

双向电泳实验流程

- 样品制备 (Sample preparation)
- 固相预制胶条的水化 (IPG strip rehydration)
- 第一向等电聚焦 (IEF)
- 胶条的平衡 (IPG strip equilibration)
- 第二向 SDS-PAGE 电泳 (SDS-PAGE electrophoresis)
- 凝胶的染色及检测 (Detection/Staining)
- PDQuest 软件分析 (Software analysis)
- 质谱鉴定 (Protein identification)

目 录

第一章 实验材料

- 1. 1 IPG 预制胶条及载体两性电解质
- 1. 2 蛋白质定量试剂盒及其试剂
- 1. 3 试剂盒及其试剂
- 1. 4 化学试剂
- 1. 5 蛋白质 Marker
- 1. 6 染色试剂
- 1. 7 注意事项

第二章 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳

- 2. 1 溶液的配制
- 2. 2 SDS-PAGE 凝胶的配制
- 2. 3 操作方法
- 2. 4 注意事项

第三章 双向电泳

- 3. 1 溶液配制
- 3. 2 操作步骤
- 3. 3 注意事项

附录 1 双向电泳完整的操作步骤

附录 2 聚丙烯酰胺凝胶电泳凝胶的配置

附录 3 细胞样品的一般处理步骤

附录 4 组织样品的一般处理步骤

第一章 实验材料

1. 1 IPG 预制胶条及载体两性电解质

(一) IPG 预制胶条 (美国 Bio-Rad 公司), -20℃ 冰箱保存

IPG 预制胶条 pH 3-10,	7 cm	163-2000
IPG 预制胶条 pH 3-10,	7 cm, nonlinear (NL)	163-2002
IPG 预制胶条 pH 4-7,	7 cm	163-2001
IPG 预制胶条 pH 3-6,	7 cm	163-2003
IPG 预制胶条 pH 5-8,	7 cm	163-2004
IPG 预制胶条 pH 7-10,	7 cm	163-2005
IPG 预制胶条 pH 3-10,	17cm	163-2007
IPG 预制胶条 pH 3-10,	17 cm, nonlinear (NL)	163-2009
IPG 预制胶条 pH 4-7,	17cm	163-2008
IPG 预制胶条 pH 3-6,	17cm	163-2010
IPG 预制胶条 pH 5-8,	17cm	163-2011
IPG 预制胶条 pH 7-10,	17cm	163-2012
IPG 预制胶条 pH 3-10,	18cm	163-2032
IPG 预制胶条 pH 3-10,	18cm, nonlinear (NL)	163-2033
IPG 预制胶条 pH 4-7,	18cm	163-2034
IPG 预制胶条 pH 3-6,	18cm	163-2035
IPG 预制胶条 pH 5-8,	18cm	163-2036
IPG 预制胶条 pH 7-10,	18cm	163-2037
IPG 预制胶条 pH 3-10,	11cm	163-2014
IPG 预制胶条 pH 3-10,	11cm, nonlinear (NL)	163-2016
IPG 预制胶条 pH 4-7,	11cm	163-2015
IPG 预制胶条 pH 3-6,	11cm	163-2017
IPG 预制胶条 pH 5-8,	11cm	163-2018
IPG 预制胶条 pH 7-10,	11cm	163-2019
IPG 预制胶条 pH 3.9-5.1,	17cm	163-2020
IPG 预制胶条 pH 4.7-5.9,	17cm	163-2021
IPG 预制胶条 pH 5.5-6.7,	17cm	163-2022
IPG 预制胶条 pH 6.3-8.3,	17cm	163-2023

IPG 预制胶条 pH 3.9-5.1, 18cm	163-2038
IPG 预制胶条 pH 4.7-5.9, 18cm	163-2039
IPG 预制胶条 pH 5.5-6.7, 18cm	163-2040
IPG 预制胶条 pH 6.3-8.3, 18cm	163-2041
IPG 预制胶条 pH 3.9-5.1, 11cm	163-2024
IPG 预制胶条 pH 4.7-5.9, 11cm	163-2025
IPG 预制胶条 pH 5.5-6.7, 11cm	163-2026
IPG 预制胶条 pH 6.3-8.3, 11cm	163-2027
IPG 预制胶条 pH 3.9-5.1, 7cm	163-2028
IPG 预制胶条 pH 4.7-5.9, 7cm	163-2029
IPG 预制胶条 pH 5.5-6.7, 7cm	163-2030
IPG 预制胶条 pH 6.3-8.3, 7cm	163-2031

(二) 载体两性电解质 (美国 Bio-Rad 公司), 4℃冰箱保存

Bio-Lyte 3/10 Ampholyte, 40%, 10ml	163-1112
Bio-Lyte 3/10 Ampholyte, 40%, 25ml	163-1113
Bio-Lyte 3/5 Ampholyte, 20%, 10ml	163-1132
Bio-Lyte 4/6 Ampholyte, 40%, 10ml	163-1142
Bio-Lyte 4/6 Ampholyte, 40%, 25ml	163-1143
Bio-Lyte 5/7 Ampholyte, 40%, 10ml	163-1152
Bio-Lyte 5/7 Ampholyte, 40%, 25ml	163-1153
Bio-Lyte 6/8 Ampholyte, 40%, 10ml	163-1162
Bio-Lyte 6/8 Ampholyte, 40%, 25ml	163-1163
Bio-Lyte 7/9 Ampholyte, 40%, 10ml	163-1172
Bio-Lyte 8/10 Ampholyte, 20%, 10ml	163-1182
Bio-Lyte 5/8 Ampholyte, 40%, 10ml	163-1192
Bio-Lyte 5/8 Ampholyte, 40%, 25ml	163-1193

