

# 双向电泳系统实验操作步骤

## 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 2.5  $\mu$ l, 充分混匀。
3. 从小管中取出 400  $\mu$ l 水化上样缓冲液, 加入 100  $\mu$ l 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 $\mu$ A/根)
- 设置等电聚焦时的温度。(20℃)