

血清样本双向电泳操作条件优化^{*}

向明钧^{1,2} 叶金花¹ 余 敏² 马明星² 卑占宇¹ 王熙才³ 谭德勇^{2**}

(1 赣南医学院基础医学院 赣州 341000 2 云南大学生命科学学院 昆明 650091)

(3 昆明医学院第三附属医院云南省肿瘤研究所 昆明 650118)

摘要 为建立分辨率高、重复性好的血清样品双向电泳技术,从血清样品的水化、等电聚焦、胶条的平衡、胶条的染色等几个方面对双向电泳操作条件进行了分析。结果表明采用以下的操作过程可以获得分辨率高、重复性好的双向电泳结果:样品水化 2h(25℃);胶条泡涨 12~16h(25℃);17cm 胶条的等点聚焦程序采用 250V 线性 1h/1000V 线性 1h/4000V 线性 2h/8000V 线性 3 小时/8000V 线性 10h/500V 快速 0.5h,11cm 的胶条的等点聚焦程序采用 250V 慢速 4h/1000V 快速 2h/4000V 快速 1h/8000V 快速 2.5 小时/8000V 快速 7h/500V 快速 30min;两次平衡各 15~20min;银染条件为固定两小时或过夜,敏化 50~60min,定影 30~40min,显影 10min 左右,终止 10min。这一研究对利用双向电泳分析血清蛋白具有很好的参考价值。

关键词 血清样本 双向电泳 优化

中图分类号 Q503

蛋白质的比较分析是寻找新的功能蛋白和疾病标志蛋白,探讨生理机制的有效途径^[1~4]。以固相 pH 梯度等电聚焦为第一向,SDS-PAGE 电泳为第二向的双向电泳具有分辨率高、重复性好等优点,在蛋白质组学研究中广泛应用^[5~7]。双向电泳操作影响因素较多,导致实验失败的原因往往难以确定^[8],其中的任何一个因素没控制好都会导致整个操作失败。血清样本是医学研究中经常采用的研究材料,但血清蛋白质组学的研究尚处于发展中^[9]。血清样本由于含有较高浓度的盐类和脂类、氨基酸、酚类、糖类以及核酸等成分,严重影响了双向电泳的分离效果。另外,血清中蛋白含量种类丰富,并且高丰度蛋白质的浓度与低丰度蛋白质的浓度比值可达 10^9 倍,这使得某些有意义的蛋白在电泳中会被遮蔽。因此,血清蛋白质组学的研究中,要得到分辨率高、重复性好的血清样品双向电泳分离图谱并不容易^[10]。尽管有很多关于双向电泳条件的报道^[10~17],但这些报道只是对单一条件的优化,包括样本制备方法,染色方法等,由于没有对多种因素进行综合

考虑,实际操作中仍然难以得到好的结果。本文对血清样本双向电泳的各个环节进行了分析,供从事血清样品双向电泳分离研究者参考。

1 材料与方法

1.1 仪器与设备

PROTEIN® IEF CELL 526BR05363 等电聚焦仪及附件、BIO-RAD PROTEIN® II XI CELL 电泳槽及附件等为 BIO-RAD 公司产品;78-1 磁力加热搅拌器为上海华燕医疗器械有限公司产品;GL-20B 高速冷冻离心机为上海安亭公司产品。

1.2 材料与试剂

乳腺癌患者血清由云南省肿瘤研究所提供,样本来自临床肿瘤病理检测血清剩余血清,肿瘤确诊按临床病理诊断标准确定;健康人群的血清采自云南省中心血站,样本来自献血检样剩余血清;尿素、三(羟甲基)氨基乙烷(Tris)、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、SDS、低熔点琼脂糖、甘氨酸购自 Bebcos 公司;CHAPS 购自夏斯生物公司;IAA、甘油、DTT 购自 Sigma 公司;硫脲、EDTA、透析袋(MECO 为 1000)、PEG20000 购自上海生物工程公司;三氯乙酸、丙酮、溴酚蓝、盐酸、乙酸、