(三) 等电聚焦上样缓冲液 (美国 Bio-Rad 公司), 4℃冰箱保存

100×ReadyStrip Buffer, for pH 7-10 IPG Strips, 1ml	163-2093
Bio-Lyte 3/10 Ampholyte, 100×, 1ml	163-2094
100×ReadyStrip Buffer, for pH 6.8-8.3 IPG Strips, 1ml	163-2095
100×ReadyStrip Buffer, for pH 5.5-6.7 IPG Strips, 1ml	163-2096
100×ReadyStrip Buffer, for pH 4.7-5.9 IPG Strips, 1ml	163-2097

100×ReadyStrip Buffer, for pH 3.5-5.1 IPG Strips, 1ml	163-2098
1. 2 蛋白质定量试剂盒及其试剂	
Protein Assay Kit I, bovine γ -globulin standard	500-0001
Protein Assay Kit II, BSA standard	500-0002
Protein Standard I, bovine γ -globulin, 1 bottle	500-0005
Protein Assay Dye Reagent Concentrate, 450ml	500-0006
Protein Standard II, bovine serum albumin, 1 bottle	500-0007
RC DC Protein Assay Kit I, bovine γ -globulin standard	500-0121
RC DC Protein Assay Kit II, BSA standard	500-0122
1. 3 试剂盒及其试剂	
ReadyPrep Sequential Extraction Kit	163-2100
Tributylphosphine (TBP), 200mM, 0.6ml	163-2101
ReadyPrep Sequential Extraction Kit Reagent 1, 1vial	163-2102
ReadyPrep Sequential Extraction Kit Reagent 2, 1vial	163-2103
ReadyPrep Sequential Extraction Kit Reagent 3, 1vial	163-2104
ReadyPrep 2-D Starter Kit	163-2105
ReadyPrep 2-D Starter Kit Rehydration/Sample Buffer	163-2106
ReadyPrep Starter Kit Equilibration Buffer I, with DTT	163-2107
ReadyPrep Starter Kit Equilibration BufferII	163-2108
Iodoacetamide, 30g	163-2109
<i>E.coli</i> Protein Sample, lyophilized, 2.7mg	163-2110
ReadyPrep Overlay Agarose, 50ml	163-2111
1. 4 化学试剂	
尿素 Urea, 250g	161-0730
尿素 Urea, 1kg	161-0731
AG 501-X8 (D) Mixed Bed Resin	142-6425
CHAPS, 1g	161-0460
CHAPSO, 1g	161-0465
Triton X-100, 500ml	161-0407
DTT (Dithiothreitol), 1g	161-0610
DTT (Dithiothreitol), 5g	161-0611

Tributylphosphine (TBP), 200mM, 0.6ml	163-2101
溴酚蓝 (Bromophenol Blue), 10g	161-0404
矿物油 (Mineral Oil), 500ml	163-2129
SDS, 25g	161-0300
SDS, 100g	161-0301
SDS, 1kg	161-0302
Tris, 100g	161-0715
Tris, 500g	161-0716
Tris, 1kg	161-0719
Iodoacetamide, 30g	163-2109
低熔点琼脂糖, 25g	161-3111
甘氨酸, 250g	161-0717
甘氨酸, 1kg	161-0718
甘氨酸, 2kg	161-0724
丙烯酰胺 (Acrylamide), 99.9%, 100g	161-0100
丙烯酰胺 (Acrylamide), 99.9%, 500g	161-0101
丙烯酰胺 (Acrylamide), 99.9%, 2kg	161-0103
丙烯酰胺 (Acrylamide), 99.9%, 1kg	161-0107
丙烯酰胺 (Acrylamide), 99.9%, 5kg	161-0108
甲叉双丙烯酰胺 (Bis), 5g	161-0200
甲叉双丙烯酰胺 (Bis), 50g	161-0201
PDA (Piperazine Diacrylamide), 10g	161-0202
PDA (Piperazine Diacrylamide), 50g	161-0203
过硫酸氨 (Ammonium Persulfate), 10g	161-0700
过硫酸氨 (Ammonium Persulfate), 100g	161-0754
TEMED, 5ml	161-0800
TEMED, 50ml	161-0801
甘油	国产或 Sigma
硫尿	Sigma

1. 5 蛋白质 Marker

2-D SDS-PAGE Standards, 500µl	161-0320
SDS-PAGE Standards, high range, 200µl	161-0303
SDS-PAGE Standards, low range, 200µl	161-0304

SDS-PAGE Standards, broad range, 200 μ l	161-0317
Polypeptide SDS-PAGE Standards, 200 μ l	161-0326
Precision Protein Standards, unstained, 1500 μ l, 150 applications	161-0362
Precision Protein Standards, prestained, 500 μ l, 50 applications	161-0372
Kaleidoscope Polypeptide Standards, 500 μ l	161-0325
Kaleidoscope Prestained Standards, broad range, 500 μ l	161-0324
Prestained SDS-PAGE Standards, high range, 500 μ l	161-0309
Prestained SDS-PAGE Standards, low range, 500 μ l	161-0305
Prestained SDS-PAGE Standards, broad range, 500 μ l	161-0318
IEF Standards, pI range 4.45-9.6, 250 μ l	161-0310

1. 6 染色试剂

Coomassie Brilliant Blue R-250, 10g	161-0400
Coomassie Brilliant Blue G-250, 10g	161-0406
IEF Gel Staining Solution, 1L	161-0434
Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solutions Kit	161-0435
Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solutions, 1L	161-0436
Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solutions, 4 \times 1L	161-0437
Coomassie Brilliant Blue R-250 Destaining Solutions, 1L	161-0438
Coomassie Brilliant Blue R-250 Destaining Solutions, 4 \times 1L	161-0439
Bio-Safe Coomassie Stain, 1L	161-0786
Bio-Safe Coomassie Stain, 5L	161-0787
SYPRO Ruby Protein Gel Stain, 200ml	170-3126
SYPRO Ruby Protein Gel Stain, 1L	170-3125
SYPRO Ruby Protein Gel Stain, 5L	170-3138
Silver Stain Kit	161-0443
Silver Stain Plus Kit	161-0450

