



384 孔通用 PEP 平板功能蛋白质纯化试剂盒

货号#AB000401

此试剂盒包含从蛋白质混合物中一步分离纯化功能蛋白质的全部组分，特别适用于部分纯化的蛋白质组分。

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

蛋白质在生物学中扮演着重要的角色。因为蛋白质的电荷和大小不一样，从蛋白质混合物中分离纯化出有功能活性的蛋白质一直以来都是一个挑战。在蛋白质纯化方面得另一个挑战是可以用来进行蛋白质纯化的起始原料受到限制；有时只有微量量的蛋白质可以用于纯化，使得目前大多数蛋白质纯化方法不太适用。

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 384 孔的蛋白质洗脱平板上。然后将 PEP 平板上的样品进一步转移到另一个 384 孔的主平板上，主平板中的样品，其中的一部分样品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的。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

二维电泳方法的第一阶段通常是由需要纯化的蛋白质的样品混合物的复杂程度决定的。如果这部分只包含20种以内的蛋白质，可能只需要改进的SDS-PAGE法来纯化蛋白质。换句话说，如果样品中包含超过20种以上的蛋白质，一个小规格的二维电泳就能满足。如果混合物样品中包含成百上千种蛋白质，那就需要选择大规格的二维电泳凝胶（提供不同规格的PEP蛋白纯化试剂盒）

对少于20种蛋白质的样品的纯化，第一步样品首先在室温下用含有0.1%SDS Tris-Glycine 缓冲液进行处理，然后用SDS-PAGE蛋白质分离凝胶进行分离。

如果样品里有超过20种蛋白质（用标准的SDS-PAGE进行测定），就使用二维凝胶电泳进行蛋白纯化。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 (Isoelectric Focusing or 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10000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）。

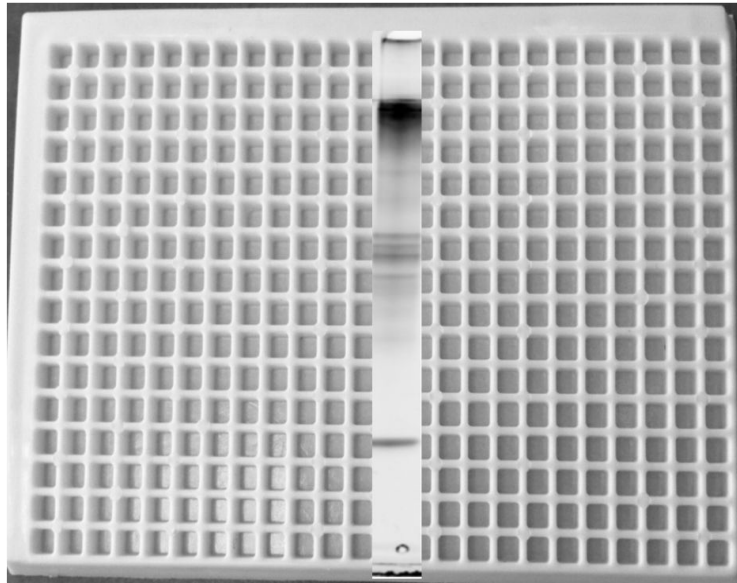
此外，除了方法的改进，本技术还设计了一种高分辨率的蛋白质洗脱平板（PEP）。小规格的 PEP 有 384 个孔，能匹配目前用作样品处理阶段的 384 孔的微孔平板。至于大规格的 PEP，这个平板包含 4 块 384 孔的 PEP，总计 1536 孔。在大小两种规格的 PEP 中，都粘合着能截留 10000 道尔顿分子量的半透膜，该膜允许电流和小的带电微粒通过，但是分子量超过 6000 道尔顿的蛋白质将被截留到 PEP 孔中。此外，本技术还为 PEP 开发了一种特殊的回收溶液解决方案，使得在蛋白质从凝胶中转移到 PEP 之后可以减少蛋白质的扩散和增加蛋白质的回收率。在从 PEP 转移到深孔的主平板上之后，可以从主板上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。

对改进的一维凝胶电泳中功能蛋白质的纯化

Modified SDS-PAGE
for separation



Fraction 4 electro-eluted to the PEP Plate after gel electrophoresis and
recovered for enzyme assay and protein purity testing.



