



生物化学实验

电泳技术

5.7 双向凝胶电泳

北京大学 王青松 胡晓倩

概述

- 双向凝胶电泳 (Two-dimensional gel electrophoresis, 简称2-DE或双向电泳), 是由2个类型的PAGE电泳组合而成。样品经过**第一向基于蛋白质的等电点不同的等电聚焦电泳**分离, 再进行**与第一向垂直的第二向SDS-PAGE电泳**分离, 最终将复杂蛋白混合物中的蛋白质在二维平面上分开, 因此也叫二维电泳。

双向凝胶电泳是蛋白质组学研究中的重要技术。

2-DE的发展

- 1956年, Smithies, Poulik最早提出双向电泳的思路 (第1向滤纸条-第2向淀粉胶)。
- 1975年, O' Farrell等人优化了双向凝胶电泳: 根据不同生物分子间等电点及相对分子质量不同的特点, 建立了第一向IEF-PAGE, 第二向SDS-PAGE的双向分离技术, 建立了高分辨的双向电泳技术, 分离了大约1000个大肠杆菌蛋白。
- 1982年, 发明了固相化pH梯度 (Immobilized pH gradient, IPG)的IPG胶条。

2-DE的特点

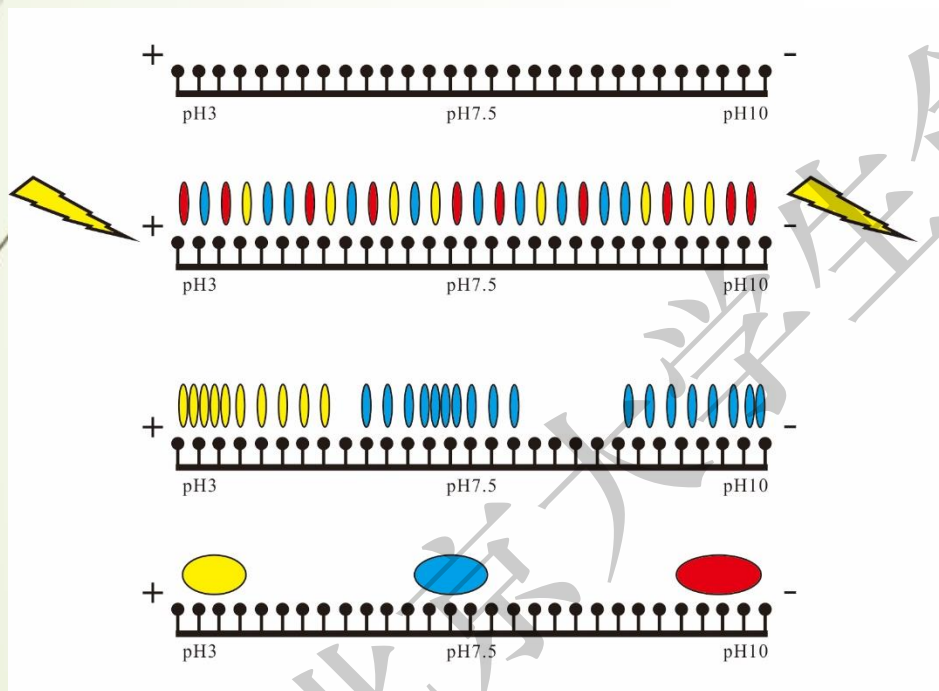
优点

- 分辨率非常高，可对样本中的多达数千种蛋白质同时进行分离、鉴定、定量；
- 可检测翻译后和翻译过程中的蛋白质修饰

缺点

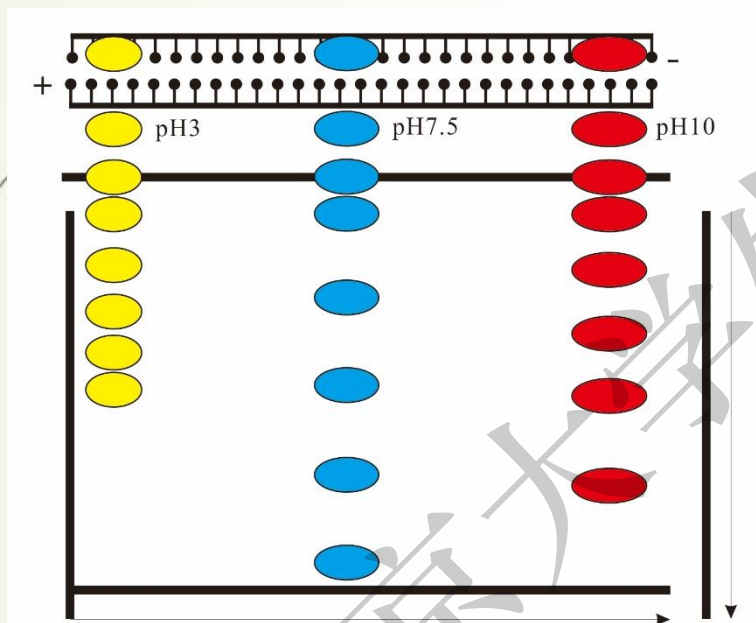
- 低丰度蛋白、膜蛋白、碱性蛋白的分离与检测
- 重复性较差
- 实验费时费力，难以实现规模化与自动化