1. 7 注意事项

1. 双向电泳中所用的化学试剂纯度要高，至少为分析级。尽量选用进口试剂。
2. 双向电泳中使用 MilliQ 水（电导小于 1 μ S）。
3. 所有包含尿素的溶液加热温度不超过 30 $^{\circ}$ C，否则会发生蛋白氨甲酰化。

详细订货信息请参考 **BIO-RAD** 中英文目录

第二章 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳

2.1 溶液的配制

30% 聚丙烯酰胺贮液

丙烯酰胺	150g
甲叉双丙烯酰胺	4g
MilliQ 水	500ml

滤纸过滤后，棕色瓶 4℃ 冰箱保存。

1.5mol/L Tris 碱 pH8.8

Tris 碱	90.75g
MilliQ 水	400ml

用 1mol/L HCl 调 pH 至 8.8，加 MilliQ 水定容至 500ml。4℃ 冰箱保存。

0.5mol/L Tris 碱 pH6.8

Tris 碱	12g
MilliQ 水	120ml

用 1mol/L HCl 调 pH 至 6.8，加 MilliQ 水定容至 200ml。4℃ 冰箱保存。

10% SDS

SDS	10g
MilliQ 水	100ml

混匀后，室温保存。

10% Ap

Ap	0.1g
MilliQ 水	1ml (用时加水溶解)

溶解后，4℃ 冰箱保存。

10× 电泳缓冲液

(1× = 25mM Tris, 192mM glycine, 0.1% SDS, pH8.3)

Tris 碱	30g
甘氨酸	144g

SDS	10g
MilliQ 水	1L

混匀后，室温保存。

2×SDS-PAGE 上样缓冲液

0.5M pH6.8 Tris 碱	2.0ml
10% SDS	4.0ml
甘油	2.0ml
1% 溴酚蓝	0.05ml
MilliQ 水	定容至 10ml
DTT	0.154g (用时现加)

2. 2 SDS-PAGE 凝胶的配制

参见附录 1。

2. 3 操作方法

1. 将玻璃板洗净、晾干、固定。
2. 按照实验要求，配制不同浓度的分离胶。将分离胶注入玻璃板夹层中，上部用 MilliQ 水、乙醇或水饱和正丁醇封面，保持胶面平整，待分离胶聚合后，配制浓缩胶。
3. 配制好浓缩胶后，倒去分离胶表面的少量水分，然后灌入浓缩胶，插入点样梳。
4. 将待分析鉴定的蛋白质样品，加入等体积 2×SDS-PAGE 上样缓冲液，100℃水浴 3-5 分钟（插入冰浴冷却后加样）。
5. 在电泳槽加入电泳缓冲液后，小心拔去上样梳，然后用注射器洗干净加样孔，检查一下电路连通状况（注意正负及），然后关闭电源。用微量加样器分别吸取待分析样品，根据蛋白质浓度和加样孔体积决定加样量。
6. 加样完毕后，接通电源，起始时用的低电流或低电压，待样品在浓缩胶部分浓缩成一条线后，再加大电流（或电压），待溴酚蓝指示剂达到底部边缘时即可停止电泳。
7. 电泳结束后，轻轻撬开两层玻璃，取出凝胶，并切角以作记号（戴手套，防止污染胶面）。
8. 染色。

2. 4 注意事项

1. 玻璃板一定要清洗干净，否则在染色时会有不必要的凝胶背景。
2. 过硫酸铵 (Ap) 要新鲜配制。40%的过硫酸铵储存于冰箱中只能使用 2-3 天，低浓度的过

硫酸铵溶液只能当天使用。

3. 蛋白质从浓缩胶部分到分离胶部分转移为避免点脱尾和损失高分子量蛋白，应缓慢进行（场强小于 10V/cm）。

4. 用 Mini Protein 3 电泳槽时，以电流为标准，开始进样的低电流为 5mA/gel，待样品在浓缩胶部分浓缩成一条线后，再加大电流到 10-15mA/gel；以电压为标准，开始进样的低电压为 50-75V/gel，待样品在浓缩胶部分浓缩成一条线后，再加大电压到 150-200V /gel。用 Protein II 电泳槽时，以电流为标准，开始进样的低电流为 10mA/gel，待样品在浓缩胶部分浓缩成一条线后，再加大电流到 20-30mA/gel；以电压为标准，开始进样的低电压为 75-100V /gel，待样品在浓缩胶部分浓缩成一条线后，再加大电压到 300-400mA/gel。

第三章 双向电泳

3.1 溶液配制

水化上样缓冲液 (I)

尿素	8M	4.805g
CHAPS	4%	0.4g
DTT	65mM	0.098g (现加)
Bio-Lyte	0.2%(w/v)	50 μ l (40%) (现加)
溴酚蓝	0.001%	10 μ l (1% 溴酚蓝)
MilliQ 水		定容至 10ml

分装成 10 小管，每小管 1ml，-20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

水化上样缓冲液 (II)

尿素	7M	4.2g
硫脲	2M	1.52g
CHAPS	4%	0.4g
DTT	65mM	0.098g (现加)
Bio-Lyte	0.2%(w/v)	50 μ l (40%) (现加)
溴酚蓝	0.001%	10 μ l (1% 溴酚蓝)
MilliQ 水		定容至 10ml

分装成 10 小管，每小管 1ml，-20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

水化上样缓冲液 (III)

尿素	5M	3.0g
硫脲	2M	1.52g
CHAPS	2%	0.2g
SB 3-10	2%	0.2g
DTT	65mM	0.098g (现加)
Bio-Lyte	0.2%(w/v)	50 μ l (40%) (现加)
溴酚蓝	0.001%	10 μ l (1% 溴酚蓝)
MilliQ 水		定容至 10ml

