

中国生命科学论坛精华帖之 ——

蛋白质实验 (1)



中国生命科学论坛

www.bioon.com

蛋白质的研究是现在生物学领域的一个主要的研究方向。现在我们把来自中国生命科学论坛的部分精华帖子整理出来，与大家共同讨论。希望对大家都有所帮助。同时欢迎您来到 <http://www.bioon.net>。

一、蛋白质提取

1、植物组织蛋白质提取方法 (summer)

- 1、根据样品重量 (1g 样品加入 3.5ml 提取液，可根据材料不同适当加入)，准备提取液放在冰上。
- 2、把样品放在研钵中用液氮研磨，研磨后加入提取液中在冰上静置 (3-4 小时)。
- 3、用离心机离心 8000rpm40min4 或 11100rpm20min4
- 4、提取上清液，样品制备完成。

蛋白质提取液：300ml

- 1、1M tris-HCl (PH8) 45ml
 - 2、甘油 (Glycerol) 75ml
 - 3、聚乙烯吡咯烷酮 (Polyvinylpyrrolidone) 6g
- 这种方法针对 SDS-PAGE，垂直板电泳！

2、植物组织蛋白质提取方法 (summer)

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 β -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 (见第二部分)，然后可分装放入 -80 备用。

药品：

提取液：含 10% TCA 和 0.07% 的 β -巯基乙醇的丙酮

裂解液：2.7g 尿素 0.2g CHAPS 溶于 3ml 灭菌的去离子水中 (终体积为 5ml)，使用前再加入 1M 的 DTT 65ul/ml。

这种方法针对双向电泳，杂质少，离子浓度小的特点！当然单向电泳也同样适用，只是电泳的条带会减少！

3、肠黏膜组织蛋白质提取方法 (newinbio)

目的：WESTERN BLOT 检测凋亡相关蛋白的表达

应用 TRIPURE 提取蛋白质步骤：

含蛋白质上清液中加入异丙醇：(1.5ml 每 1ml TRIPURE 用量)

倒转混匀，置室温 10min

离心：12000 g，10min，4 度，弃上清

加入 0.3M 盐酸胍/95% 乙醇：(2ml 每 1ml TRIPURE 用量)

振荡，置室温 20min

离心：7500g，5 min，4 度，弃上清

重复 0.3M 盐酸胍/95% 乙醇步 2 次

沉淀中加入 100%乙醇 2ml

充分振荡混匀, 置室温 20 min

离心: 7500g, 5min, 4 度, 弃上清吹干沉淀

1%SDS 溶解沉淀

离心: 10000g, 10min, 4 度

取上清-20 度保存 (或可直接用于 WESTERN BLOT)

存在的问题: 加入 1%SDS 后沉淀不溶解, 还是很大的一块, 4 度离心后又多了白色沉淀, SDS 结晶?

测浓度, 含量才 1mg/ml 左右。

解决: 提蛋白试剂盒, 另外组织大小适中, 要碎, 立即加 2X BUFFER, 然后煮 5 - 10 分钟, 效果很好的。

4、植物蛋白提取 (yog)

Protein extraction buffer (Camiolo buffer):

100 ml = (0.075M Potassium Acetate) 0.736g

(0.3M) NaCl 1.753g

(0.1M) L-arginine basic salt 1.742g

(0.01M) EDTA-HCl 0.292g

(0.25%) Triton X-100 250. ul

up to 100 ml with dH₂O. pH 7.4. Then 0.2 um filter.

步骤:

1. Freeze tissue in liquid nitrogen.
2. Rinse in PBS then mince.
3. Add 1 ml Camiolo extraction buffer per 100 mg of tissue.
4. Homogenize for 1 minute at 4°C.
5. Spin at 3,000. rpm/15 minutes/4°C.
6. Remove supernatant and save in another tube.
7. If necessary, dialyze the supernatant against PBS with 50mM/L Tris-HCl pH 7.4.

5、水稻苗, 叶鞘, 根蛋白提取 (ynibcas)

1、200 毫克样品置于冰上磨碎

2、加 lysis buffer, 离心, 10000rpm, 4 度, 5min 取上清

3、重复离心 5min

lysis buffer: urea np-40 ampholine 2-me pvp-40

6、秧苗蛋白质样品制备 (sigma)

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% β-巯基乙醇), 混匀, -20 沉淀 1 小时, 4 度, 15000 r/min 离心 15 min, 弃上清, 沉淀复溶于 1.5ml 冷丙酮(含 10 mM β-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 β-巯基乙醇)所得沉淀低温冷冻真空抽干。

按每 mg 干粉加入 20 μl (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 温育 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

7、植物根中蛋白质的抽取 (phenol)

- (1) sample, 液氮研磨
- (2) 装 1.5 ml centrifuge 用 tube
- (3) 加 1M KH₂PO₄+K₂HPO₄ 700 ul
- (4) 12000 rpm, 4 度, 10-15minite
- (5) 取上层液, 蛋白质就在里面

8、全组织蛋白提取 (hgp)

SDS extraction followed by acetone precipitation – simple extraction protocol that does not require phenol. Recommended start protocol for whole tissue extractions.