收稿日期:2007-09-25 修回日期:2007-10-24

^{*} 云南省科技攻关计划资助项目(2006SG09),国家自然科学基金资助项目(30360040),云南省教育厅基金资助项目(5Y0163B)。

^{**} 通讯作者,电子信箱:dytan@ynu.edu.cn

乙醇、硫代硫酸钠、醋酸钠、硝酸银、碳酸钠购自天津生化试剂有限公司;两性电解质 Bio-Lyte 、IPG 胶条、低熔点琼脂糖封胶液、血清及血浆处理试剂盒 Aurum™ Serum Protein Mini Kit 等购自 BIO-RAD 公司。

1.3 方法

1.3.1 血清样品的处理 经过分析比较,血清样本采用 Aurum™ Serum Protein Mini Kit 处理具有很好的效果。主要操作步骤为:取血清 1ml 加 100mmol/L PMSF 至混合液终浓度为 1mmol/L, 4℃ 条件下 40000g 离心 30min,取上清 80μl 用试剂盒 Aurum™ Serum Protein Mini Kit 处理,完毕后, 4℃ 保存备用。

1.3.2 蛋白定量 用 Ramagli 改进了的 Bradford 法求得样品中蛋白的浓度。

1.3.3 蛋白质的水化 (1)水化液的选择 分 2 种处理:(i)取 5μl 血清样本,加入 300μl 水化液 I[尿素 8mol/L, CHAPS 4%, DTT 65mmol/L(使用时加入), Bio-Lyte0.2% (w/v) (使用时加入), 溴酚蓝 0.001%, 超纯水配制], 25℃ 放置 2h, 期间轻柔摇动 3 次, 每次 2min]; (ii)取 5μl 血清样本,加入 200μl 水化液(III) [尿素 5mol/L, 硫脲 2mol/L, CHAPS 2%, SB3-10 (N-decy-N, N-dimethyl-3-ammonio-1-propane sulfonate) 2%, DTT 65mmol/L,使用时加入, Bio-Lyte0.2% (w/v) (使用时加入), 溴酚蓝 0.001%, 超纯水配制, 25℃ 放置 2h, 期间轻柔摇动 3 次, 每次 2min]。

(2)不同温度条件下的水化处理

根据水化液的比较,水化液(III)具有较好的效果,因此以采用水化液(III)进行温度条件探索。(i)取 50μl 经试剂盒处理过的血清,加入 250μl 水化液(III), 10℃ 放置 2h, 期间轻柔摇动 3 次, 每次 2min。(ii)取 50μl 经试剂盒处理过的血清,加入 250μl 水化液(III), 25℃ 放置 2h, 期间轻柔摇动 3 次, 每次 2min。

1.3.4 等电聚焦程序的比较 样品水化完毕,胶条充分泡涨,放入聚焦仪中,按表 1 聚焦程序进行比较^[18]。

1.3.5 胶条的平衡 胶条聚焦完毕后,把胶条用平衡液 I(平衡液母液现加 DTT)(4ml/11cm 胶条或 6ml/17cm 胶条)和平衡液 II(平衡液母液现加 IAA)(4ml/11cm 胶条或 6ml/17cm 胶条)进行两次平衡^[9]。

平衡时间及 DTT 和 IAA 的用量对电泳效果有较大的影响,为比较其效果,对平衡时间及 DTT 和 IAA 的用量各分 2 组条件进行试验。平衡时间:(1)胶条的两次平衡时间都为 10min。(2)胶条的两次平衡时间都为

表 1 等电聚焦程序^{a)}

| Table 1 The gel isoelectric focusing programme | | |
|--|------|---|
| 胶条长度 | 序号 | 聚焦程序 |
| 11cm | I | 250V 慢速 30min/1000V 快速 60min/8000V 线性 4h/8000V 快速 5h/500V 快速 30min |
| 11cm | II | 250V 慢速 1h/1000V 快速 1.5h/8000V 慢速 4 h/8000V 快速 6h/500V 快速 30min |
| 11cm | III | 250V 快速 2h/1000V 快速 1h/8000V 快速 2h/8000V 快速 7h/500V 快速 1h |
| 11cm | IV | 250V 慢速 2.5h/1000V 快速 1h/8000V 快速 3h/8000V 快速 7h/500V 快速 30min |
| 11cm | V | 250v 慢速 3.5h/1000V 快速 1.5h/8000v 快速 3h/8000V 快速 7h/500V 快速 30min |
| 11cm | VI | 250V 快速 4h/1000V 快速 2h/4000V 快速 1h/8000V 快速 2.5h/8000V 快速 7h/500V 快速 30min |
| 11cm | VII | 250v 慢速 0.5h/1000V 快速 0.5h/4000V 快速 1h/8000V 线性 1h/8000V 快速 5h/500V 快速 30min |
| 11cm | VIII | 250V 慢速 3h/1000V 快速 1h/4000V 快速 1 小时/6000V 快速 1h/8000V 快速 1h/8000V 快速 6h/500V 快速 0.5h |
| 17cm | IX | 250V 线性 1h/1000V 线性 1h/4000V 线性 2h/8000V 线性 3h/8000V 线性 10h/500V 快速 0.5h |