分装成 10 小管，每小管 1ml，-20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

胶条平衡缓冲液母液

尿素	6M	36g
SDS	2%	2g
Tris-HCl	0.375M pH8.8	25ml (1.5M pH8.8 Tris-HCl)
甘油	20%	20ml
MilliQ 水		定容至 100ml

分装成 10 管，每管 10ml，-20℃冰箱保存。

胶条平衡缓冲液I

胶条平衡缓冲液母液	10ml
DTT	0.2g

充分混匀，用时现配。

胶条平衡缓冲液II

胶条平衡缓冲液母液	10ml
碘乙酰胺	0.25g

充分混匀，用时现配。

低熔点琼脂糖封胶液

低熔点琼脂糖	0.5%	0.5g
Tris	25mM	0.303g
甘氨酸	192mM	1.44g
SDS	0.1%	1ml (10% SDS)
溴酚蓝	0.001%	100 μ l (1%溴酚蓝)
MilliQ 水		定容至 100ml

加热溶解至澄清，室温保存。

30% 聚丙烯酰胺贮液

丙烯酰胺	150g
甲叉双丙烯酰胺	4g
MilliQ 水	500ml

滤纸过滤后，棕色瓶 4℃冰箱保存。

1.5mol/L Tris 碱 pH8.8

Tris 碱	90.75g
--------	--------

MilliQ 水 400ml

用 1mol/L HCl 调 pH 至 8.8，加 MilliQ 水定容至 500ml。4℃ 冰箱保存。

10% SDS

SDS 10g

MilliQ 水 100ml

混匀后，室温保存。

10% Ap

Ap 0.1g

MilliQ 水 1ml（用时加水溶解）

溶解后，4℃ 冰箱保存。

10× 电泳缓冲液

（1× = 25mM Tris, 192mM glycine, 0.1% SDS, pH8.3）

Tris 碱 30g

甘氨酸 144g

SDS 10g

MilliQ 水 1L

混匀后，室温保存。

3. 2 操作步骤

（一）第一向等电聚焦（用自制的电泳上样缓冲液，17cm 的胶条，pH 4-7）

1. 从冰箱中取 -20℃ 冷冻保存的水化上样缓冲液（I）（不含 DTT，不含 Bio-Lyte）一小管（1ml/管），置室温溶解。

2. 在小管中加入 0.01g DTT，Bio-Lyte 4-6、5-7 各 2.5μl，充分混匀。

3. 从小管中取出 400μl 水化上样缓冲液，加入 100μl 样品，充分混匀。

4. 从冰箱取 -20℃ 冷冻保存的 IPG 预制胶条（17cm pH 4-7），于室温放置 10 分钟。

5. 沿着聚焦盘或水化盘中槽的边缘至左而右线性加入样品。在槽两端各 1cm 左右不要加样，中间的样品液一定要连贯。注意：不要产生气泡。否则影响到胶条中蛋白质的分布。

6. 当所有的蛋白质样品都已经加入到聚焦盘或水化盘中后，用镊子轻轻的去掉预制 IPG 胶条上的保护层。

7. 分清胶条的正负极，轻轻地将 IPG 胶条胶面朝下置于聚焦盘或水化盘中样品溶液上，使得胶条的正极（标有+）对应于聚焦盘的正极。确保胶条与电极紧密接触。不要使样品溶液弄到胶条背面的塑料支撑膜上，因为这些溶液不会被胶条吸收。同样还要注意不使胶条下面的溶液

产生气泡。如果已经产生气泡，用镊子轻轻地提起胶条的一端，上下移动胶条，直到气泡被赶到胶条以外。

8. 在每根胶条上覆盖 2-3ml 矿物油，防止胶条水化过程中液体的蒸发。需缓慢的加入矿物油，沿着胶条，使矿物油一滴一滴慢慢加在塑料支撑膜上。

9. 对好正、负极，盖上盖子。设置等电聚焦程序。

10. 聚焦结束的胶条。立即进行平衡、第二向 SDS-PAGE 电泳，否则将胶条置于样品水化盘中，-20℃冰箱保存。

(二) 第二向 SDS-PAGE 电泳

1. 配制 10%的丙烯酰胺凝胶两块。配 80ml 凝胶溶液，每块凝胶 40ml，将溶液分别注入玻璃板夹层中，上部留 1cm 的空间，用 MilliQ 水、乙醇或水饱和正丁醇封面，保持胶面平整。聚合 30 分钟。一般凝胶与上方液体分层后，表明凝胶已基本聚合。

2. 待凝胶凝固后，倒去分离胶表面的 MilliQ 水、乙醇或水饱和正丁醇，用 MilliQ 水冲洗。

3. 从-20℃冰箱中取出的胶条，先于室温放置 10 分钟，使其溶解。

4. 配制胶条平衡缓冲液I。

5. 在桌上先放置干的厚滤纸，聚焦好的胶条胶面朝上放在干的厚滤纸上。将另一份厚滤纸用 MilliQ 水浸湿，挤去多余水分，然后直接置于胶条上，轻轻吸干胶条上的矿物油及多余样品。这可以减少凝胶染色时出现的纵条纹。

6. 将胶条转移至溶胀盘中，每个槽一根胶条，在有胶条的槽中加入 5ml 胶条平衡缓冲液I。将样品水化盘放在水平摇床上缓慢摇晃 15 分钟。

7. 配制胶条平衡缓冲液II。

8. 第一次平衡结束后，彻底倒掉或吸掉样品水化盘中的胶条平衡缓冲液I。并用滤纸吸取多余的平衡液（将胶条竖在滤纸上，以免损失蛋白或损坏凝胶表面）。再加入胶条平衡缓冲液II，继续在水平摇床上缓慢摇晃 15 分钟。

