



NADH 氧化酶组的系统分析（大规格的 PEP 平板）

货号# AB000502

此试剂盒适用于从细胞、组织中提取的或血清中 NADH 依赖的氧化酶的系统分析。

请在操作之前仔细阅读此说明书

本试剂盒只能用于科学研究，不能用于医学诊断。

背景信息

蛋白质在许多的生物过程中扮演着重要的角色，NADH 依赖的氧化酶是一类庞大家族的酶系，涉及包括癌症在内的许多新陈代谢过程和新陈代谢疾病。NADH 氧化酶试剂盒能对任何蛋白质组中的 NADH 依赖的氧化酶进行系统的分析，同时建立起这个重要的酶家族的三维图谱。这些信息可以用来深化对生物化学过程的认识、新药物靶位的识别以及研究药物安全性等潜在应用。

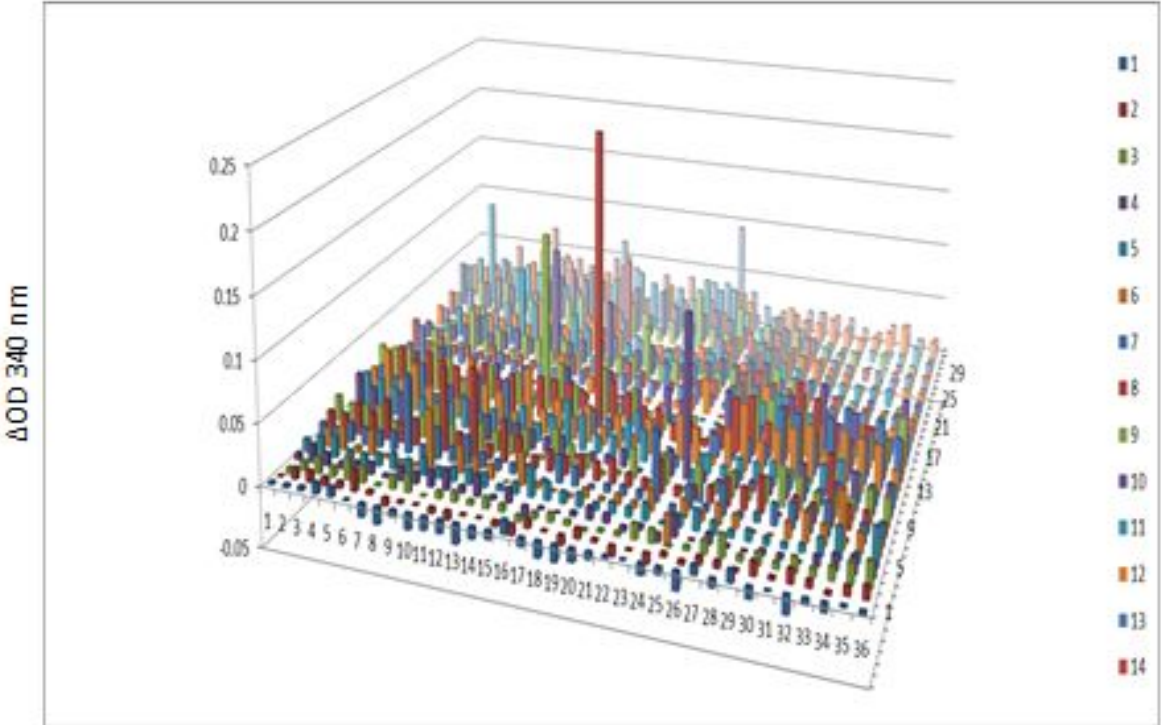
在 PEP 技术中，蛋白质混合物通过改进的一维和二维电泳技术进行第一步分离，这个改进的方法提供了很好的分辨率同时仍能保持蛋白质的功能活性。接下来有效地将凝胶电泳中的蛋白质转移到特殊设计的 1536 孔的蛋白质洗脱平板上。然后将 PEP 平板上的样品分别转移到四个 384 孔的主平板上，主平板中的样品，其中的一部分样品进一步转移到蛋白质功能分析平板中进行功能试验来确定酶活性或蛋白质功能。对于有活性的样品，可以从 384 孔主平板中取得另一份样品，通过标准的 SDS-PAGE（聚丙烯酰胺凝胶电泳）来测试每个孔中的蛋白质的纯度。如果需要的话，可以用质谱分析的方法来鉴定相应的酶或功能蛋白质，这些质谱分析用的蛋白质可以从含有纯的蛋白质的孔内获得或者从 SDS-PAGE 凝胶中蛋白质带获得。PEP 技术也能用于分析同源的酶家族成员从而获得每个酶的功能图谱（例如蛋白质激酶，蛋白磷酸酶，蛋白酶等），从原理上这个 PEP 技术能对需要进行功能分析的任何蛋白质家族进行系统地分析鉴定从而更系统的研究它们的生物学意义。