a) 表中程序均设定极限电流为 65μA/根胶,聚焦温度为 20℃
20min。DTT、IAA 的用量:(1)DTT 用量 0.13mmol/ml, IAA 用量 0.14mmol/ml; (2) DTT 用量 0.195mmol/ml, IAA 用量 0.21mmol/ml。

1.3.6 染色 染色采用银染方法^[14]。电泳结束后,取出凝胶放入染色盘中,经固定、敏化、定影、显影,得到染色后的凝胶,采集图像。染色过程中敏化后的洗脱充分与否及最后的显影时间对结果的影响较大,为比较其效果,对洗脱和显影各分两组条件进行实验。洗脱:(1)洗脱 3×5min;(2)洗脱 5×5min。显影:(1)显影 30min;(2)显影 10min。

2 结果

2.1 蛋白质的水化条件对电泳效果的影响

2.1.1 不同配方的水化液对结果的影响 把样品用不同配方的水化液处理(图 1),结果表明用水化液(I)处理样品所得蛋白点很少,用水化液(III)处理同样品所得的蛋白点要多一些。由此可知水化液(III)比水化液(I)更能使蛋白质分散于溶液中,即水化液(III)的水化效果比水化液(I)的水化效果好。

2.1.2 不同温度下水化效果比较 为了探讨温度对水化条件效果的影响,选择低温(10℃)和室温(25℃)两种处理,结果表明 10℃ 放置 2h 所得蛋白点不多同时也存在少许纵横条纹(图 2 a); 25℃ 放置 2h 虽存在较多的纵横条纹但所得蛋白点多(图 2b),由此可知,温度对蛋白质的水化影响较大,一般在 25℃ 环境中进行水化为宜。

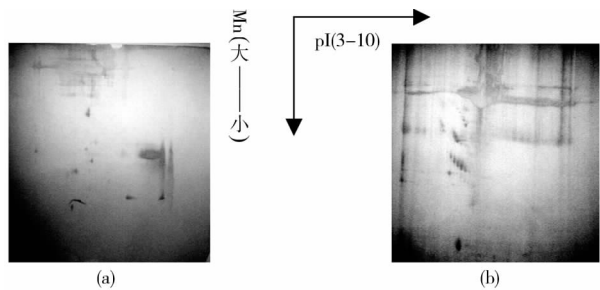


图1 不同配方水化流对结果的影响
(a)水化液(I) (b)水化液(III)

Fig.1 The influence of the different rehydration solution to the 2-dimensional electrophoresis result

2.2 聚焦程序对电泳效果的影响

把样品用不同的聚焦程序进行处理(图3),结果表明,程序 I 所得的蛋白点少,程序 II 所得的蛋白点少且有一些纵横条纹,程序 III 所得蛋白点几乎没有,程序 IV 所得蛋白点少且纵横条纹多而粗,程序 V 所得蛋白点几乎没有且纵横条纹多,程序 VI 所得蛋白点较清

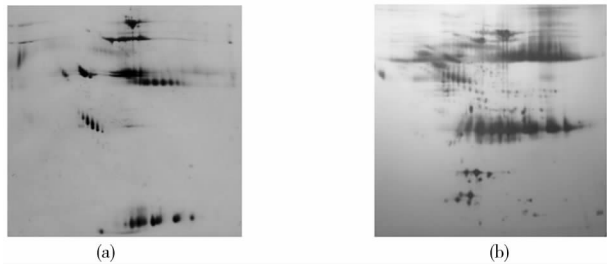


图2 温度对结果的影响
(a)10℃, 2h (b)25℃, 2h

Fig.2 The influences of the different rehydration temperature to the 2-dimensional electrophoresis result