9. 用滤纸吸去 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶上方玻璃板间多余的液体。将处理好的第二向凝胶放在桌面上，长玻璃板在下，短玻璃板朝上，凝胶的顶部对着自己。

10. 将琼脂糖封胶液进行加热溶解。

11. 将 10×电泳缓冲液，用量筒稀释 10 倍，成 1×电泳缓冲液。赶走缓冲液表面的气泡。

12. 第二次平衡结束后，彻底倒掉或吸掉样品水化盘中的胶条平衡缓冲液II。并用滤纸吸取多余的平衡液（将胶条竖在滤纸上，以免损失蛋白或损坏凝胶表面）。

13. 将 IPG 胶条从样品水化盘中移出，用镊子夹住胶条的一端使胶面完全浸末在 1×电泳缓冲液中。然后将胶条胶面朝上放在凝胶的长玻璃板上。其余胶条同样操作。

14. 将放有胶条的 SDS-PAGE 凝胶转移到灌胶架上，短玻璃板一面对着自己。在凝胶的上方加入低熔点琼脂糖封胶液。

15.用镊子、压舌板或是平头的针头，轻轻地将胶条向下推，使之与聚丙烯酰胺凝胶胶面完全接触。注意不要在胶条下方产生任何气泡。在用镊子、压舌板或平头针头推胶条时，要注意是推动凝胶背面的支撑膜，不要碰到胶面。

16.放置 5 分钟，使低熔点琼脂糖封胶液彻底凝固。

17.在低熔点琼脂糖封胶液完全凝固后。将凝胶转移至电泳槽中。

18.在电泳槽加入电泳缓冲液后，接通电源，起始时用的低电流（5mA/gel/17cm）或低电压，待样品在完全走出 IPG 胶条，浓缩成一条线后，再加大电流（或电压）（20-30mA/gel/17cm），待溴酚蓝指示剂达到底部边缘时即可停止电泳。

19.电泳结束后，轻轻撬开两层玻璃，取出凝胶，并切角以作记号（戴手套，防止污染胶面）。

20.进行染色（按照伯乐染色试剂盒上的操作步骤）。

（三）等电聚焦程序设置

7cm 胶条

水化	50V	12-16 小时（20℃）		主动水化
S1	250V	线性	30 分钟	除盐
S2	500V	快速	30 分钟	除盐
S3	4000V	线性	3 小时	升压
S4	4000V	快速	20,000 伏小时	聚焦
S5	500V	快速	任意时间	保持

- 选择所放置的胶条数。
- 设置每根胶条的极限电流。（30-50μA/根）
- 设置等电聚焦时的温度。（20℃）

11cm 胶条

水化	50V	12-16 小时（17℃）		主动水化
S1	250V	线性	30 分钟	除盐
S2	1000V	快速	30 分钟	除盐
S3	8000V	线性	4 小时	升压
S4	8000V	快速	40,000 伏小时	聚焦
S5	500V	快速	任意时间	保持

- 选择所放置的胶条数。
- 设置每根胶条的极限电流。（50μA/根）
- 设置等电聚焦时的温度。（20℃）

17cm 胶条

水化	50V	12-16 小时 (20℃)	主动水化
S1	250V	线性 30 分钟	除盐
S2	1000V	快速 1 小时	除盐
S3	10000V	线性 5 小时	升压
S4	10000V	快速 60,000 伏小时	聚焦
S5	500V	快速 任意时间	保持

- 选择所放置的胶条数。
- 设置每根胶条的极限电流。(50-70 μ A/根)
- 设置等电聚焦时的温度。(20℃)

3. 3 注意事项

(一) 等电聚焦

1. 配好的尿素储液必须马上使用，或用 mixed-bed 离子交换树脂，清除长时间放置时尿素溶液中形成的氰酸盐，预防蛋白质的甲酰化。

2. 将水化上样缓冲液分装后再储存于-20℃。用时，只要解冻需要量，其余继续储存。水化上样缓冲液一旦溶解不能再冷冻。

3. 将水化上样缓冲液加入蛋白样品中，终溶液中 urea 的浓度需 \geq 6.5M。

4. 等电聚焦溶胀缓冲液和样品溶液中都要加入两性电解质，它能够帮助蛋白质溶解。两性电解质的选择取决于 IPG 胶条的 pH 范围。下图可提供参考。

IPG pH Range	Bio-Lyte Ampholyte(Stock)		Sample Solution Volume	
	Range	Conc.(w/v)	Per 5ml	per50ml
3-10	3-10	40%	25ul	250ul
4-7	4-6	40%	12.5ul	125ul
	5-7	40%	12.5ul	125ul
3-6	3-5	20%	25ul	250ul
	4-6	40%	12.5ul	125ul
5-8	5-8	40%	25ul	250ul
7-10	7-9	40%	12.5ul	125ul
	8-10	20%	25ul	250ul

5. 下表显示的是通常推荐使用的双向电泳第一向蛋白上样量。因为样品和样品之间存在差异，所以这种上样量仅提供参考。对于窄 pH 范围的 IPG 胶条，需要比宽 pH 范围的 IPG 胶条上更多的样品，这是因为 pI 值不在此范围内的蛋白质在等电聚焦的过程中会走出胶条。单 pH 范围 IPG 胶条的上样量是通常的 4-5 倍还多，这样就可以很好的检测低丰度的蛋白质。

IPG 胶条的长度	分析型的上样量 (银或 SYPRO Ruby 染色)	制备型的上样量 (考马斯亮蓝染色)
7 cm	10-100ug 蛋白	200-500ug 蛋白
11cm	50-200ug 蛋白	250-1,000ug 蛋白