NADH Oxidase
Purified by the
PEP Plate



Fraction 4 from
Mono Q column

Protein of interest is eluted into 2-3 adjacent PEP wells

产品组成:

384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

一块用于从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

一块标准的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。

10倍的PBS缓冲液(50 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，同时也能用来将蛋白质从凝胶中转移到PEP平板中。

10倍的PBS缓冲液(10 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。

10倍的改进的SDS-PAGE样品缓冲液(1 ml)

为改进的SDS-PAGE进行样品处理。

PEP平板缓冲液(25 ml)

在PEP平板中从凝胶中回收洗脱的蛋白质，同时防止蛋白质扩散。

平板膜

在纯化步骤前封闭主平板和酶测定平板。试剂盒AB-000401 (2)

滤纸

用来在蛋白质转移过程中形成三明治结构。

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：客户可以选择任何规格的SDS-PAGE凝胶来跑样品。优先选择每个孔能装15微升或者更多样品的。Bio-Rad(规格10-20% 18-孔 Tris-HCl 凝胶, 货号：345-0043; 规格 10-20% IPG + 1 孔 Tris-HCl 凝胶, 货号：345-0107), Invitrogen等公司的凝胶都能用来做蛋白质的分离。

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 Health 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)。

蛋白着色部分：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 Orange (Invitrogen, 货号：S6650)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。

试验步骤

1. 样品处理

- 1.1. 建议先通过标准的一维凝胶电泳技术检验蛋白质样品的复杂程度。如果是从一种特殊的细胞或组织中获取的总蛋白，这就需要大规格的PEP (AB000501) 纯化试剂盒。在标准的一维SDS-PAGE测试中，如果只有20种以内的蛋白质，只需要选择改进的一维SDS-PAGE（这些内容请直接看第二部分）如果样品中含有超过20种以上的蛋白质，第一步需要选择11厘米的IPG胶条（pH3到pH10，非线性）进行IEF（等电点聚焦），然后进行改进的SDS-PAGE（直接到第三部分）。
- 1.2. 跑改进的SDS-PAGE电泳时的样品处理条件是用不含还原剂的0.1%SDS的Tris-Glycine缓冲液处理样品。试验表明许多蛋白质在这种条件下仍能保持一定的活性或功能。然而也有蛋白质对SDS的处理高度的敏感。在这种情况下，在凝胶体系中不再使用SDS，取而代之的是分离过程用一种未变性的凝胶方法来进行蛋白质的分离。
- 1.3. 在跑改进的凝胶电泳前，需要对蛋白质在0.1%SDS条件下的敏感度进行测试。将蛋白质处于含0.1%SDS的Tris-Glycine缓冲液中，维持在37℃，60分钟然后对酶或蛋白质进行功能分析。如果样品仍有酶活性或蛋白质功能，那么可以用改进的SDS-PAGE来分离蛋白质。如果在这种情况下酶已经变性了，就选择未变性凝胶电泳。

2. 直接使用改进的SDS-PAGE凝胶电泳进行蛋白质分离

- 2.1. 样品处理在装样量30微升的Bio-Rad标准凝胶中，装入25微升的样品，其中包括22微升的蛋白质样品和3微升的10倍的改进的SDS-PAGE样品缓冲液。在装配之前将样品在室温下维持30分钟以使得SDS结合到蛋白质分子上去。
- 2.2. 样品处理在装样量30微升的Bio-Rad标准凝胶中，装入25微升的样品，其中包括22微升的蛋白质样品和3微升的10倍的改进的SDS-PAGE样品缓冲液。在装配之前将样品在室温下维持30分钟以使得SDS结合到蛋白质分子上去。