技术原理

二维凝胶电泳是分离蛋白质复杂样品的最有效的技术之一。第一维度的分离叫等电点聚焦(IEF)，蛋白质基于等电点进行分离，在大于 0.02 pH 单位的等电点差异情况下蛋白质就能够被分开，因此是具有很高的分辨率的方法。在第二个维度，蛋白质基于分子量的不同进行分离。因为二维凝胶电泳用两个正交参数（电荷和大小）分离和在两个维度上区分蛋白质，所以该技术在蛋白质分离领域是最有效的技术之一。在大规格的凝胶分离中，超过一万种蛋白质可以被分离和定量并可以同时获取蛋白质翻译后修饰的相关信息（糖基化，磷酸化等）。由于这些优点，二维凝胶电泳已经广泛的应用于蛋白质组学研究中。然而传统的二维凝胶电泳技术，会添加破坏二硫键而导致蛋白质变性的物质（二硫苏糖醇或 β -巯基乙醇），及阻碍二硫键生成的化合物（碘乙酰胺）和高浓度的 SDS（通常 1%）。为保持二维凝胶电泳中蛋白质的活性，PEP 技术对二维凝胶电泳做出适当的修改。首先，在等电点聚焦阶段不再添加还原剂以保持蛋白质的二硫键完整。第二，将碘乙酰胺从样品处理中除去。第三。大量减少 SDS-PAGE（从 1%减少到 0.1%）中 SDS 的用量，设法保持酶的活性。最近的研究表明各种的生物体中的许多不同的酶类在 SDS 存在下仍能保持活性，举例来说，蛋白激酶、蛋白磷酸酶、蛋白酶和氧化还原酶等(见参考文献)。

此外，除了方法的改进，本技术还设计了一种高分辨率的蛋白质洗脱平板（PEP）。小规格的 PEP 有 384 个孔，能匹配目前用作样品处理阶段的 384 孔的标准微孔平板。至于大规格的 PEP，这个平板包含 4 块 384 孔的 PEP，总计 1536 孔。在大小两种规格的 PEP 中，都粘合着能截留 10000 道尔顿分子量的半透膜，该膜允许电流和小的带电微粒通过，但是分子量超过 10000 道尔顿的蛋白质将被截留到 PEP 孔中。此外，本技术还为 PEP 开发了一种特殊的解决方案，使得在蛋白质从凝胶中转移到 PEP 之后可以减少蛋白质的扩散和保持蛋白质的功能。在从 PEP 转移到深孔的主平板上之后，可以从主板中取出部分样品来测量酶的活性或者蛋白质功能，进而可以用传统的 SDS-PAGE 或质谱分析的方法对纯的蛋白质进行验证。

蛋白质组中 NADH 氧化酶的图谱示例



试剂盒提供的组份：

1536孔蛋白质洗脱平板

一块蛋白质洗脱平板。这个平板经过特殊方法处理以减少转移的蛋白质附着到PEP平板壁上，增加蛋白质的回收率。

384孔主平板

四块用于从PEP平板中收集样品的深孔平板，平板经过特殊方法处理以减少蛋白质附着到主平板壁上，增加蛋白质的回收率。

384孔酶活测定平板

四块标准的384孔的聚丙烯平板，用来对孔内的蛋白质样品进行酶的活性或蛋白质功能测定。

NADH氧化酶底物 (100 ml)

该组分是准备从蛋白质组中包含的NADH氧化酶进行系统分析，在使用前需要与NADH标准液混合

NADH溶液 (0.8 ml)

NADH标准品36mM，在酶测反应之前需要与NADH氧化酶底物混合充分。

20倍的电泳缓冲液 (100 ml)

