于聚焦。

### 3.4 平衡

用镊子夹出胶条,超纯水冲洗后, 在滤纸上吸干 (胶面, 即接触样品那一面不能接触滤纸, 如果为 18cm 的胶条要将两头剪去), 再以超纯水冲洗, 滤纸吸干 (再次冲洗过程也可省略), 然后用镊子夹住胶条以**正极端 (即酸性端) 向下, 负极端 (即碱性端) 向上**, 放入用来平衡的试管中 (镊子所夹的是碱性端, 酸性端留有溴酚兰作为标记), 用平衡液 A, 平衡液 B 先后平衡 15min。注:平衡时要注意保持胶面始终向上,不能接触平衡管壁。

平衡第二次时, 在沸水中煮 Marker 3min,剪两个同样大小的小纸片, 长度与一向胶条的宽度等同, 然后吸取煮好的 Marker, 转入 SDS—PAGE 胶面上, 保持紧密贴合; 同样在第二次平衡时, 煮 5%的琼脂糖 10ml。

## 4.双向电泳第二向---SDS-PAGE

### 4.1 配胶(两根胶条所用剂量)

分离胶: (T=8% 80 ml): 溶液于真空机中抽气后再加 APS 和 TEMED

30 % 丙烯酰胺储液 21.28ml

分离胶 buffer 20ml 10%APS 220 $\mu$ l TEMED 44 $\mu$ l

双蒸水 38.72ml

浓缩胶: (T=4.8% 10ml)

30 % 丙烯酰胺储液 1.6ml

浓缩胶 buffer 2.5ml 10%APS 30 $\mu$ l TEMED 5 $\mu$ l

双蒸水 5.9ml

#### 4.2 灌胶

将玻璃板洗净后,室温晾干,然后,将电泳槽平衡好,玻璃板夹好,再在玻璃板底部涂上凡士林以防漏胶,倒入正丁醇压胶,凝胶后(这时会出现三条线),用注射器吸去正丁醇,超纯水洗两次,再用滤纸除水后,倒入浓缩胶,正丁醇压胶,凝胶后,用注射器吸去正丁醇,超纯水洗两次,再加入超纯水,用保险膜封好。

#### 4.3 转移

剪两个小的滤纸片,吸取 Marker 后,放入 SDS—PAGE 胶面的一端。然后,将平衡好的 IPG 胶条贴靠在玻璃板上,加少量的 5%的琼脂糖溶液在胶面上(琼脂糖凝胶在转移前十几分钟的时候配好,水浴加热溶解,并保持烧杯中水处于沸腾状态,至用之前再拿出来),再将 IPG 胶条缓缓加入 SDS—PAGE 胶面,其中不断补加 5%的琼脂糖溶液,注意不能产生气泡。

#### 4.4 跑胶

浓缩胶 13mA 分离胶 20mA 共约 5.5 个小时

5. 银染(两根胶条所用剂量) (银染特别注意用超纯水)

5.1 固定 30min 无水乙醇 200ml+乙酸 50ml, 用超纯水定容至 500ml

5.2 敏化 30min 无水乙醇 150ml

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  1.5688g

无水乙酸钠 34g

先用水溶解  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  和乙酸钠,再加乙醇,最后定容至 500ml

5.3 洗涤 5min  $\times$  3 次

5.4 银染 20min  $\text{AgNO}_3$  1.25g 用超纯水定容至 500ml

5.5 洗涤 1min  $\times$  2 次

5.6 显影 无水  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  12.5g 用超纯水定容至 500ml

甲醛(37%)0.1ml,临时加

5.7 终止 10min EDTA— $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  7.3g 用超纯水定容至 500ml

5.8 洗涤 5min  $\times$  3 次

注: 整个双向电泳实验中全部使用超纯水, 尽量减少离子的影响。

## B. 实验相关试剂配制

### 1. Bradford 工作液

95%乙醇 25ml 先用乙醇溶解考马斯亮兰 G250，溶解完后再加磷

85%磷酸 52ml 酸，最后超纯水定容至 500ml。过滤后置于棕色瓶

考马斯亮兰 G250 0.035g 外加油皮纸保存 (Bradford 不稳定，一周内有效)

