

双向电泳过程中的常见问题及解决方法

舒海燕 曹刚强 凌华 袁保梅 田保明* (郑州大学生物工程系, 河南郑州 450001)

摘要 [目的] 研究蛋白质组双向电泳中出现的问题及解决方法。[方法] 培养野生型 K12 菌株 *Escherichia coli* MG1655, 分离其蛋白质样品并进行 SDS PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳。[结果] 双向电泳中存在蛋白质点没有出现或很少, 纵纹与横纹现象严重等问题。[结论] 该研究为以后开展双向电泳试验打下了基础。

关键词 双向电泳; 影响因素; 解决方法; 蛋白质组

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)03-01223-02

Common Problems and Resolutions among 2-Dimensional Electrophoresis

SHU Hai-yan et al (Biology Department, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450001)

Abstract [Objective] The research aimed to study the problems and resolutions among 2-dimensional electrophoresis of proteome. [Method] *Escherichia coli* MG1655 was taken for breeding materials and protein samples were isolated from it to carry out SDS PAGE polyacrylamide gel electrophoresis. [Result] During 2-dimensional electrophoresis, there existed problems such as no protein spots or few, longitudinal striation and cross striation. [Conclusion] This research paved good way for 2-dimensional electrophoresis experiment in future.

Key words 2-Dimensional electrophoresis; Factors; Resolution methods; Proteome

随着大量生物基因组序列的测定, 人们发现在生物的基因组序列中有许多序列不能够找到已有的同源序列。这些序列的功能就成为后基因组时代的重要工作内容。现有的鉴定基因功能的方法主要有 Northern 印迹、DDRT、基因芯片等。但是这些方法都没有考虑到 mRNA 的翻译以及翻译后的蛋白质修饰。而 mRNA 的翻译以及翻译后的蛋白质修饰是基因表达的重要组成部分^[1]。在蛋白质组的水平上进行基因功能鉴定恰好能够解决这些问题。对于蛋白质组分析主要在 2 个方面有快速的发展: 首先是双向电泳, 使实验室间可以对蛋白质复合物进行可重复的分析, 第二是灵敏的微量序列技术可以分析从双向电泳凝胶上复性得来的微量蛋白质^[2]。根据每个蛋白质点的等电点和分子量进行双向电泳分离能够进行大量蛋白质点的分离。

1 材料与方法

1.1 供试菌株 野生型 K12 菌株 *Escherichia coli* MG1655, 由密西西比州立大学生物系 Justin Courcelle 博士馈赠^[3]。

1.2 细菌培养 将一圈用甘油保存的大肠杆菌涂抹到新鲜的 Luria-Bertani (LB) 培养基上, 37℃ 培养过夜。为消除培养差异, 挑一个单克隆在一个最小的 fresh Luria-Bertani (LB) broth^[4] 培养基上 37℃ 摇床过夜培养到 $OD_{600} = 1.0$ 。过夜培养物用预热的 LB 培养基稀释到 $OD_{600} = 0.1$, 然后在 37℃ 条件下培养到 $OD_{600} = 0.5$, 再将这些培养物按 1:2 比例在 LB 培养基中稀释, 分为 20 份, 每份 25 ml 放在摇菌管中。将样品分为 20 份意味着在培养过程中出现的任何偏差都会被考虑。培养基成分和药品均购自 Sigma 公司 (St. Louis, MO, USA) 及 BDH 公司 (Poole, UK) 并灭菌。

1.3 蛋白质样品的制备 参照 Yan 等^[5] 的方法进行。大肠杆菌细胞在 4℃ 条件下离心 10 min (12 000 r/min), 将沉淀用漂洗缓冲液 (10 mmol/L Tris, pH 值 8.0, 5 mmol/L Mg(Ac)₂) 进行漂洗 2 次。离心, 将沉淀用变性缓冲液 (10 mmol/L Tris, pH 值 8.0, 5 mmol/L Mg(Ac)₂, 8 mmol/L 脲, 4% W/V CHAPS) 重悬,

置于冰上 30 min。用超声波处理 3~4 次, 每次 30 s。在得到清澈的溶液后, 离心, 收集上清。蛋白质的总量用比色法测定。

1.4 IPG 胶条的水化与等电聚焦电泳 将 50~100 μg 样品和重泡液充分混合, 加入 DTT (18 cm 胶条用 0.98 g) 和 IPG 缓冲液 (18 cm 胶条用 1.75 μl), 定容至 350 μl, 胶条用矿物油覆盖。等电聚焦在 20℃ 下进行, 基本设置如下: 重泡液 12 h; 500 V, 1 h; 1 000 V, 1 h; 8 000 V, 6 h。

1.5 IPG 胶条平衡 在 SDS 平衡液 A (6 mmol/L 尿素, 30% 甘油, 2% SDS, 1% DTT, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 值 8.8) 中轻缓震荡平衡 15 min。在 SDS 平衡液 B (6 mmol/L 尿素, 30% 甘油, 2% SDS, 2.5% 碘乙酰胺, 痕量溴酚蓝, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 值 8.8) 中轻缓震荡平衡 15 min。