双向凝胶电泳原理：第一向IEF



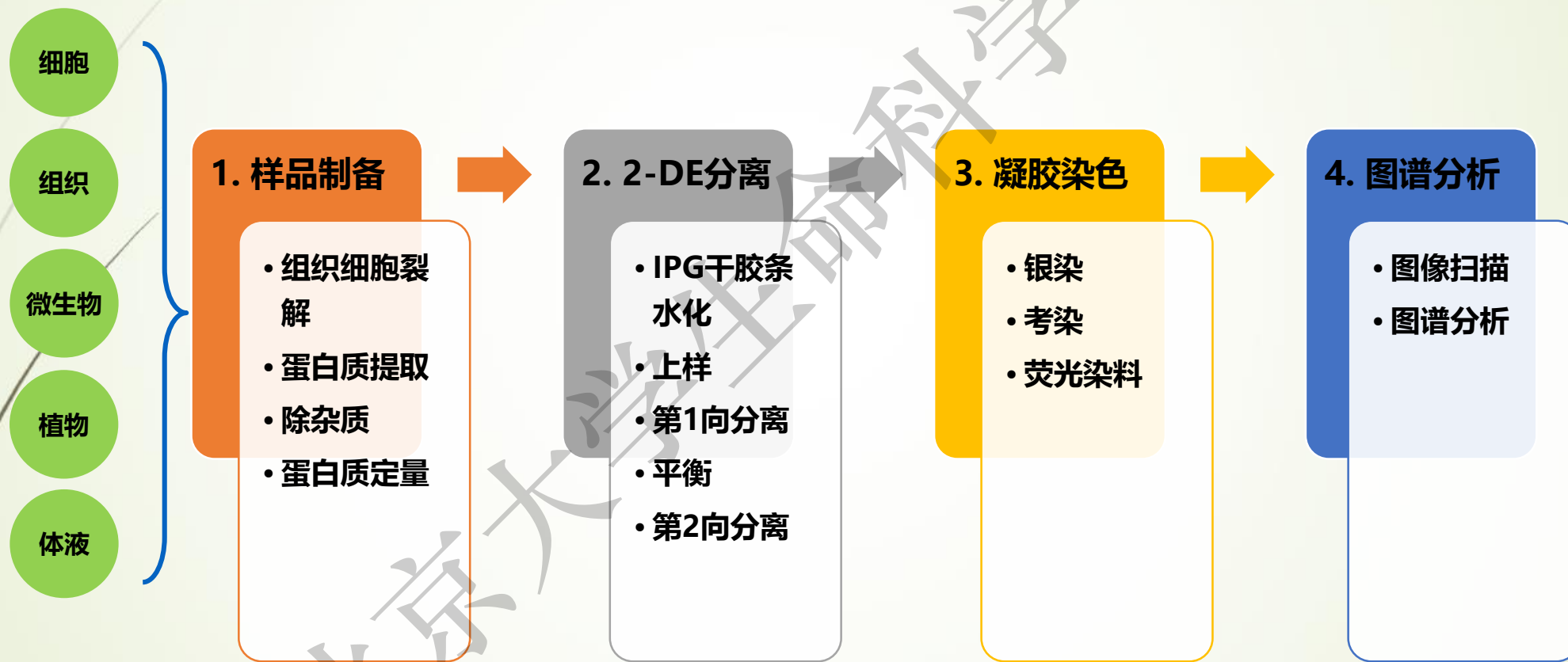
- 第一向：基于蛋白质的等电点 pI 不同用等电聚焦电泳进行**水平式电泳分离**，具有相同等电点的蛋白质无论其分子大小，在电场的作用下都会聚焦在某一特定位置，即等电点处。

双向凝胶电泳原理：第二向SDS-PAGE



- 第二向：与第一向垂直，按蛋白质相对分子质量的不同，用SDS-PAGE电泳进行垂直板电泳分离，把复杂蛋白混合物中的蛋白质在二维平面上分开。

2-DE的基本操作流程



2-DE的分离步骤

1. IPG干胶条水
化及上样

2. 第一向
IEF电泳

3. 平衡

4. 第二向SDS-
PAGE电泳

IPG干胶条水化

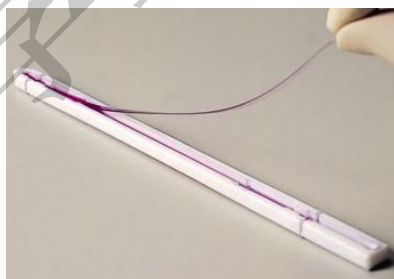
- IPG胶条用于双向电泳的第一向等电聚焦电泳分离。
- 商品化的IPG胶条为干燥低温保存的干胶条，用前需水化泡涨。
- **水化的目的：**让样品能完全以可溶性的形式进入IPG胶条内，便于接下来的IEF电泳。
- 溶胀液成分为：8M 尿素，2% 去污剂（**CHAPS**、NP-40，Triton X-100），15 mM DTT，0.5% IPG buffer（两性电解质）