17cm	100-300ug 蛋白	1-3mg 蛋白
------	--------------	----------

6. 样品溶液的上样体积见下表。这样就可以使胶条溶胀至它们原来的厚度（0.5mm）。胶条最少需要经过 11 小时的溶胀。即使看上去所有的缓冲液都已经被吸收，也一定要确保胶条在槽中溶胀充分的时间。只有在 IPG 凝胶的孔径已经溶胀充分后，才可以吸收大分子量蛋白质，否则大分子量蛋白质无法进入胶条。

ReadyStrip™ IPG胶条的长度	上样体积
7 cm	125ul-250ul
11cm	185ul-370ul
17cm	300ul-600ul

7. 如果在等电聚焦过程中，聚焦盘中还有很多的溶液没有被吸收，留在胶条的外面，这样就会在胶条的表面形成并联的电流通路，而在这层溶液中蛋白质不会被聚焦。这就会导致蛋白的丢失或是图像拖尾。为了减少形成并联电流通路的可能性，可以先将胶条在溶胀盒中进行溶胀，然后再将溶胀好的胶条转移到聚焦盘中。在转移过程中，要用湿润的滤纸仔细地从胶条上吸干多余的液体。

8. 戴上手套用镊子去除 IPG 胶条上的保护层。将 IPG 胶条仔细的置于溶胀缓冲液上，胶面朝下，确保整个胶面都能被浸湿。

9. 在样品溶液中加入痕量的溴酚蓝对观察溶胀过程很有帮助。在覆盖矿物油之前，可以让胶条先吸收 1 小时的液体。IPG 胶条上一定要覆盖矿物油，否则缓冲液会蒸发，使得溶液浓缩，导致尿素沉淀。作为防止缓冲液蒸发的预防措施，矿物油必须缓缓地加在每个槽内，确保完全的覆盖住每一根胶条。

10. 下面的表格给出了建议使用的 IPG 胶条运行的总 volt-hours。这仅提供参考，不同的样品需要的 volt-hours 不同。当聚焦过程无法达到最高电压时，只要最后能达到总的 volt-hours，且 7cm 胶条电压不低于 3000 伏，11cm 胶条电压不低于 5000 伏，17cm 胶条电压不低于 7000 伏，也能对样品进行充分的聚焦。

ReadyStrip IPG胶条的长度	最高电压	建议的 Volt-Hours
7 cm	8,000V	8,000-10,000V-hr
11cm	8,000V	20,000-40,000V-hr
17cm	10,000V	30,000-60,000V-hr

11. 为使样品进入胶的效率增加，采用 50V 低电压溶胀；继续以低电压梯度（200V，500V，1000V 各一个小时）进行电泳，最后达到 10000V 进行聚焦。

12. 处理预制 IPG 胶条时，一定要始终带着手套。注意预防角蛋白污染。

13. 水化上样缓冲液的成分由不同的样品决定。

14. 每根胶条蛋白质的总上样量由特定的样品，胶条的 pH 范围，及最终的检测方式决定。

下表是进行银氨染色时的蛋白质上样参考。

ReadyStrip	7cm	11cm	17cm
3-10	5-100ug	20-200ug	50-300ug
4-7	10-150ug	40-200ug	80-300ug
3-6	10-150ug	40-200ug	80-300ug
5-8	10-150ug	40-200ug	80-300ug
7-10	20-200ug	50-300ug	100-300ug

15. 所有包含尿素的溶液加热温度不超过 30℃，否则会发生蛋白氨甲酰化。引起蛋白质 pI 值的偏移。

16. 主动水化过程，会帮助大分子量的蛋白质进入胶条，但会丢失部分小分子量蛋白。

17. 当样品中含盐量较高时，建议选用慢速升压。当样品中含盐量一般时，选用线性升压。当样品中含盐量很少时，可以选用快速升压，这样可以节省聚焦时间。

18. 虽然仪器中每根胶条的极限电流可以设为 99μA/根。但一般 7cm 胶条的极限电流不超过 30μA/根，17cm 胶条的极限电流不超过 50μA/根，最好也在 30μA/根以下。

19. 可以在聚焦盘或水化盘的两端电极处搭上盐桥，这可以帮助除盐。但需注意的是，盐桥必须是湿润的但水不能太多，必要时需用滤纸吸去多余的水份。保持盐桥与电极的紧密接触。

20. 程序设置中的除盐步骤，可根据具体情况进行设置，如果样品中含盐量较高可设置多步除盐，并加长除盐时间。但这种方法只能除去很少量的盐离子，所以最好是在上样前，对样品进行除盐处理。

(二) 胶条的平衡

1. 不同长度的胶条，选用不同体积的胶条平衡缓冲液。可参考下表。

胶条的长度	7cm	11cm	17cm
胶条平衡缓冲液I	2.5ml	4ml	6ml
胶条平衡缓冲液II	2.5ml	4ml	6ml

2. 从冰箱中取出得胶条一定要先解冻。

3. 胶条平衡缓冲液I和胶条平衡缓冲液II都要现配，因为 DTT 和碘乙酰胺在室温的半衰期很短。

4. 平衡过程导致蛋白丢失约 5%-25%，还会使分辨率降低，平衡 30 分钟时，蛋白带变宽 40%，所以平衡时间不可过长。如果不经平衡，把等电聚焦凝胶直接放在第二向凝胶上会导致高分子量蛋白的纹理现象，并且等电聚焦凝胶会粘在 SDS 胶上。缩短平衡时间可以减少扩散，但同时会减少向第二向的转移。所以平衡时间要充分长（至少 2×10 分钟），但也不要超过（2×15 分钟）。

5. 平衡缓冲液包括 Tris-HCl (pH8.8)，SDS (2%)，高浓度尿素 (6M) 和甘油 (20%) 提高蛋白的溶解度并减少电内渗。第一部加入 DTT (1%) 是为了使蛋白去折叠；第二步加入碘乙酰胺是为了去除多余的 DTT (银染过程中，DTT 会导致电脱尾)。