1.6 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳 参照文献 [6] 方法进行。

1.7 蛋白染色 主要参照文献 [7] 方法进行。

2 结果与分析

图 1 中存在的问题主要是没有蛋白质点出现, 只有条带。主要原因是: 等电聚焦不充分; 上样量过大。

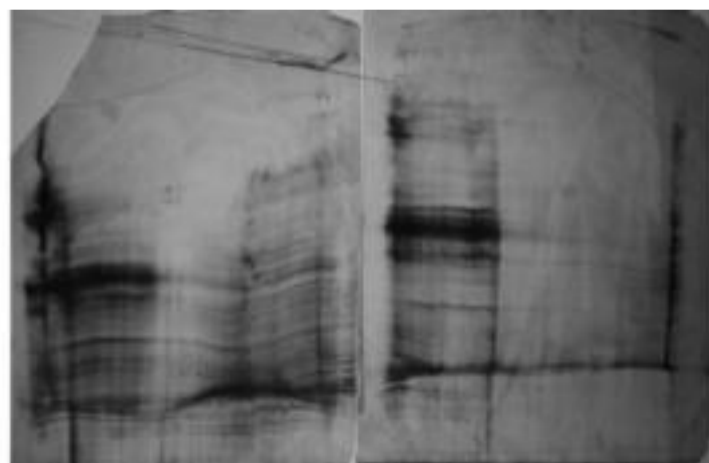


图 1 等电聚焦不充分的双向电泳结果

Fig.1 Two-dimensional electrophoresis result of insufficient isoelectric focusing

图 2 中存在的主要问题有: 蛋白质点太少; 蛋白质点拖尾; 碱性蛋白质少。引起的原因主要是: 等电聚焦不充分; 蛋白质样品内含有不溶性细胞碎片; 蛋白质样品内盐分过多。