3. 先跑IEF随后跑改进的SDS-PAGE

- 3.1. 建议使用11厘米的IPG胶条（Bio-Rad, 货号：163-2033）跑IEF电泳。需要225微升的溶液润湿一个IPG胶条。建议使用200微升的样品，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 (Bio-Rad, 货号：163-2094) 和2毫克的丙磺酸。如果蛋白质样品是冻干的，冻干的样品需要用8M尿素0.5%Bio-lyte 和0.1% 丙磺酸溶解成水溶液。
- 3.2. 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。

- 3.3. 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。
- 3.4. 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。
- 3.5. 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）
- 3.6. 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8000伏（Voltage），第二步，设置恒定电压8000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）。
- 3.7. 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。
- 3.8. 取出Bio-Rad标准凝胶（Criterion Gel for IPG Strips），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。
- 3.9. 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。在蛋白质标准槽内（位于IPG胶条的酸性一侧）加入5微升的无标记标准蛋白样品。
- 3.10. 先在80伏电压下跑15分钟，接下来在120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。

4. 改进的一维SDS-PAGE或二维凝胶电泳之后的蛋白质洗脱

- 4.1. 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。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。
- 4.2. 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。
- 4.3. 把PEP平板放到转移滤纸上，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。
- 4.4. 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）

- 4.5. 用半干转印仪的另一个金属板覆盖在三明治结构上，在120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。
- 4.6. 当凝胶正在转移中，在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）。这个步骤是为了提高蛋白质在主平板里的回收率. 经过30分钟的处理，从每个孔中全部取出溶液，再在每个孔中加入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）
- 4.7. 当蛋白质转移完成后，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。（有时滤纸和凝胶会粘连到一块，既然这样就将两部分一起取下）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，注意要从左到右取下（这点非常重要，因为蛋白质在凝胶上面是被分割成平行的条带状，如果从左至右的取出凝胶，不含样品的一些溶液会水平移动到邻近的孔中而不是上下移动，因此可以避免与其他蛋白质的混合）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的残留。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。
- 4.8. 如果用改进的一维SDS-PAGE凝胶电泳，只有一个或几个条带有蛋白质样品，因此只需要在蛋白质样品条带下面相应的三列孔中收集样品。这只需要能熟练的使用一个单通道的或多通道的移液枪就能完成。当使用多通道移液枪时，请设置转移量为45微升，确保孔内大多数的溶液被转移出去。从奇数行（A, C, E行等）孔内的样品先转移，然后转移偶数行（B, D, F行等）孔内的样品。
- 4.9. 如果用二维凝胶电泳，PEP平板中的所用样品都需要转移到主平板中去。用多通道的移液枪从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。如果用八通道的移液枪，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，奇数列（A, C, E行等）的孔先转移然后再转移第一纵列的偶数列（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。

5. 酶或功能蛋白分析

- 5.1. 在从PEP平板样品转移到深孔主平板上之后，主平板应该立即（最好的方式）进行酶或功能蛋白的分析鉴定。因为主平板的每个孔中总体积约为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做很多种类酶的分析鉴定。当进行酶活力或其他蛋白功能测定时，从主平板的每个孔中转移10-30微升样品到酶测板中，然后在孔内加入50微升的包含底物的酶测溶液。用分光光度计或其他的适合的装置测量酶活力或蛋白功能。在酶测读数之前，酶测板上的有些孔可能含有气泡，这是由于在蛋白质转移缓冲液中含有SDS引起的。（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。

- 5.2. 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。

6. 蛋白纯度验证

- 6.1. 如果酶测显示一些孔内含有感兴趣的酶活力，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，将溶液弄干后加入15微升的SDS样品缓冲液使其重新悬浮。（该样品缓冲液是含有20mM二硫苏糖醇2倍的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微升样品进行质谱分析。
- 7.2. 另一种方法，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，则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NADPH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NADPH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.