

经验方法

一种经济、简便的双向电泳方法*

高原 王国秀** 刘中来

(华中师范大学动物学实验室, 武汉 430079)

摘要 双向电泳是蛋白质分析的一门较为精确的技术. 对电泳方法进行改良并采用普通垂直薄板等电聚焦技术, 不仅大大降低了蛋白质双向电泳的成本, 而且操作过程简单, 是一种用于初步分析蛋白质的较好方法. 在中华卵索线虫 (*Ovomermis sinensis*) 雌雄成虫可溶性差异蛋白的分析中获得了较满意的结果. 这一改良方法的建立, 可望促进双向电泳的广泛应用.

关键词 双向电泳, 改良, 中华卵索线虫, 蛋白质分析

学科分类号 Q51

1994年 Wilkin 和 Williams 提出蛋白质组这一概念后, 蛋白质组在生物学界得到了充分关注^[1]. 蛋白质组的开门技术——双向电泳 (two-dimensional electrophoresis, 2-DE) 也随之成为生物研究的热点技术之一.

双向电泳由 O'Farrell^[2]于 1975 年首次建立, 并成功分离约 1 000 个 *E. coli* 蛋白质. 双向电泳基本原理是第一向为等电聚焦 (isoelectrofocusing, IEF), 根据蛋白质的等电点不同进行分离; 第二向为 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 按亚基分子质量大小进行分离. 经过电荷和质量两次分离后, 可以得到蛋白质分子的等电点和分子质量信息^[3]. 双向电泳一般包括样品制备、IEF 电泳、平衡、SDS 电泳、染色和保存.

目前, 双向电泳主要采用 IPG-DALT 技术, 多数是从国外直接购买商品胶条进行, 少数用自制的胶条进行. 然而, 商品化的 IPG 胶条相当昂贵, 自制胶条过程复杂, 而且胶条性质不稳定, 同时还需要专一的双向电泳设备^[3]. 本文介绍了一种利用普通电泳设备进行全程操作的新方法, 并成功地中华卵索线虫 (*Ovomermis sinensis*) 可溶性总蛋白进行了分离.

1 材料和方法

1.1 材料

中华卵索线虫采自河南省上蔡地区农田, 经实验室繁殖一代而得.

1.2 仪器

DYY-III-6B 型稳压/稳流电泳仪, DYY-III-B

型电泳槽及相配套的板子、梳子 (北京六一电泳仪器厂).

1.3 方法

1.3.1 样品的制备: 取中华卵索线虫数条, 用 0℃灭菌水洗涤三次, 洗净后加入 1 ml 冰预冷研磨缓冲液 (0.1 mol/L NaCl, 0.01 mol/L Tris pH 7.0, 0.001 mol/L EDTA pH 8.0, 100 mg/L PMSF) 进行研磨 (冰上操作), 研磨充分后, 离心 (12 000 g, 4℃, 10 min), 取上清备用, 按 5:4:1 的比例将上清、样品溶解液 (58% 尿素, 2% chaps, 5% pH 3~9.5 两性电解质, 5% 巯基乙醇) 及甘油充分混匀, 即得到蛋白质样品上样液.

1.3.2 双向电泳:

a. 第一向等电聚焦电泳

制胶: H₂O 2.7 ml, 30% 丙烯酰胺母液 (30 g 丙烯酰胺 + 0.8 g 甲叉双丙烯酰胺, 定容到 100 ml 后, 抽滤) 1.0 ml, 两性电解质 pH 3~9.5 48 μl, pH 5~7 240 μl, 超纯尿素 3.0 g, 10% 过硫酸胺 12.5 μl, TEMED 10 μl. 将上述溶液配好混匀后迅速倒入已经组装好的垂直板 (其为 DYY-III-B 型电泳槽所用的玻璃板, 其中夹一张一面被砂纸磨毛的塑料胶片, 毛面朝内, 以作载体) 中, 插入梳子 (深浅由上样量决定), 胶聚合约 1 h 后, 小心地拔出梳子, 轻轻地调整上样槽, 单蒸水冲洗干净.