1. Grind 1 g of fresh tissue to a powder with liquid nitrogen in a mortar and pestle.
2. Add 5 mL of extraction media (0.175 M Tris-HCl, pH 8.8, 5% SDS, 15% glycerol, 0.3 M DTT) directly to mortar and continue grinding for an additional 30 sec.
3. Filter homogenate through two layers of miracloth into a 50 mL Falcon tube at room temperature.
4. Immediately add 4 volumes of ice cold 100% acetone to filtered homogenate, mix by vortexing and place at -20 C for at least one hour to precipitate proteins.
5. Centrifuge at 5000 g for 15 min to collect precipitated protein, decant supernatant.
6. Gently blot residual acetone from container with Kimwipe and then wash pellet in 15-20 mL of cold 80% acetone. Be sure to thoroughly break-up pellet by pipetting, vortexing or sonication.
7. Repeat steps 5 and 6.
8. Collect final protein precipitate by centrifugation at 5000 g for 15 min and dry pellet by inverting on Kimwipe for 15 min at 37 C.
9. Resuspend final pellet in 0.5-1 mL of IEF extraction solution (8 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 2% Triton X-100, 50 mM DTT, 0.2% pH 3-10 ampholytes) by pipetting and vortexing at 25-30 C. Incubate sample for 1 h at room temperature with agitation. Do not heat sample under any circumstances as this will lead to carbamylation of proteins.
10. Centrifuge for 10 min at 12000 g and use supernatant to rehydrate IPG strips.
11. If protein quantitation is necessary, precipitate protein sample with TCA or acetone prior to performing Bradford or Lowry assay as detergents and reducing agents interfere with these assays.

Phenol extraction followed by methanolic ammonium acetate precipitation – an effective protocol for sample preparation from protein-poor, recalcitrant tissues such as plants (see Hurkman and Tanaka, 1986, Plant Physiology 81:802-80)

9、材料：细菌蛋白 (puc18)

用甲醇提取的，冻干后用缓冲液溶解的。样品缓冲液是一般的。其中含有 2% 的 SDS，20mmol 的 2-巯基乙醇。

10、线粒体蛋白的提取 (bioon)

Modification by bioon

Materials and reagents:

homogenizing buffer:

100 mM mannitol
10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)
5 mM MgCl₂
1 mM EGTA
1 mM DTT
leupeptin (0.1 ug/ml)
0.1M Na₂CO₃

Methods:

- 10*6 Cells were washed with ice-cold PBS and lysed by homogenizing in 1 ml buffer (ice-cold) containing 100 mM mannitol, 10 mM Tris, 5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, leupeptin (0.1 ug/ml)
- Subjected to Polytron homogenization for three-four bursts of 3-10 s each at a setting of 6.5.
- Intact cells and nuclei were separated by centrifugation at 120 g for 5 min at 4
- Supernatants were centrifuged at 10,000 g for 10 min to collect the heavy (mitochondrial) membrane pellet.
- Cytoplasmic fractions were obtained by centrifuging supernatants at 100,000 g for 30 min.
- Resuspended pellet to 0.25mg/ml in fresh preparation of 0.1M Na₂CO₃ (pH 11.5)
- Incubated on ice for 30 min.
- Ultracentrifugation at 100000g for 1h at 4 to precipitate the mitochondria membrane protein. And the supernatants are mitochondrial matrix. 0.5mg of proteins in mitochondria can get 100ug of proteins (the alkali-resistant fractions)

Ref.: PNAS, 2002, 99: 12825-12830

本方法只适用于提大鼠细胞线粒体蛋白，而不适用于线粒体功能检测

二、蛋白质浓度测定方法

1、通过 OD₂₆₀, OD₂₈₀ 计算蛋白质样品的浓度：蛋白质浓度(mg/ml)=1.45*A₂₈₀-0.74A₂₆₀

2、几种蛋白质测定方法的比较：[\(davidzrock \)](#)

蛋白质的定量，是生物化学中最常用、最基本的分析方法之一。目前常用的有以下几种方法：定氮法、紫外吸收法、Lowry 法 (Folin-酚试剂法)、Bradford 法 (考马斯亮蓝法)、BCA 法等。