该缓冲液用于改进的SDS-PAGE或者二维电泳的第二维度部分。

10倍的PBS缓冲液 (20 ml)

该缓冲液用在386孔主平板上，每个孔中加入1倍的PBS缓冲液50微升。

电泳样品溶液 (0.5 ml)

用于溶解冻干的蛋白质样品。

10倍的PEP平板缓冲液 (100 ml)

用于PEP平板中，可以减少洗脱蛋白质的扩散和保持蛋白质功能。

平板膜

在纯化步骤前封闭主平板和酶测定平板。试剂盒AB-000502 (8张)

滤纸

作为蛋白转移过程中的夹层。试剂盒AB-000502 (4张)

仪器及其它必备的材料(本试剂盒没有提供)

仪器:

凝胶电泳单元包含电源和进行凝胶分离的部分。

等电点聚焦单元包含能跑不同长度的等电点聚焦仪，例如美国伯乐 (Bio-Rad) 的PROTEAN 等电点聚焦仪(货号: 165-4000)。

酶标仪包含能阅读384板的功能，具有较宽的波长选择和荧光读数范围。

蛋白质转移的半干转印单元，例如Bio-Rad的Semi-Dry Trans-Blot(货号:170-3940)。

材料:

SDS-PAGE凝胶: 客户可以选择至少18厘米宽的任何规格的SDS-PAGE凝胶来跑样品。其中一个是一Jul公司, 1.5毫米 12% Tris-Glycine 凝胶(货号: 12D1.5BLC1G)。

等电点聚焦胶条:从Bio-Rad (货号: 163-2014 for 11 cm IPG strips, 163-2033 for 18 cm IPG strips) 或者GE Life Sciences (货号: 18101661 for 11 cm pH 3-10 Immobiline Dry Strips; 17123501 for 18 cm, pH 3-10 Nonlinear Immobiline Dry Strips)购买固定化pH的胶条来跑等电点聚焦。

电解液:电解液可以从Bio-Rad (Bio-Lyte buffer, pH 3-10, catalog number: 163-2094)或 GE Health购买 (Pharmalyte pH 3-10, catalog number: 17-0456-01)。

蛋白染色部分: 如果必须进行蛋白染色, 请按照以下的步骤操作: 电泳后的凝胶第一步先加入固定液 (在纯水中加入10%的醋酸、10%的乙醇) 维持至少1小时 (可以过夜处理), 然后在纯水中加入SYPRO Ruby或者其他荧光染料染色过夜, 使用制造商推荐的条件来稀释荧光染料。

蒸馏水或去离子水

可在5-250微升之间进行体积调整的单通道或多通道移液枪

塑料管 (1.5ml-15ml) 用来稀释样品

添加样品时需要用的加样槽

特别提示

像其它类似的产品一样，本检测盒仅供有实验室安全常识的专业技术人员使用。在使用此产品之前，需要仔细阅读产品说明书。

实验过程中的注意事项

开始试验之前先将稀释过的试剂和缓冲液恢复到室温（18-25℃），一旦实验开始，所有的步骤都应按顺序进行不可以中断。确保实验时需要的必须的试剂和缓冲液都准备好，试剂仅需要轻轻的混合（切忌剧烈晃动）

为了避免试剂、移液枪头和平板的交叉污染，应使用一次性的移液枪头和试剂容器。未用完的试剂不要重新倒回试剂瓶或试剂管中，注意不要把不同试剂瓶的盖子弄混而造成交叉污染。所有的孔都应按照每一步的相同的方法操作。

试验步骤

1. 样品处理

高浓度的盐会干扰等电点聚焦。如果蛋白质浓度低于5mg/ml，建议冷冻干燥再溶解到无离子水中，如果盐浓度高于100mM，推荐使用5mM的磷酸缓冲液（pH 7.2）对样品进行透析后再使用。