*国家自然科学基金 (30170129) 和湖北省自然科学基金 (2001J088) 资助项目.

**通讯联系人.

Tel: 027-87658870, E-mail: dcsygy@yahoo.com.cn

收稿日期: 2002-08-26, 接受日期: 2002-10-16

电泳: 上槽电泳液为 20 mmol/L NaOH; 下槽电泳液为 10 mmol/L H_3PO_4 (电泳液要现配现用)。上板后, 先在上样槽中加入样品液, 后缓缓加入上槽电泳液 (此时动作一定要慢, 以防样品溢出), 然后接好电源, 开始用恒压电泳 30 min, 后用电压 200 V 电泳 13 h 以上, 电泳的整个过程要启用冷凝装置。

b. 平衡

等电聚焦电泳后, 取下胶片, 此时胶已经牢牢地粘附在胶片上。对应点样槽, 切下 0.5 cm 宽的胶条放入盛有平衡液 (5% 巯基乙醇, 62.5 mmol/L Tris-HCl pH 6.8, 2.3% SDS, 10% 甘油) 的容器中, 平衡 30 min^[4]。

c. 第二向 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

在进行等电聚焦电泳时, 可将第二向的胶制好, 放冰箱中备用。第二向的胶制法与普通的 PAGE 胶一样, 具体配方可参照《分子克隆技术试验指南》(第二版)。不同的是, 浓缩胶不插梳子, 而是用双蒸水封住, 待其聚合, 使用前, 将水吸干

净。然后, 将平衡好的胶条取出, 用滤纸吸干胶片背面的平衡液, 再放入第二向胶板中, 胶板一侧插一单孔梳子 (点蛋白质分子质量标准)。接着, 用少量的浓缩胶封住胶条, 排除气泡, 待聚合后, 拔出梳子。上板后, 倒入电泳缓冲液, 再点上分子质量标准, 插上电极, 稳流电泳。

d. 染色

使用银染方法进行染色^[5]。

2 实验结果

用中华卵索线虫为材料, 提取其可溶性蛋白样品, 经双向电泳分析, 结果如图 1 所示。从图 1 中可以看出, 蛋白质样品可通过本方法得以良好的分离, 图象清晰, 蛋白点细密。而且利用此方法分析中华卵索线虫雌虫 (图 1a)、雄虫 (图 1b) 的可溶性蛋白, 所得结果具明显差异, 图 1 中 I、II 区分别表示了雌雄成虫的差异蛋白, 且结果与图 1c 中单向电泳结果吻合 (箭头所示)。

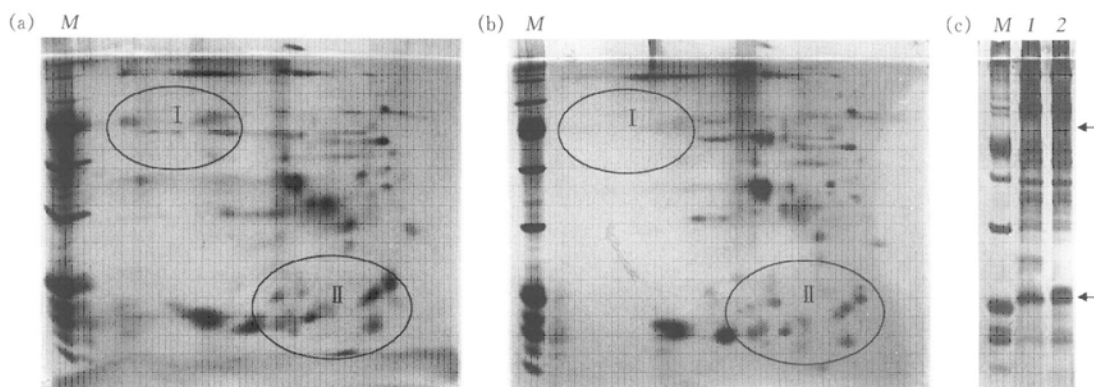


Fig.1 Soluble proteins of *Ovomermis sinensis* analyzed by eletrophoresis

(a) soluble proteins of male imago by 2-DE; (b) soluble proteins of female imago by 2-DE; (c) soluble proteins of *Ovomermis sinensis* analyzed by SDS-PAGE. 1: male; 2: female; M: protein molecular mass marker.