定氮法比较繁复，但较准确，往往以定氮法测定的蛋白质作为其他方法的标准蛋白。

紫外吸收法简便、灵敏、快速，不消耗样品，测定后样品仍能回收利用。缺点是准确度较差，干扰物质多，用标准曲线法测定蛋白质含量时，对于那些与标准蛋白中酪氨酸和色氨酸含量差异大的蛋白质，有一定的误差。

Lowry 法是较早发展的一种灵敏的检测方法，最低灵敏度为 5 微克，通常测定范围 20 - 250 微克。优点是灵敏度高，缺点是费时较长，要精确控制操作时间，标准曲线不是严格的直线形式，且专一性差，干扰物质较多。

Bradford 法是灵敏度更高的一种方法，优点有：灵敏度高，比 lowry 法高 4 倍左右，最低检测达 1 - 5 微克；测定快速、简便，染色稳定；干扰物质少。缺点是用于不同蛋白质测定时有较大的偏差；仍有干扰，如 SDS、去污剂、Triton x100 等；标准曲线有轻微的非线性。

3、Bradford 法测定蛋白质含量

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：

样品号	蛋白量 /vg	标准溶液 1mg/mlBSA/vl	实验缓冲液 /vl	Bradford 试剂 /ml	A ₅₉₅
1	0	0	100	3	0
2	2.5	2.5	97.5	3	0.120
3	2.5	2.5	97.5	3	0.130
4	5	5	95	3	0.250
5	5	5	95	3	0.215
6	7.5	7.5	92.5	3	0.331
7	7.5	7.5	92.5	3	0.364
8	10	10	90	3	0.460
9	10	10	90	3	0.442
10	12.5	12.5	87.5	3	0.531
11	12.5	12.5	87.5	3	0.562
12	15	15	85	3	0.633
13	15	15	85	3	0.617
14	17.5	17.5	82.5	3	0.684
15	17.5	17.5	82.5	3	0.650
16	20	20	80	3	0.721
17	20	20	80	3	0.727

取样品即可测量。

三、蛋白质双向电泳过程与体会

双向电泳 IEF (**sigma**)

IEF (not IPG) /SDS-PAGE

最简单的装备推荐如下,适合于没多少 money 做 IPG 又想做“热”的所谓蛋白质组的,嘻嘻!

IEF 用 Bio-rad 的圆盘电泳槽(不行用国产的吧,不推荐), SDS-PAGE 用六一厂的就可以了(ft,六一厂应该给我 money 吧,给你做广告了)(money 不是很多的强烈推荐六一的,买进口电泳槽的钱留出来测搞出的差异蛋白质的序列吧,呵呵)

BIO-RAD 的圆盘电泳槽,国产的不推荐,因为上槽 Bio-rad 的铂金丝凹进去了一点,不是很进去,而国产的凹得太进去了以至于电聚焦时产生的气泡绕在铂金丝一圈,影响电聚焦。

双向电泳

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% β -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 β -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 β -巯基乙醇)所得沉淀低温冷冻真空抽干。

按每 mg 干粉加入 20 μ 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 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 μ l 上述用 UKS 液制得的蛋白质样品中加入 40 μ l 水及 50 μ l 20%三氯乙酸, 冰浴 30min 后, 4 , 4000 r/min 离心 15min, 弃上清, 再加入 100 μ l 冷丙酮, 同上离心 5min, 弃上清, 冻干沉淀, 用 100 μ l PBS 溶液复溶, 并按 Bradford (1976) 的程序测定蛋白质浓度。

说实话, 好象 Bradford 法不太好做

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, 呵呵, 很容易的; 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%丙烯酰胺 (ACR 28.38 BIS 1.62)

0.15 ml Am 3.5-10

0.375ml Am 5-7

8 微升 10%AP

1.8 微升 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,适当长一点的时间好一些,我一般是头天下午灌胶,第2天下午才开始跑电泳。待胶聚合好后,除去Parafilm并吸去顶部的覆盖液,加样80 μ g,上面再小心加入50mmol/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50mmol/L NaOH液,下槽(正极)为25mmol/L H₃PO₄。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,特别是冬天,我的方法是温控仪控制 暖风机 在37度 暖风机和电泳槽在一个大的纸箱(密封)里。呵呵,应该可以想象得到吧,第一向温度特别重要,不然,电聚焦肯定做不好。

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 μ 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。当然,刚开始做的时候肯定不熟,很不爽,有时候你会唱想哭却又哭不出来,呵呵,熟悉了就快了,注射器 枪头 玻璃管必须为一直线,小心不要把注射器的头搞断了。

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微升枪头,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,想什么时候跑SDS-PAGE就什么时候跑。绝招哦,不要随便乱传,嘿嘿!还可以马上看一下,胶条上有蛋白质没有,有的话一下就可以看见了。那些说什么放在平衡液里,-20度的,肯定不行,呵呵!就跟你用考染IEF胶条一样的,带,可能先在12%的TCA里面看不见,不过你再把它放在水里面,泡一会带就出来了。不过在平衡之前,要用dd H₂O泡30min,而且要换至少5次水,每次用不同的小平皿。

注意到下级液 磷酸部分的胶条没,是不是有一节约2cm左右,比较突出,没有膨大的部分呀!只是在TCA泡的时候磷酸段有一小截变白的速度比较慢,大约3cm左右,呵呵!