楚,程序 VII 得到的蛋白点较多但有一些纵横条纹,程序 VIII 得到一些蛋白点但也有一些纵横条纹,程序 IX 得到的蛋白点较多且纵横条纹相对较少。由此可知,等电聚焦的程序设置是非常重要的,11cm 胶条采用程序 VI 合适,17cm 胶条采用程序 IX 合适。

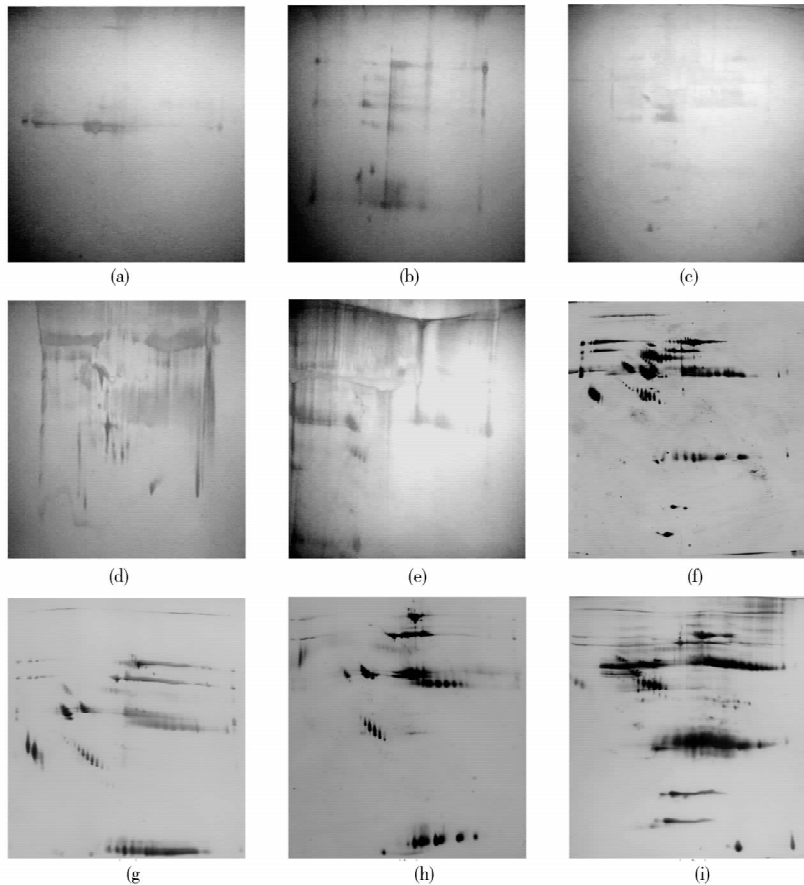


图3 聚焦程序对结果的影响

(a)程序 I (b)程序 II (c)程序 III (d)程序 IV (e)程序 V (f)程序 VI (g)程序 VII (h)程序 VIII (i)程序 IX

Fig.3 The influence of the different gel isoelectric focusing programmes to the 2-dimensional electrophoresis result

2.3 胶条平衡对结果的影响

2.3.1 平衡时间对电泳效果的影响 胶条聚焦完毕后,平衡不同的时间有不同的效果(图4)。胶条的两次平衡时间皆不足 15min 所得蛋白点不多且纵条纹很多,胶条的两次平衡时间都在 15~20min 所得的蛋白点多且纵条纹很少。由此可知,两次平衡时间应该在 15~20min 为宜。

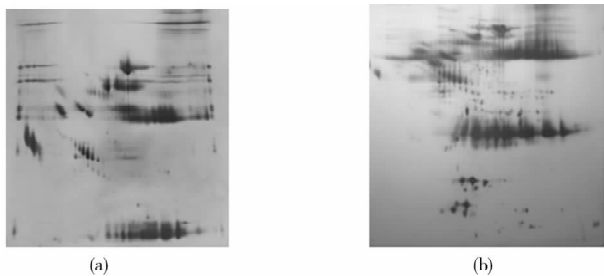


图4 平衡时间对结果的影响

(a)平衡 10min (b)平衡 20min

Fig.4 The influence of the different gel equilibration time to the 2-dimensional electrophoresis result