2. 先跑IEF随后跑改进的SDS-PAGE

- 2.1. 建议使用18厘米的IPG胶条跑IEF电泳。需要325微升的溶液润湿一个IPG胶条。建议使用300微升的样品且蛋白总量为2毫克，添加尿素到最终浓度为8M，同时添加2微升的两性电解质如Bio-lyte。如果蛋白质样品是冻干的，冻干的样品需要用8M尿素和0.1%Bio-lyte溶解成水溶液。
- 2.2. 首先第一步先将蛋白质样品加入到复水盘中，将IPG胶条从储样盒中取出并将塑料包被（plastic cover for the IPG strip）拿掉。将有干凝胶的一面朝下接触到样品溶液。请确定让整个IPG胶条全部接触到样品溶液。添加足够的矿物油（Mineral Oil）以覆盖IPG胶条以防止蒸发，并在室温下维持过夜。
- 2.3. 复水完毕后，将胶条从复水盘中取出，用试验用擦拭纸将胶条表面的矿物油轻轻吸干。
- 2.4. 在IEF电泳盒中，小心地润湿两片电极滤纸把两端的电极丝覆盖（Bio-Rad, 货号165-4071）。小心地将IPG胶条正面朝下放好，轻轻的挤压IPG胶条使其与过滤纸覆盖的金属丝紧密的贴合。加入足够多的矿物油覆盖住IPG胶条以防止水分蒸发。
- 2.5. 将IEF盒子放入实验装置中然后关闭IEF单元盖子（Bio-Rad PROTEAN IEF Unit）
- 2.6. 等电聚焦第一步，设计仪器程序为4小时内将电压梯度从0升到10000伏（Voltage），第二步，设置恒定电压10000伏维持24小时。等电聚焦实际需要跑过夜，但是最低限度的电压-小时是30000伏小时（低于此值说明蛋白质没有完全聚焦）
- 2.7. 在IEF完毕以后，关闭设备，小心的将IPG胶条取出，用擦拭纸将胶条表面的矿物油吸干。将IPG胶条放入复水盘中，在盘内加入TRIS-Glycine转移缓冲液，保持10分钟。除去尿素并让SDS接合到蛋白质上。
- 2.8. 取出大型凝胶（例如Jule公司的产品），打开塑料包装，用纯水冲洗干净。将凝胶放入电泳槽中，用Tris-Glycine-SDS缓冲液加入到上下两个水槽中。

- 2.9. 小心的将IPG胶条在IPG槽中放好，确保当你面对凝胶时IPG酸性一侧总是在你的左边。如果IPG胶条长于凝胶的尺寸，大约有1厘米的IPG胶条应该被从酸性末端切除，保留碱性末端部分。原因是这一厘米酸性末端的IPG胶条是超过电极，因此没有蛋白在此部分聚集。在碱性末端，因为蛋白质组中大多数的蛋白它们的PI值是小于8的，很少量的蛋白会聚集在IPG碱性末端。如果我们感兴趣的蛋白是强碱性的，那么从IPG胶条的酸性末端可以切除更多的胶条。
- 2.10. 先在80伏电压下跑15分钟，接下来在150伏电压下跑直到标准蛋白的染色前段与凝胶的下边缘只有0.5厘米。

3. 二维凝胶电泳之后的蛋白质洗脱

- 3.1. 当SDS-PAGE仍在跑时，将PEP平板放入一个塑料托盘，用多通道移液枪在平板的每个孔中加入50微升的蛋白回收溶液，在此步骤可能有些许的溶液溢出，这没有问题。如果用8通道的移液枪，将溶液按照每隔一行加入。例如，第一次，添加溶液到A, C, E行等，以此类推，第二次添加溶液到B, D, F行等，以此类推。覆盖托盘减少蒸发。如果用12通道移液器，将溶液按照每隔一列加入，例如，第一次添加1, 3, 5列等，第二次添加2, 4, 6列以此类推。
- 3.2. 电泳完成后，小心地将凝胶从凝胶盒中取出放到一个塑料托盘中，用纯水冲洗一下，随后在另一个塑料托盘中加入200毫升的转移缓冲液（试剂盒中提供），完全润湿两张转移滤纸，放入到半干转印仪 (Bio-Rad 或相似的其他厂商的半干转印仪) 的金属表面。
- 3.3. 从托盘上，把PEP平板放到已经置于半干转印仪上的转移滤纸上，然后小心的将凝胶放到PEP平板的上面，确保凝胶的左上角很好的与PEP平板的左上角对准。
- 3.4. 用转移缓冲液润湿另外两张转移滤纸，按照三明治的样式放到凝胶的上面（从底部依次是滤纸，PEP平板、凝胶、然后又是滤纸）。
- 3.5. 用半干转印仪的另一个金属板覆盖在三明治结构上，在200毫安的恒定电流下转移60分钟。在这种情况下，凝胶中的蛋白质会高效的转移到PEP平板上面，不需要更长时间的蛋白质转移。
- 3.6. 当凝胶正在转移中，在四个384深孔主平板上的每个孔内加入50微升的PBS缓冲液（当有磷酸盐存在会影响蛋白激酶化验或其他酶的化验时，可以选用Tris-HCl缓冲液或其他可用的缓冲液）。
- 3.7. 当蛋白质转移完成时，关闭电源，取下半干转印仪的盖子，除去顶部的金属板。在除去顶部金属板前等待10秒钟时间（这一步非常重要，先让一些空气进入以防止PEP平板中的溶液被吸出来，导致孔内的蛋白质流到附近的孔中）。在移去金属平板后，小心地取下上面的两张滤纸，然后再取下凝胶。当取凝胶时，注意要从左至右依次取下，需要着重指出的是PEP转移缓冲液的特殊成分将减少蛋白质在PEP平板中的吸附并防止蛋白质的扩散。