图 3 中存在的问题主要有: 蛋白质点横纹现象严重; 凝

作者简介 舒海燕 (1975-), 女, 河南罗山人, 讲师, 从事遗传学研究。

* 通讯作者, 教授, E-mail: shuhy@zzu.edu.cn。

胶上有纵纹出现;蛋白质点少;背景呈现黄色。引起的原因主要有:等电聚焦不充分;蛋白质样品纯度不够;双向电泳前胶条平衡不充分。

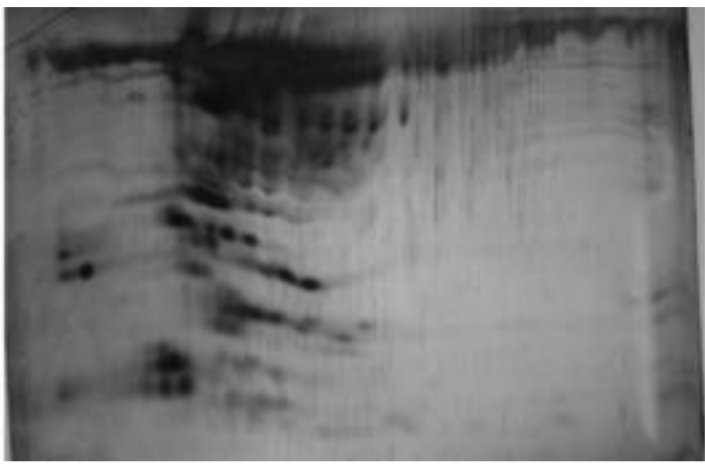


图2 蛋白质样品盐分过多的双向电泳结果

Fig.2 Two-dimensional electrophoresis result of over-salt protein sample

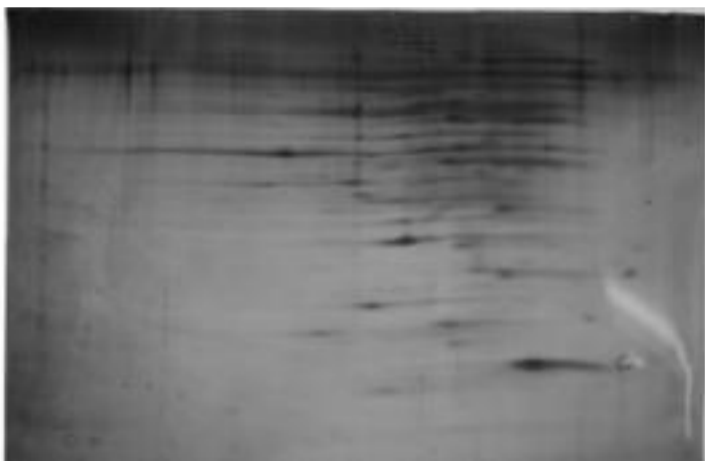


图3 横条纹严重的双向电泳结果

Fig.3 Two-dimensional electrophoresis result of serious horizontal stripe

针对这些缺点,笔者设计了以下几个方面的改进措施:超声波处理。由以前的每个样品连续处理90 s 改为处理10~20次,每次5 s左右,超声波的强度也由以前的最大改为中间偏小值,加大细胞破碎的力度;去核酸的步骤由以前的Benzazase 改变为DNase + RNase 混合处理,处理条件由37 0.5 h 改变为4 15 min,以去除横纹;样品在核酸酶处理后紧接着进行150 000 r/min,30 min 的离心处理,取上清分成多个小份,每份100 μ l 储存于-70 备用,以除去细胞碎片;蛋白质样品从细菌一开始离心就一直处于冰上,离心保持在4 条件下进行,蛋白质样品和凝胶胶条在常温下容易变性;二向胶电泳时间缩短为15 h 左右,条件为99 V,8 h,200 V,7 h;二向胶封胶防止缓冲液渗漏时用浓度2%琼脂糖,-20 短时冷冻后滴加,快速封堵,以减少胶变形对结果造成的影响;染色过程所用水均为三蒸水,以减少因为水的质量对结果的影响。改进后电泳结果如图4 所示。

图4 出现纵条纹的可能原因有:蛋白质溶解不好;蛋白质上样量过大;聚焦过度;平衡不充分,如果需要,平衡时间可以延长到45 min,平衡缓冲液的最佳pH值为

8.8,甘油的浓度至少要达到20%;蛋白质氧化交联或者重新折叠,蛋白在二向分离时氧化容易出现纵条纹,如果样品没有烷基化,可以在含有碘代乙酰胺的第二次平衡缓冲液中进行,如果没有进行烷基化,平衡缓冲液中DTT 的浓度至少要达到1%,DTT 应该在临用前加入,不能加入过早;试剂质量差或者试剂没有正确配制,如果经常出现纵条纹,有必要检查ACR 的质量和生产日期;在二向分离时IPG 与SDS-PAGE 胶中间有空隙;IEF 后,胶条表面不平,要确保样品在IEF 前经过去盐处理;样品缓冲液中DTT 过量(大于50 mmol/L)重泡涨不充分。

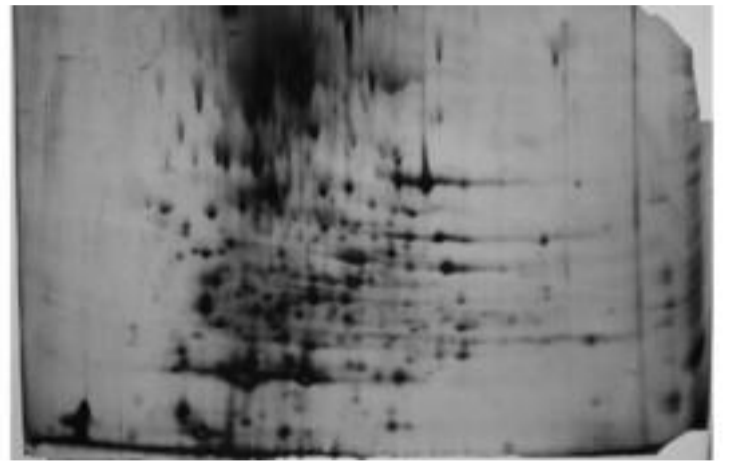


图4 纵条纹严重的双向电泳结果

Fig.4 Two-dimensional electrophoresis result of serious longitudinal stripe

横条纹出现的可能原因有:等电聚焦过度,聚焦时间过长无助于提高分辨率,但是能够引起横条纹;等电聚焦不完全;蛋白质上样量过大,重泡涨溶液体积稍微加大(大约10%)能够提高IEF 的效果,烷基化和应用强的去污剂有助于降低蛋白质之间的相互作用,从而有利于减少横条纹的出现;样品制备有问题,样品中可能混有盐分、核酸等;蛋白质溶解不好。在样品缓冲液中,保持样品处于溶解状态的主要成分是Urea、CHAPS、DTT 和其他成分,如硫脲和ASB 14 能够促进膜蛋白的溶解,这些成分的综合作用能够使横纹出现的几率降低。

参考文献

- [1] ANDERSON L, SELHAMER J. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver[J]. *Electrophoresis*, 1997, 18(3/4): 533-537.
- [2] PHILIP C. Characterization of bacterial proteomes by two-dimensional electrophoresis[J]. *Analytica Chimica Acta*, 1998, 372: 121-145.
- [3] JUSTIN C, ARKADY K, BRIAN P, et al. Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS deficient *Escherichia coli* [J]. *Genetics*, 2001, 158: 41-64.
- [4] DAMIAN GAWEL, MAGDALENA MAJSZEWSKA-TKACZYK, HECTOR JONCZYK, et al. Bialkowski. Lack of strand bias in UV-induced mutagenesis in *Escherichia coli* [J]. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(16): 4449-4454.
- [5] YAN J X, ANGELO T D, ROBIN W, et al. Fluorescence two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry based proteomic analysis of *Escherichia coli* [J]. *Proteomics*, 2002, 2: 1682-1698.
- [6] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. *Molecular cloning: a laboratory manual* [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [7] ZHAO C, WANG J, CAO M, et al. Proteomic changes in rice leaves during development of field grown rice plants [J]. *Proteomics*, 2005, 5(4): 961-972.