对要进行第二向SDS-PAGE的胶条则必须用平衡液[2.3%SDS,62.5mmol/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。一般我是把第2次用过的当成第一次的用。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)

选用DYY型(北京六一仪器厂生产)电泳槽(规格为200 \times 200 \times 1mm),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。over!

做之前,一定要保证,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,凹来凸去的就不要用了。玻璃版能用硅化剂最好不过了。防止从边上漏,我用透明胶(约4cm宽),封住两边,下面还是用2%的琼脂封。灌好电极缓冲液[25mmol/L Tris,192mmol/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 \times 20min;水洗6 \times 5min;0.02%硫代硫酸钠1min;水洗3 \times 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 $3 \times 20s$;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)显色到你所希望的程度,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:我去年 4,5 月时,通常染色都定在中午,12 点多;温度最好是 20 度左右,(这个温度我也没控制的)

100%TCA

领一瓶 TCA 500g 的那种 按分子克隆上的好像是直接加 200 多 ml 水就成 100%TCA 了

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

注意定容!配好后用 1.5ml 管分装! -70 度保存

注意 这两个溶液 配的时候 比如配 50ml 用 100ml 的烧杯 用量筒量 50ml 水 倒如烧杯里面,用记号笔标上刻度,然后把水倒掉,再称 尿素 小量加水,因为尿素加水后体积会变大,再 37 度水浴锅里溶,然后加其它成分,最后再定到 50ml

UKS 液 (含 9.5M Urea, 5mMK₂CO₃,1.25%SDS,0.5%DTT,2% Ampholine(3.5~10),6% Triton X-100)

	25ml	50ml
Urea	14.25g	28.5g
K ₂ CO ₃	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 β -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 μ 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 10mg DTT) 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 μ 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 β -巯基乙醇的丙酮

裂解液: 2.7g 尿素 0.2g CHAPS 溶于 3ml 灭菌的去离子水中 (终体积为 5ml), 使用前再加入 1M 的 DTT 65 μ l/ml。

平衡缓冲液: 1.5M Tris - Cl pH 8.8 6.7ml, 尿素 72.07g, 87% 的甘油 69ml, SDS 4g, 溴酚蓝少许。

溶胀液: 尿素 12g, CHAPS 0.5g, 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 0.5 μ l/100 μ l, DTT 1.5 μ l/100 μ l。

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 × 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 1000ml

10%SDS：SDS5g 溶于无菌水中总体积 50ml

10%的过硫酸胺：0.1g 溶于无菌水中总体积 1ml

SDS 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

注意事项：

1、样品的问题：

样品制备是做好 2-d 的关键，这句话好象有点多余，如果样品中离子浓度过大，根本做不了 2d，我开始的时候由于提取方法有问题，结果浪费了很多时间和 IPG 胶条，真的很心痛呀！另外再说明一点，最好用新鲜的样品提取蛋白质，蛋白点的差异很大，新鲜的样品点多，而我用存放在-80 的样品跑出来效果差了很多呀！如果你不确定你的蛋白提的如何，建议你先跑 SDS-PAGE。检验一下。关于蛋白的提取方法，我还想听听各位的建议。

2、上样量的问题，如果有条件可以做一些梯度，我的 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，这是最讨厌的问题。

3、跑一向的时候大家都差不多，根据公司的说明就可以做了。跑二向的时候我现在一般做恒压，以前做过恒流，没感觉有什么差异，还想请教各位！横流和恒压到底哪个更好一些！

4、ipg 胶条 pH 的选择：我做的是植物的花药，一般情况下酸性端点多一点，碱性端较少，我现在选用的是 pH3-10 的，我觉得很不合适（不过这个胶条是免费的），好多点没能很好的分开，如果胶条的 pH 小一点，胶条长一点（我希望能达到 18cm），效果应该比这个好很多的！

5、针对不同的蛋白质，分离胶的浓度也是可以调节的，我比较懒，就做过 10%，12.5%的，不过觉得都不适合。

Summerzhang 编辑、Gaoyx 制作
2004 年 3 月

中国生命科学论坛期待与您共同探索生命奥秘！

愿生物谷成为您的网上家园！<http://www.bioon.net>