第1向：IEF电泳

- 第1向IEF电泳通常使用商品化的IPG干胶条。如GE公司的Immobiline DryStrip干胶条。根据实验目的，选择合适pH梯度和长度的IPG干胶条。
- 电泳在高压的等电聚焦系统中进行，温度保持恒定（20℃）。



Immobiline DryStrip干胶条



胶条槽



IPGphor等电聚焦系统

胶条的平衡

- IPG胶条在IEF电泳结束后可马上进行第二向电泳，也可保存在 - 80℃。
- 第二向电泳前要进行胶条的平衡，使被分离的蛋白质与SDS结合。
- 平衡方法：
 - **第1步平衡：**用含**1% (m/v) DTT**、2% (m/v) SDS、6 mol/L 尿素和30%甘油的50 mmol/L Tris-HCl缓冲液 (pH8.8) 先平衡15 min;
 - **第2步平衡：**用**5% (m/v) 碘乙酰胺**取代DTT后的上述缓冲液平衡15 min。

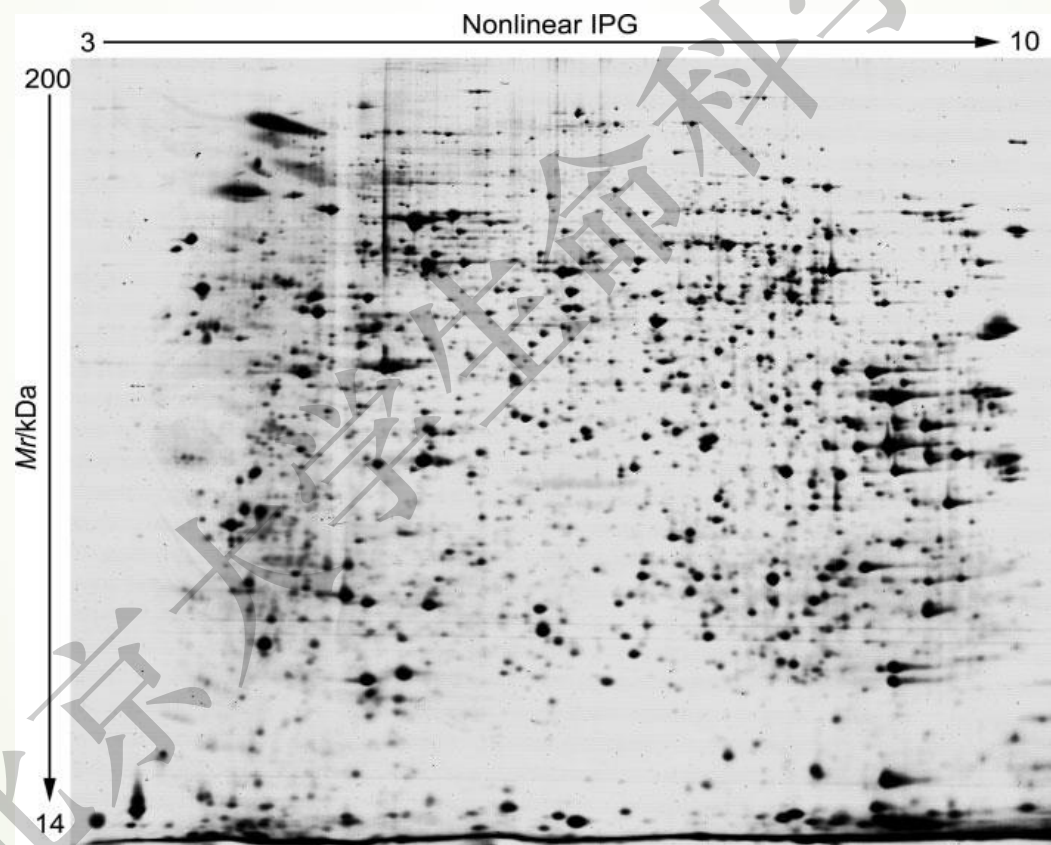
第2向：SDS-PAGE电泳

- 2-DE的第2向SDS-PAGE电泳，其凝胶尺寸比实验室常用的SDS-PAGE凝胶大很多，需要根据所使用的IPG胶条长度选择相应大小的SDS-PAGE凝胶。
- **需注意：**
 - 1) 电泳时间长，发热多，需用循环水浴保持温度恒定。
 - 2) 在第2向的SDS-PAGE垂直电泳中无需浓缩胶，因IPG胶条中的蛋白质已得到浓缩，充当了浓缩胶。

常用2-DE凝胶染色方法

染色方法	染色试剂	优点	缺点
考马斯亮蓝染色	CBB R250/G250	操作简单	灵敏度较低
银染	硝酸银	灵敏度高	操作步骤繁琐
荧光染色	SYPRO Ruby等	灵敏度高, 操作简单	所需试剂及仪器昂贵

典型的2-DE电泳图谱



Proteomics. 2006;6(10):2982-90.