2.3.2 DTT 和 IAA 用量的影响 在平衡液母液中加入不同量的 DTT、IAA 进行胶条的平衡(图5),结果表明按参考用量 DTT 0.13mmol/ml, IAA 0.14mmol/ml, 所得蛋白点不多且有较多的纵条纹。按如上用量的 1.5 倍加入则得到较多的蛋白点且纵条纹较少。因此,在实验中 DTT 的用量为 0.195mmol/ml, IAA 用量为 0.21mmol/ml(平衡液 I 和平衡液 II 用量为 4ml/11cm 胶条或 6ml/17cm 胶条)。

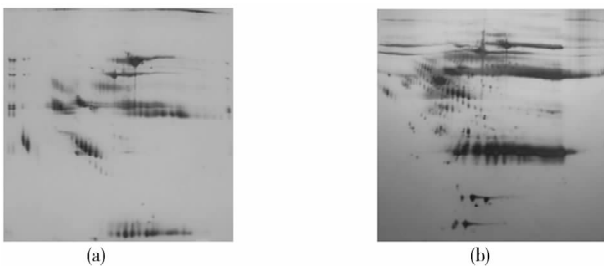


图5 DTT、IAA 用量对结果的影响

(a) DTT 0.13mmol/ml; IAA 0.14mmol/ml

(b) DTT 0.195mmol/ml; IAA 0.21mmol/ml

Fig.5 The influence of the different quantity of the DTT and IAA to the 2-dimensional electrophoresis result

2.4 凝胶的染色对结果的影响

2.4.1 凝胶敏化后的洗脱充分与否对结果的影响 凝胶染色过程中敏化后洗脱 3×5min 和洗脱 5×5min,

其效果(图6)完全不同。凝胶染色过程中敏化后洗脱 3×5min, 凝胶背景很深位点模糊不清;洗脱 5×5min 后凝胶较透明,位点清晰,有利于结果的分析。由此可见,凝胶在敏化后要洗脱充分彻底,不然就会背景很深,从而干扰蛋白质差异点的寻找。

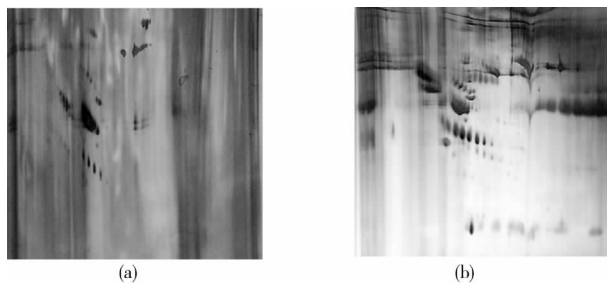


图6 凝胶敏化后的不同洗脱时间对结果的影响

(a)洗脱 3×5min (b)洗脱 5×5min

Fig.6 The influence of the different rinsing time to the 2-dimensional electrophoresis result

2.4.2 凝胶显影时间对结果的影响 凝胶染色过程中显影时间的长短对实验结果的影响比较表明,显影时间过长会使凝胶背景很深而影响结果分析(图7)。由此,操作中凝胶的显影时间应恰当,不能太长,否则会使凝胶的背景深而干扰蛋白质差异点的寻找。

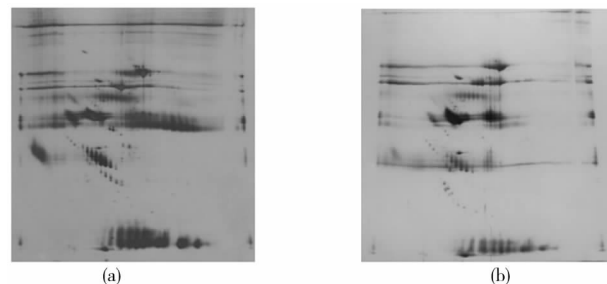


图7 凝胶显影时间对结果的影响

(a)显影 30min (b)显影 10min

Fig.7 The influence of the different visualization time to the 2-dimensional electrophoresis result

2.5 体系的重复性

通过优化双向电泳中蛋白质的水化、等点聚焦、胶条的平衡、凝胶的染色等关键步骤,建立了稳定性好、重复性高的双向电泳技术体系。重复 4 次,结果基本能重复,图8显示了其中的 2 次结果,可见相同条件的结果基本能重复。

