

双向凝胶电泳

双向凝胶电泳,广义上理解就是将某一样品进行电泳后,为了达到不同的分离目的在它的直角方向在进行一次电泳。常用的就是等电聚焦电泳(载体两性电解质 pH 梯度或固相载体 pH 电泳)之后在进行 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳。样品经过电荷和质量两次分离之后,可以知道样品的分子量等电点等信息,分离的结果不是带而是点。

以等电聚焦--聚丙烯酰胺凝胶电泳为例的实验操作



双向凝胶电泳实验步骤

(一) 水化上样

1. 从冰箱中取出 IPG 胶条, 室温下放置 10min ;
2. 沿着水化槽的边缘从左向右加入样品(槽两端各 1cm 不加样品), 中间样品液一定要连贯, 不要产生水泡, 不然会影响胶条中蛋白质的分布 ;
3. 用镊子轻轻撕去 IPG 胶条的保护层(碱性端胶脆弱, 应该小心操作) ;
4. 将 IPG 胶条胶面朝下轻轻置于水化盘中样品液上(不要将样品液弄到胶条背面, 因为这些溶液不会被胶条吸收, 还会使胶条下面产生气泡, 如果有气泡, 来回移动胶条, 直到赶走气泡)
5. 放置 40min, 直到大部分的样品被胶条吸收, 慢慢加入矿物油, 防止胶条水化过程中液体蒸发
6. 将等电聚焦仪放于-20℃, 水化 11-15 小时。

(二) 等电聚焦

1. 将纸电极置于聚焦盘的正负极上，加去离子水 5-8ul；
2. 取出水化好的胶条，将矿物油沥干，胶面朝下，将其置于润湿好的滤纸片上去除表面的不溶物；
3. 将 IPG 胶条面朝下置于聚焦盘中，胶条的正极对应于聚焦盘的正极，确保胶条与电极精密接触；
4. 在每根胶条上滴 2-3ml 的矿物油；
5. 对好正负极，盖好盖子。设置等电聚焦程序；
6. 聚焦结束的胶条，立即进行平衡，第二向 SDS-PAGE 电泳或者是保存于-20℃，电泳前 10min 时取出。

(三) SDS-PAGE 电泳

1. 配制 12%的丙烯酰胺凝胶；
2. 配制胶条平衡缓冲液；
3. 准备厚的滤纸，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 Millio 水浸湿，汲取多余水分，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，这样可以减少凝胶染色时出现的纵条纹；
4. 将胶条转移至样品水化盘中，加入 6ml (17cm IPG) 平衡缓冲液 I，在水平摇床上摇晃 15min；
5. 配制胶条平衡缓冲液 2，第一次平衡技术后，滤纸上离去多余的液体，放在平衡缓冲液 2 中，继续在水平摇床上缓慢摇晃 15min；
6. 用滤纸吸去 SDS-PAGE 胶上方玻璃板间多余的液体，将第二向凝胶放在桌面上，凝胶的顶部面对自己；
7. 琼脂糖液体加热溶解，在 100ml 量筒中加入 TGS 电泳缓冲液；
8. 第二次平衡结束，取出胶条，用滤纸吸去多余的平衡液，用镊子夹住胶条一端，使胶面完全浸入在电泳缓冲液中漂洗几次；
9. 将胶条背面朝向玻璃板，轻轻放在长玻板上，加入琼脂糖封胶液；
10. 注意不要在胶条下产生气泡，将胶条和聚丙烯酰胺凝胶面完全接触；放置几分钟，待琼脂糖凝固；
11. 打开二向电泳制冷仪，调温度至 15℃；
12. 将凝胶电泳转移至电泳槽中，加入电泳缓冲液，接通电源，一开始低电流，待样品完全走出 IPG 胶条，浓缩成一条线后，加大电流，溴酚蓝指示剂到达底部边缘时停止电泳；进行染色观察。