- 3.8. 小心地拿着两张转印纸仍贴合在平板底部的PEP平板，放到一个托盘中。用多通道的移液枪转移从PEP平板中将已洗脱下来的蛋白质溶液移到深孔主平板中相应的位置。对于大规格平板来说，需要从左至右从上往下标记好P1, P2, P3 和 P4四个区域以备转移蛋白质溶液到主平板之用。例如，左上边的区域被定为P1，从P1中转移到主平板1中，平板2, 3, 4的过程与平板1一致。如果用八通道的移液器，请设置转移量为45微升以确保孔内的大多数溶液都被转移。从PEP平板的左侧第一列开始转移，奇数行（A, C, E 行等）的孔先转移然后再转移第一纵列的偶数行（B, D, F行等）的孔。重复这个过程直到PEP平板中所用的样品都被转移到384孔主平板中。

4. NADH氧化酶的分析

- 4.1. 在把样品从PEP平板转移到深孔主平板上之后，主平板应该立即（优先条件）进行NADH氧化酶的分析鉴定。因为主平板的每个孔中的液体总体积约为90微升（50微升的缓冲液添加从PEP平板中吸取的40-45微升的样品），那么收集的样品可以同时做多种酶的分析鉴定。对于检测NADH氧化酶的实验，从主平板中每个孔中取出30微升样品到酶测反应平板中，接着添加50微升的NADH氧化酶底物。用分光光度计在340nm处检测NADH氧化酶的活性。在反应读数之前，酶测平板中的许多孔内可能含有气泡，因为在蛋白质转移缓冲液中还有SDS（避免气泡的一个方法是放出的液体的体积小于吸取时的体积，这样放液时移液管就不会产生气泡）。在读数以前用一个移液管头将气泡戳破，以减少气泡对读数的影响。
- 4.2. 当读取酶测板时，用移液枪从P24孔（384孔平板右下角）吸干液体，用这个孔作为空白读数。推荐读取至少3个数据点，例如10分钟、60分钟、120分钟，分别保存读数。

5. 数据转换和分析

- 5.1. 建立一个文件夹，将酶分析的Excel 数据存储在里面（大部分仪器测定直接产生Excel 数据）重复三个读取点（10分钟、60分钟、120分钟）数据。因为我们一个酶分析平板有三个读取点数据，这样我们四个酶分析平板一共得到12组酶分析数据。
- 5.2. 对于酶分析平板1的数据，在微软Excel中，从每个孔中10分钟的读数减去相对应的60分钟的读数获得的数据为340nm处的吸光度差值，此差值反应的就是蛋白质组中NADH氧化酶的活性。使用Excel插入功能，选择三维建图功能建立一个数据的图谱，标记信息：平板1，10-60 分钟。
- 5.3. 从每个孔中60分钟的读数减去相对应的120分钟处的读数所得的数据为340nm吸光度的差值，此差值反应的是蛋白质组中的NADH氧化酶第二阶段的数据。用Excel插入功能，选择三维建图功能建立这个数据的图谱，标记信息：平板1，60-120分钟。这个数据及其图谱将用来证实在段落5.2中第一部分数据的发现。
- 5.4 重复 5.2 和 5.3 过程取得平板 2, 3, 4 的分析数据。
- 5.5 复制5.2和5.3步骤的数据建立一个4组数据的总和和数据表。例如，对于10-60分钟数据，复制粘贴平板1的信息到1-24列，1-16行；平板2的信息到25-48列，1-16行；平板3的信息到25-48列，17-32行；平板4信息到25-48列，17-32行。全部选定数据，用微软Excel三维建图功能建立一个数据的图谱供分析。