2.6 乳腺癌患者血清样本的双向电泳分析

乳腺癌患者的血清作为乳腺癌阳性样本,用健康

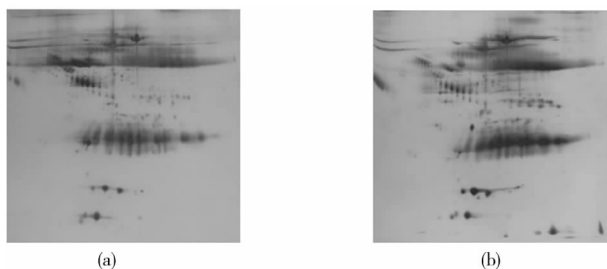


图8 双向电泳最优条件下两次重复结果

Fig.8 The two repeating result of the optimization condition of 2-dimensional gels electrophoresis

人群的血清为对照(阴性)样本,分别用试剂盒处理后,按已建立的最佳条件进行电泳分析,比较阳性和阴性样本,可以找到特异的蛋白位点(图9)。

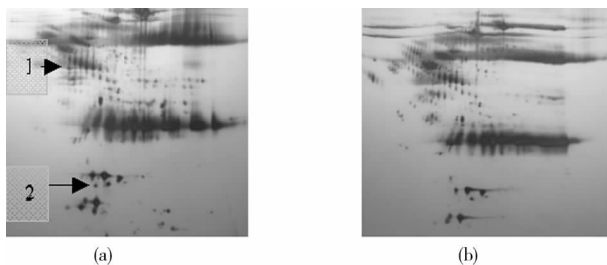


图9 乳腺癌样本的双向电泳分析

(a) 乳腺癌病人的血清样本 (b) 健康人的血清样本

Fig.9 The 2-dimensional electrophoresis analysis of the breast cancer patient's serum

3 讨论

在双向电泳中,样品水化对结果影响较大^[15]。目前,对样品的水化主要有热 SDS 法与直接溶解法。热 SDS 法^[10]是把血清与 SDS 的缓冲液混合,在 95℃ 下加热 5 min,待冷却后用缓冲液稀释。直接溶解法是取血清直接与上样缓冲液混合,由于缓冲液的一些物质如尿素在 30℃ 以上会使蛋白质发生甲酰化从而干扰蛋白质的分离,同时 SDS 的负电荷也会影响样品的等电点,从而干扰等电聚焦,因此,我们实验中选用直接溶解法水化样品。为使蛋白质(水溶性的和疏水的)尽可能地溶解,我们采用了不同的水化液(I 和 III)进行水化,最后确定水化液 III(尿素 5mol/L,硫脲 2mol/L,CHAPS 2%,SB3-10(N-decy-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propane sulfonate)2%,DTT 65mmol/L)效果最好;同时比较了不同温度下的水化效果,确定在 25℃ 下水化得到很好的效果。

等电聚焦是双向电泳中的关键步骤,聚焦效果的好坏关系到蛋白分离的成败^[19,20]。目前已有报道之间的程序都不一样^[9-12],我们比较了 9 种不同的聚焦程序,确定 11cm 胶条采用程序 VI(250V 慢速 4h/1000V 快速 2h/4000V 快速 1h/8000V 快速 2.5h/8000V 快速 7h/500V 快速 30min)最合适,17cm 胶条采用程序 IX(250V 线性 1h/1000V 线性 1h/4000V 线性 2h/8000V 线性 3h/8000V 线性 10h/500V 快速 0.5h)合适。

由于第一向聚焦和第二向 SDS-PAGE 电泳的背景不一致,在进行第二向电泳之前必须把聚焦后的胶条进行平衡^[21]。平衡为两次,第一次是用胶条平衡缓冲液 I,使聚焦后聚集的蛋白质再次分散并被 SDS 包裹;第二次是用胶条平衡缓冲液 II,使第一次平衡中被活化的基团被封闭以及去掉第一次平衡中残留的 DTT。为使两次平衡达到很好的效果,我们比较了两次平衡的时间及 DTT 和 IAA 用量对实验结果的影响,得出了最佳的平衡时间和合适的 DTT、IAA 用量:两次平衡时间应该在 15~20min 为宜;DTT 的用量为 0.195mmol/ml,IAA 用量为 0.21mmol/ml(平衡液 I 和平衡液 II 用量为 4ml/11cm 胶条或 6ml/17cm 胶条)。