### 2. 裂解液

尿素 8M

硫脲 2M

CHAPS 4%

DTT 60 mM

Tris—base 40 mM (如果有条件可以添加 PMSF 0.5mM 和 5%的 Pharnalate)

### 3.水化液储液

尿素 8M

硫脲 2M

CHAPS 4%

Tris—base 40 mM

### 4.分离胶 buffer (pH8.8) 250ml

SDS 0.4% 1g

Tris—HCl 1.5M 45.4275g

5.浓缩胶 buffer (pH6.8) 100ml

SDS 0.4% 0.4g

Tris—HCl 0.5M 6.07g

6.凝胶储存液（30%的丙烯酰胺） 250ml

Acr 29.2% 73g

Bis 0.8% 2g

7.电极缓冲液（跑一次要配制 2500ml）

甘氨酸 43.2g 36g

Tris 9g 或 7.5g

SDS 3g 2.5g

超纯水定容至 3000ml 超纯水定容至 2500ml

8. 0.5M Tris —HCl pH 6.8 储液

6.1g Tris 先用 30ml 超纯水溶解，再用 46ml，3M HCl 调 pH6.8,再加水定容至 100ml

9. 平衡液储液

脲（即尿素） 36g

甘油 30% 30ml

SDS 1% 1g

0.5M Tris—HCl pH6.8 10ml 超纯水定容至 100ml

10.平衡液 A（一根胶条）

DTT 20mg

平衡液储液 10ml

11. 平衡液 B（一根胶条）

碘乙酰胺 300mg

平衡液储液 10ml

0.05%溴酚兰 15 $\mu$ l (平衡液 A、B 均需临时配制)

12. 0.5%琼脂糖 10ml

琼脂糖 0.05g

电极缓冲液 10ml

溴酚兰 25 $\mu$ l

补：4、5、6 的溶液需过滤后储存于 4℃ 备用。

### C. 药品

CHAPS 两性离子去垢剂 去垢剂可破坏蛋白质分子之间的疏水相互作用，

SDS 离子型去垢剂 提高蛋白质的溶解性，防止在等电聚焦时析出

尿素 离液剂 可改变或破坏氢键等次级键的结构，使蛋白质

硫脲 离液剂 变性并使蛋白失活。尿素和硫脲联合使用，可

以大大增加蛋白质的溶解性

DTT 还原剂 断裂蛋白质分子中 Cys 残基之间形成的二硫键，增加蛋白质的溶解性。但过分

提高 DTT 的浓度，由于它 pKa 在 8 左右，因而会影响 pH 梯度。DTT 在碱性 pH 下会去质

子化，等电聚焦时会损耗，导致二硫键复原，蛋白质沉淀



## **BSA Bradford 中制作标准曲线用**

无水乙醇 和磷酸一起，提供 Bradford 中的环境

磷酸 提供 Bradford 中的酸性环境

Tris 构成缓冲液的成分，可用于抗衡 pH 的变化

IPG buffer

覆盖液 即矿物油，防止水分蒸发，样品干燥。

丙烯酰胺（Acr） 以丙烯酰胺为单体，甲叉二丙烯酰胺为交联剂，

**甲叉二丙烯酰胺（Bis）在催化剂（Aps）和引发剂（TEMED）作用下，聚合交联成三维**

**网状结构**

琼脂糖

溴酚兰 指示剂作用

碘乙酰胺（IAA）平衡液 B 中使用，中和 A 液中的 DTT

**正丁醇 比聚丙烯酰胺密度小，用于凝胶制作过程中的压胶**

甘油 无机盐的良好溶剂，热稳定性好

Marker

考马斯亮兰 G250（Bradford 法用）考马斯亮兰 G250 有红、蓝两种不同颜色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 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**

甘氨酸 与 Tris 构成缓冲系统

AgNO<sub>3</sub>

EDTA 金属螯合剂，可以结合银离子，终止银染过程。