6. 对于非常疏水的蛋白或含有二硫键的蛋白，相对于 DTT 和碘乙酰胺，TBP (tributylphosphine) 更有效。

(三) 胶条的转移

1. 在琼脂糖中加入少量的溴酚蓝，可以观察到电泳的进程。

2. 琼脂糖的温度不能太高，热的琼脂糖会加速平衡缓冲液中尿素的分解。

3. 当用琼脂糖覆盖胶条时，常会在胶条的下面或背面形成气泡。这些气泡会干扰蛋白质的迁移，所以必须去除。通常在刚加入琼脂糖后，赶快用镊子、压舌板或平头针头轻压胶条塑胶支撑膜的上方，驱赶气泡。

4. 如果选用的是普通琼脂糖，先将胶条推进玻璃板中，使之与第二向凝胶紧密接触，然后再加入琼脂糖封胶液。这是因为普通琼脂糖熔点较高，凝固较快。

(四) SDS-PAGE 凝胶电泳

1. 玻璃板一定要清洗干净，否则在染色时会有不必要的凝胶背景。

2. 过硫酸铵 (Ap) 要新鲜配制。40% 的过硫酸铵储存于冰箱中只能使用 2-3 天，低浓度的过硫酸铵溶液只能当天使用。

3. 蛋白质从一向 (IPG 胶条) 到二向 (SDS 凝胶) 的转移为避免点脱尾和损失高分子量蛋白，应缓慢进行 (场强小于 10V/cm)。

4. 用 Mini Protein 3 电泳槽时，以电流为标准，开始进样的低电流为 5mA/gel，待样品在浓缩胶部分浓缩成一条线后，再加大电流到 10-15mA/gel；以电压为标准，开始进样的低电压为 50-75V/gel，待样品在浓缩胶部分浓缩成一条线后，再加大电压到 150-200V /gel。用 Protein II 电泳槽时，以电流为标准，开始进样的低电流为 10mA/gel，待样品在浓缩胶部分浓缩成一条线后，再加大电流到 20-30mA/gel；以电压为标准，开始进样的低电压为 75-100V /gel，待样品在浓缩胶部分浓缩成一条线后，再加大电压到 300-400mA/gel。

附录 1 双向电泳完整的操作步骤

(一) 第一向等电聚焦

1. 从冰箱中取-20℃冷冻保存的水化上样缓冲液(I) (不含 DTT, 不含 Bio-Lyte) 一小管 (1ml/管), 置室温溶解。
2. 在小管中加入 0.01g DTT, Bio-Lyte 4-6、5-7 各 2.5 μ l, 充分混匀。
3. 从小管中取出 400 μ l 水化上样缓冲液, 加入 100 μ l 样品, 充分混匀。
4. 从冰箱中取-20℃冷冻保存的 IPG 预制胶条 (17cm pH 4-7), 室温中放置 10 分钟。
5. 沿着聚焦盘或水化盘中槽的边缘至左而右线性加入样品。在槽两端各 1cm 左右不要加样, 中间的样品液一定要连贯。注意: 不要产生气泡。否则影响到胶条中蛋白质的分布。
6. 当所有的蛋白质样品都已经加入到聚焦盘或水化盘中后, 用镊子轻轻的去掉预制 IPG 胶条上的保护层。
7. 分清胶条的正负极, 轻轻地将 IPG 胶条胶面朝下置于聚焦盘或水化盘中样品溶液上, 使得胶条的正极 (标有+) 对应于聚焦盘的正极。确保胶条与电极紧密接触。不要使样品溶液弄到胶条背面的塑料支撑膜上, 因为这些溶液不会被胶条吸收。同样还要注意不使胶条下面的溶液产生气泡。如果已经产生气泡, 用镊子轻轻地提起胶条的一端, 上下移动胶条, 直到气泡被赶到胶条以外。
8. 在每根胶条上覆盖 2-3ml 矿物油, 防止胶条水化过程中液体的蒸发。需缓慢的加入矿物油, 沿着胶条, 使矿物油一滴一滴慢慢加在塑料支撑膜上。
9. 对好正、负极, 盖上盖子。设置等电聚焦程序。
10. 聚焦结束的胶条。立即进行平衡、第二向 SDS-PAGE 电泳, 否则将胶条置于样品水化盘中, -20℃冰箱保存。

(二) 第二向 SDS-PAGE 电泳

1. 配制 10%的丙烯酰胺凝胶两块。配 80ml 凝胶溶液, 每块凝胶 40ml, 将溶液分别注入玻璃板夹层中, 上部留 1cm 的空间, 用 MilliQ 水、乙醇或水饱和正丁醇封面, 保持胶面平整。聚合 30 分钟。一般凝胶与上方液体分层后, 表明凝胶已基本聚合。
2. 待凝胶凝固后, 倒去分离胶表面的 MilliQ 水、乙醇或水饱和正丁醇, 用 MilliQ 水冲洗。
3. 从-20℃冰箱中取出的胶条, 先于室温放置 10 分钟, 使其溶解。

4. 配制胶条平衡缓冲液I。

5. 在桌上先放置干的厚滤纸，聚焦好的胶条胶面朝上放在干的厚滤纸上。将另一份厚滤纸用 MilliQ 水浸湿，挤去多余水分，然后直接置于胶条上，轻轻吸干胶条上的矿物油及多余样品。这可以减少凝胶染色时出现的纵条纹。

6. 将胶条转移至溶胀盘中，每个槽一根胶条，在有胶条的槽中加入 5ml 胶条平衡缓冲液I。将样品水化盘放在水平摇床上缓慢摇晃 15 分钟。

7. 配制胶条平衡缓冲液II。

8. 第一次平衡结束后，彻底倒掉或吸掉样品水化盘中的胶条平衡缓冲液I。并用滤纸吸取多余的平衡液（将胶条竖在滤纸上，以免损失蛋白或损坏凝胶表面）。再加入胶条平衡缓冲液II，继续在水平摇床上缓慢摇晃 15 分钟。