凝胶染色的方法很多,常见的有考马斯亮蓝染色、银染、放射自显影和使用荧光染料^[22-24]。考虑到成本及操作方便等因素,大多用考马斯亮蓝染色和银染。考马斯亮蓝染色的检测极限一般认为是 100ng,灵敏度是银染的 1/100,故在研究分析中用银染较多。我们比较了银染中敏化后洗脱时间及显影时间长短对结果的影响,得出了最佳的时间:洗脱 5×5min;显影 10min。

我们经过了较为详细的探讨分析,建立了重复性好、分辨率高的血清样品双向电泳技术体系。由于不同的样本,设备,处理条件都会有差异,因此需要对具体的样本进行条件优化,本研究就双向电泳的主要影响因素对分离效果的影响以及优化范围提供了很好的参考。

参考文献

- [1] 冯钜涛,刘银坤,代智,等. 血清蛋白质组分析技术筛选肝癌自发抗体. 中华肝脏病杂志,2005,13(11):832~835
Feng J T, Liu Y K, Dai Z, et al. Chinese Journal of Hepatology,2005,13(11):832~835
- [2] 王鲁宁,杨国锋,何思志,等. 人小脑与额叶的比较蛋白质组学分析. 中华内科杂志,2005,44(4):254~257
Wang L N, Yang G F, He S ZH, et al. Chin J Intern Med,

- 2005, 44(4):254~257
- [3] Zhan X Q, Guan Y J, Li C, et al. Differential proteomic analysis of human lung adenocarcinoma cell line A-549 and of normal cell line HBE. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2002, 34(1):50~56
- [4] 刘池波,潘春琴,孙灵芬.应用 SELDI-TOF-MS 技术建立肝癌筛选血清蛋白质指纹图谱模型. *世界华人消化杂志*, 2006, 14(23):2354~2357
- Liu CH B, Pan CH Q, Sun L F. *World Journal of Gastroenterology*, 2006, 14(23):2354~2357
- [5] 贾宇峰,林秋霞,郭尧君,等.蛋白质双向电泳图像分析. *生物化学与生物物理进展*, 2001, 28(2):246~258
- Jia Y F, LIN Q X, Guo Y J, et al. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2001, 28(2):246~258
- [6] 钟伯雄,陈金娥,颜新培,等.家蚕催青后期胚胎蛋白质双向电泳图谱分析. *昆虫学报*, 2005, 48(4):637~642
- Zhong B X, Chen J E, Yan X P, et al. *Acta Entomologica Sinica*, 2005, 48(4):637~642
- [7] 何瑞锋,丁毅,余金洪.水稻温敏叶绿素突变体叶片蛋白的双向电泳分析. *作物学报*, 2001, 27(6):876~879
- He R F, Ding Y, Yu J H. *Acta Agronomica Sinica*, 2001, 27(6):876~879
- [8] 夏其昌,曾嵘.蛋白质化学与蛋白质组学.北京:科学出版社, 2004. 242~280
- Xia Q CH, Zhen R. *Protein Chemistry and Proteomics*. Beijing: Science Publishing Company, 2004, 4:242~280
- [9] 李雪华,李欣,丁彦青.血清蛋白质组双向凝胶电泳技术的建立. *中国现代医学杂志*, 2007, 7(3):325~328, 355
- Li X H, Li X, Ding Y Q. *China Journal of Modern Medicine*, 2007, 7(3):325~328, 355
- [10] 赵亮,丁彦青,梁莉,等.两种样品制备方法对血清蛋白质双向凝胶电泳分离效果的影响. *南方医科大学学报*, 2007, 27(1):5~8
- Zhao L, Ding Y Q, Liang L, et al. *J South Med Univ*, 2007, 27(1):5~8
- [11] 刘萍,章怡玮,乔健.脾肾虚型重症肌无力患者血清双向电泳图谱的建立及分析. *中西医结合学报*, 2007, 5(2):150~154
- Liu P, Zhang Y Y, Qiao J. *Journal of Chinese Integrative Medicine*, 2007, 5(2):150~154
- [12] 罗桂花.青海不同种群牦牛的血清蛋白电泳分析. *兽类学报*, 1997, 17(1):48~52
- Luo G H. *Journal of Animals*, 1997, 17(1):48~52
- [13] Herbert B, Galvani M, Hamdan M, et al. Reduction and alkylation of proteins in preparation of two-dimensional map analysis: why, when and how? *Electrophoresis*, 2001, 22:2046
- [14] Mortz E, Krogh T N, Vorum H, et al. Improving silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis. *Proteomics*, 2001, 1(11):1359~1363
- [15] Joo W A, Lee D Y, Kim C W. Development of an effective sample preparation method for the proteome analysis of body fluids using 2-D gel electrophoresis. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2003, 67(7):1574~1577
- [16] 罗新华,杨勤,张权,等.乙型肝炎肝纤维化组织双向电泳技术的优化. *世界华人消化杂志*, 2007, 15(13):1554~1557
- Luo X H, Yang Q, Zhang Q, et al. *World Journal of Gastroenterology*, 2007, 15(13):1554~1557
- [17] Ramagli L S. 2-D Proteome Analysis Protocols. In: Link A J. *Methods in Molecular Biology*, Totowa: Humana Press, 1999. 99~103
- [18] Gorg A, Postel W, Gunther S. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 1998, 9:531~546
- [19] Nagalla S R, Canick J A, Jacob T, et al. Proteomic analysis of maternal serum in down syndrome: identification of novel protein biomarkers. *J Proteome Res*, 2007, 6(4):1245~1257
- [20] Chen J H, Chang Y W, Yao C W, et al. Plasma proteome of severe acute respiratory syndrome analyzed by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(49):17039~17044
- [21] Watarai H, Inagaki Y, Kubota N, et al. Proteomic approach to the identification of cell membrane proteins. *Electrophoresis*, 2000, 21(2):460~464
- [22] Yuan X, Russell T, Wood G, et al. Analysis of the human lumbar cerebrospinal fluid proteome. *Electrophoresis*, 2002, 23:1185~1196
- [23] Rabilloud T, Strub J M, Luche S, et al. A comparison between SyproRuby and ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) as fluorescent stains for protein detection in gels. *Proteomics*, 2001, 1:699
- [24] He Q Y, Lau G K, Zhou Y, et al. Serum biomarkers of hepatitis B virus infected liver inflammation: a proteomic study. *Proteomics*, 2003, 3(5):666~674