3 讨论

蛋白质组研究的发展是以双向电泳技术作为核心的, 对蛋白质组组成的分析是蛋白质组学与基因组学相对应的主要内容, 它要求对蛋白质组进行表征, 即所有蛋白质的分离与鉴定及其图谱化。而这所有的一切均需依赖于双向电泳技术的成熟, 从而从样品中分离出蛋白质。目前, 大部分都采用购买进口干胶条, 后进行处理, 采用专一的双向电泳仪器。但这一套方法相当昂贵, 多用于专门的蛋白质组研究, 而对于蛋白质组初步分析和仅仅想进行蛋

白质差别比较或者单纯分离特定蛋白质的研究而言, 采用进口胶条及配套设备则比较耗财耗力。我们建立的这一套双向电泳方法所采用的仪器均是平时常用的普通电泳设备, 无需专门的双向电泳设备, 实验药品多是便宜、常规的药品, 操作过程简单, 实验结果明显。而且制作一块等电聚焦的胶可根据梳子的齿制出多个胶条, 同时分析多个样品, 这样可进行批量的分析, 大大减少工序。

我们采用这种方法, 成功地对中华卵索线虫雌雄成虫的可溶性蛋白进行了分离, 并顺利找到了两者之间的差异蛋白。得到的实验结果与单向 SDS-

PAGE的结果吻合,从另一个侧面验证了本方法的可行性.

综上所述,本实验方法较之于当前常用的双向电泳方法而言,具有简便、经济的特点.对于一些不具有专业设备、资金有限的实验室从事蛋白质分离、比较分析是十分理想的.在操作熟练的情况下,此方法同样可以进行蛋白质组的初步分析.

参 考 文 献

- 1 Wasinger V C. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: mycoplasma genitalium. Electrophoresis, 1995, 16 (7): 1090~1094
- 2 O'Farrell P H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J Biol Chem, 1975, 250 (10): 4007~4021
- 3 赵从建, 刘少君, 郭尧君. 蛋白质组分析的开门技术——双向电泳. 现代科学仪器, 2000, 5: 16~19
Zhao C J, Liu S J, Guo J Y. Modern Scientific Instruments, 2000, 5: 16~19
- 4 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社, 2000. 140~145
Wang J Z, Fan M. A Handbook of Protein Techniques. Beijing: Science Press, 2000. 140~145
- 5 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术. 北京: 科学出版社, 1999. 141~143
Guo Y J. Experimental Techniques of Protein Electrophoresis. Beijing: Science Press, 1999. 141~143

An Economic and Convenient Method for Two- dimensional Electrophoresis*

GAO Yuan, WANG Guo- Xiu** , LIU Zhong- Lai

(Laboratory of Zoology, Central China Normal University, Wuhan 430079, China)

Abstract A new improved two - dimensional electrophoresis (2 - DE) was established using single - dimensional eletrophoresis instruments. It can reduce the cost of the experiments greatly and it is easily operated. And most of the soluble proteins of *Ovomermis sinensis* were successfully separated.

Key words two- dimensional electrophoresis, improvement, *Ovomermis sinensis*, protein analysis

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30170129) and The Nature Science Foundation for Hubei Province (2001J008).

** Corresponding author. Tel: 86-10-87658870, E-mail: dcsy@yahoo.com.cn

Received: August 26, 2002 Accepted: October 16, 2002