9. 用滤纸吸去 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶上方玻璃板间多余的液体。将处理好的第二向凝胶放在桌面上，长玻璃板在下，短玻璃板朝上，凝胶的顶部对着自己。

10. 将琼脂糖封胶液进行加热溶解。

11. 将 10×电泳缓冲液，用量筒稀释 10 倍，成 1×电泳缓冲液。赶走缓冲液表面的气泡。

12. 第二次平衡结束后，彻底倒掉或吸掉样品水化盘中的胶条平衡缓冲液II。并用滤纸吸取多余的平衡液（将胶条竖在滤纸上，以免损失蛋白或损坏凝胶表面）。

13. 将 IPG 胶条从样品水化盘中移出，用镊子夹住胶条的一端使胶条完全浸没在 1×电泳缓冲液中。然后将胶条胶面朝上放在凝胶的长玻璃板上。其余胶条同样操作。

14. 将放有胶条的 SDS-PAGE 凝胶转移到灌胶架上，短玻璃板一面对着自己。在凝胶的上方加入低熔点琼脂糖封胶液。

15. 用镊子、压舌板或是平头的针头，轻轻地将胶条向下推，使之与聚丙烯酰胺凝胶胶面完全接触。注意不要在胶条下方产生任何气泡。在用镊子、压舌板或平头针头推胶条时，要注意是推动凝胶背面的支撑膜，不要碰到胶面。

16. 放置 5 分钟，使低熔点琼脂糖封胶液彻底凝固。

17. 在低熔点琼脂糖封胶液完全凝固后。将凝胶转移至电泳槽中。

18. 在电泳槽加入电泳缓冲液后，接通电源，起始时用的低电流（5mA/gel/17cm）或低电压，待样品在完全走出 IPG 胶条，浓缩成一条线后，再加大电流（或电压）（20-30mA/gel/17cm），待溴酚蓝指示剂达到底部边缘时即可停止电泳。

19. 电泳结束后，轻轻撬开两层玻璃，取出凝胶，并切角以作记号（戴手套，防止污染胶面）。

20. 进行染色。

附录 2 聚丙烯酰胺凝胶电泳凝胶的配置

表 1 配制 Tris-甘氨酸 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离胶所用溶液

溶液成分	不同体积 (ml) 凝胶液中各成分所需体积 (ml)							
	5	10	15	20	25	30	40	50
6%								
水	2.6	5.3	7.9	10.6	13.2	15.9	21.2	26.5
30%丙烯酰胺溶液	1	2	3	4	5	6	8	10
1.5 mol/L Tris (pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10%过硫酸氨	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.004	0.008	0.012	0.016	0.02	0.024	0.032	0.04
8%								
水	2.3	4.6	6.9	9.3	11.5	13.9	18.5	23.2
30%丙烯酰胺溶液	1.3	2.7	4	5.3	6.7	8	10.7	13.3
1.5 mol/L Tris (pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10%过硫酸氨	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.003	0.006	0.009	0.012	0.015	0.018	0.024	0.03
10%								
水	1.9	4	5.9	7.9	9.9	11.9	15.9	19.8
30%丙烯酰胺溶液	1.7	3.3	5	6.7	8.3	10	13.3	16.7
1.5 mol/L Tris (pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10%过硫酸氨	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
12%								
水	1.6	3.3	4.9	6.6	8.2	9.9	13.2	16.5
30%丙烯酰胺溶液	2	4	6	8	10	12	16	20
1.5 mol/L Tris (pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10%过硫酸氨	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
15%								
水	1.1	2.3	3.4	4.6	5.7	6.9	9.2	11.5
30%丙烯酰胺溶液	2.5	5	7.5	10	12.5	15	20	25
1.5 mol/L Tris (pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10%过硫酸氨	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02

表 2 配制 Tris-甘氨酸 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳 5%积层胶所用溶液

溶液成分	不同体积 (ml) 凝胶液中各成分所需体积 (ml)							
	1	2	3	4	5	6	8	10
6%								
水	0.68	1.4	2.1	2.7	3.4	4.1	5.5	6.8
30%丙烯酰胺溶液	0.17	0.33	0.5	0.67	0.83	1	1.3	1.7
1.5 mol/L Tris (pH8.8)	0.13	0.25	0.38	0.5	0.63	0.75	0	1.25
10% SDS	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
10%过硫酸氨	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
TEMED	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.008	0.01

附录 3 细胞样品的一般处理步骤

1. 吸出培养液，用胰酶消化。
2. 加入 PBS，1500 g 离心 10 分钟，弃上清。重复 3 次。
3. 加入 5 倍体积裂解液，混匀（或在 2×10^6 细胞中，加入 1 ml 裂解液）（或将 1×10^6 细胞悬于 60~100 μ l 裂解液中）。
4. 液氮中反复冻融 3 次。
5. 加 50ug/ml RNase 及 200ug/ml DNase，在 4℃ 放置 15 分钟。
6. 15,000 转，4℃ 离心 60 分钟（或 40,000 转，4℃ 离心 30 分钟）。
7. 收集上清。
8. 分装样品，冻存于 -70℃。

附录 4 组织样品的一般处理步骤

1. 碾钵碾磨组织，碾至粉末状。
2. 将适量粉末状组织转移至匀浆器，加入适量裂解液，进行匀浆。
3. 加 50ug/ml RNase 及 200ug/ml DNase，在 4℃ 放置 15 分钟。
4. 15,000 转，4℃ 离心 60 分钟（或 40,000 转，4℃ 离心 30 分钟）。
5. 收集上清。
6. 分装样品，冻存于 -70℃。