The Condition Optimization of 2-dimensional Gels Electrophoresis Technology for the Serum Sample Analysis

XIANG Ming-jun^{1,2} YE Jin-hua¹ YU Min² MA Ming-xing² BEI Zhan-yu¹
WANG Xi-cai³ TAN De-yong²

(1 Basic Medical College, Gannan Medical University, Ganzhou 341000, China)

(2 Yunnan University, Kunming 650091, China)

(3 Tumor Institute of Tumor Hospital of Yunnan Province, Third Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650118, China)

Abstract To establish the serum sample 2-dimensional gels electrophoresis which has the high resolution and good repetition, some aspects in the 2-dimensional gels electrophoresis such as the serum sample solubilization, the gel isoelectric focusing, the gel equilibration and the gel stain are analyzed, and the high resolution and good repetition results are obtained, which are the serum sample solubilization 2h at 25℃, IPG strip rehydration 12h to 16h at 25℃, the gel isoelectric focusing at 250 linear ramp 1h/1000v linear ramp 1h/4000v linear ramp 2h/8000 v linear ramp 3h/8000v linear ramp 10h/500v rapid 30min for 17cm IPG strip or 250v slow ramp 4h/1000v 2h/4000v rapid ramp 1h/8000v linear ramp 2.5h/8000v rapid ramp 7h/500v rapid ramp 30min for 11cm IPG strip, the gel equilibration twice at 15min to 20min each time, the silver staining on fixation 2h or to stay overnight/ sensibilization 50min to 60min/ fixing 30min to 40min/ visualization 10min termination 10min. It is referred to the serum sample analysis in 2-dimensional gels electrophoresis technology.

Key words Serum sample 2-Dimensional gels electrophoresis Optimization