6. 蛋白纯度验证

- 6.1. 如果NADH氧化酶测定显示有些孔内有酶活力和需要鉴定蛋白质，那么接下来就是测试这些孔内的蛋白质纯度。从有酶活力的孔中收集所有的样品置于硅化微型离心管中，将溶液真空干燥后加入20微升的无离子水使蛋白质重新悬浮。从溶液中取10微升，与10 微升 SDS样品缓冲液混合（该样品缓冲液是含有10mM二硫苏糖醇标准的SDS-PAGE样品缓冲液）37℃维持60分钟。
- 6.2. 装入SDS-PAGE凝胶，按照步骤2跑电泳。
- 6.3. 将凝胶放入凝胶定像液中维持最少2个小时。
- 6.4. 用蒸馏水冲洗并在Sypro Ruby或其他荧光染料下对凝胶着色过夜。
- 6.5. 第二天，除去染色液。用纯水冲洗凝胶两次接着将凝胶放入纯水中轻轻晃动5分钟。
- 6.6. 用电荷耦合摄像机（比如Bio-Rad ChemiDoc）获取凝胶图像。
- 6.7. 保存图像为tiff格式以便将来对图像处理。凝胶图像显示蛋白质纯净与否。

7. 质谱分析法测定感兴趣的蛋白质

- 7.1. 如果同源的蛋白质需要有待确定或者查实，可以将步骤6.1中剩下的10微升样品送去进行质谱分析。
- 7.2. 从主平板中取得的样品可以直接进行质谱分析而不需要检测蛋白质的纯度。如果认为这个孔中含有超过一种以上的蛋白质的种类，需要依靠生物信息学来确定哪种蛋白质有同源性来进一步确认NADH氧化酶，理论上在一个孔内不太可能含有超过一种以上的蛋白质有NADH氧化酶的活性，所以这种方法是可行的。

参考文献

1. Bischoff, K. M.; L, Shi.; and P. J. Kennelly. 1998. The detection of enzyme activity following Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 260, 1–17.
2. Weber, K. and D. J. Kuter. 1971. Reversible denaturation of enzymes by Sodium Dodecyl Sulfate. *The Journal of Biological Chemistry* 246(14), 4504–4509.
3. Kameshita, I.; A. Ishida.; S. Okuno. And H. Fujisawa. 1997. Detection of protein phosphatase activities in Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel using peptide substrate. *Analytical Biochemistry*. 245, 149–153.
4. Biswas, A. and K. P. Das. 2004. SDS induced structural changes in α -crystallin and its effect on refolding. *The protein Journal*. 23(8), 529–538.
5. Vincenzini, M. T.; F. Favilli.; C. Treves. And P. Vanni. 1982. Specific interaction among some enzymes and Sodium Dodecyl Sulfate. *Life Sciences* 31, 463–470.
6. Anderson, N. G. and N. L. Anderson. 1996. Twenty years of two-dimensional electrophoresis: Past, present and future. *Electrophoresis*, 17, 443–453.
7. Langen, H.; D. Rader.; J–F. Juranville. and M. Fountoulakis. 1997. Effect of protein application mode and acrylamide concentration on the resolution of protein spots separated by two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 18, 2085–2090.
8. Gorg, A.; G. Boguth.; C. Obermaier.; A. Posch and W. Weiss. 1995. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension (IPG–Dalt): The state of the art and the controversy of vertical versus horizontal system. *Electrophoresis*, 16, 1079–1086.
9. Nestler, H. P. and A. Doseff. 1997. A two-dimensional, diagonal sodium dodecylsulfate–polyacrylamide gel electrophoresis technique to screen for protease substrates in protein mixtures. *Analytical Chemistry*, 251, 122–125.
10. Naryzhny, S. N. 1997. “Active” two-dimensional electrophoresis of rat liver DNA-polymerase. *Electrophoresis*, 18, 553–556.