

# 2-DE 技术中疏水性和碱性蛋白质的研究进展

曹 晶, 谢锦云, 张丽军, 陈 平, 梁宋平

(湖南师范大学 生命科学学院 蛋白质化学研究室, 中国湖南 长沙 410081)

**摘 要:** 双向凝胶电泳(2-DE)具有高分辨率、高通量等特点,已被广泛地用于蛋白质组的分离。但是它在分离疏水性蛋白质和碱性蛋白质时却遇到了极大的挑战。然而,疏水性与碱性蛋白质在全蛋白质中占相当大的比例,且具有很重要的生物学意义。因而,近年来,越来越多的研究者将目标瞄准这些蛋白质,并且取得了一些令人鼓舞的进展:用亚细胞预分离技术,顺序提取法等方法来富集疏水性蛋白质,用一些新的有效的增溶剂如硫脲, ASB-14 等来改善疏水性蛋白质的溶解,应用这些技术 2-DE 可分辨出总平均疏水值达 0.80 的蛋白质;在碱性蛋白质分离方面,通过等电聚焦预处理,使用窄 pH 梯度胶条等大大地改善了碱性蛋白质在 2-DE 中的分离,能分辨出等电点达 11.7 的蛋白质。现对 2-DE 技术中疏水性和碱性蛋白质分离的研究进展进行综述。

**关键词:** 蛋白质组学;双向凝胶电泳;疏水性蛋白质;碱性蛋白质

中图分类号:Q51

文献标识码:A

文章编号:1007-7847(2004)03-0207-08

## The Application of 2-DE Technique to Hydrophobic Proteins and Alkaline Proteins

CAO Jing, XIE Jin-yun, ZHANG Li-jun, CHEN Ping, LIANG Song-ping

(The Laboratory of Protein Chemistry, College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, Hunan, China)

**Abstract:** Two-dimensional gel electrophoresis(2-DE) has the property of high resolution, high-throughput, so it has been used for the isolation of proteins widely, but it has continued to be a great challenge to separate hydrophobic proteins and alkaline proteins. However, hydrophobic proteins and alkaline proteins account for big scale in global proteins and they are meaningful in biology. Therefore, recently, more and more researchers have aimed at these proteins, and make some invigorating progress: enriching hydrophobic proteins by subcellular prefractionation, sequential extraction. and using chaotropes such as thiourea, ASB-14 to improve the solubility of hydrophobic proteins. Thus, the proteins with high grand average hydrophobicity (GRAVY) values even up to 0.80 can be detectable now. For improving the separation of alkaline proteins, it is helpful to use isoelectric focusing prefractionation technology, and narrow range immobilized pH gradients strips. Thus, the proteins with high pI even up to 11.7 are detectable now. The recent evolution of the separation of hydrophobic proteins and alkaline proteins by 2-DE technology are reviewed.

**Key words:** proteomics; two-dimensional gel electrophoresis(2-DE); hydrophobic proteins; alkaline proteins  
(Life Science Research, 2004, 8(3): 207 ~ 214)

收稿日期:2004-04-02; 修回日期:2004-06-23

基金项目:国家 973 基金资助项目(CBS-102)

作者简介:曹晶(1981-),女,湖南郴州人,硕士研究生,从事蛋白质组学研究, Tel :+86-0731-8872556, E-mail :caojingood@

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net  
1994-2011 梁宋平(1946-)男,湖南安化人,湖南师范大学教授,博士,博士生导师,通讯作者,主要从事蜘蛛毒素与蛋白质组学研究

在国际人类基因组计划完成后，探寻生命奥秘的下一步关键就是在蛋白质组层面进行研究。蛋白质组学研究者面前的第一大难题是如何对高达十万乃至百万个的蛋白质进行大规模全息化分离，这也是对分离科学的一大挑战。目前蛋白质组研究应用到的分离技术有多种，包括双向凝胶电泳、多维色谱技术、亲和色谱技术、蛋白芯片技术等，应用得最多的是双向凝胶电泳，它对蛋白质分离的能力是其它技术无法超越的<sup>[1]</sup>，尤其是固相 pH 梯度应用于双向电泳的第一向的分离。虽然，应用固相 pH 梯度等电聚焦能很好的解决可溶性蛋白和高丰度蛋白的分离，但对疏水性蛋白质、极端碱性蛋白质、分子质量特大或特小的蛋白质的分离仍有一定困难<sup>[2]</sup>。

疏水性蛋白质 (hydrophobic proteins) 包括膜蛋白、结构蛋白和脂蛋白等<sup>[3]</sup>，疏水性程度可用总平均疏水值 (grand average hydrophobicity values, GRAVY) (蛋白质各残基疏水值之和) 来衡量。采用 Kyte-Doolittle<sup>[4]</sup> 算法，用 GCG PepPlot 软件计算 GRAVY，GRAVY 为正的是疏水性蛋白质，

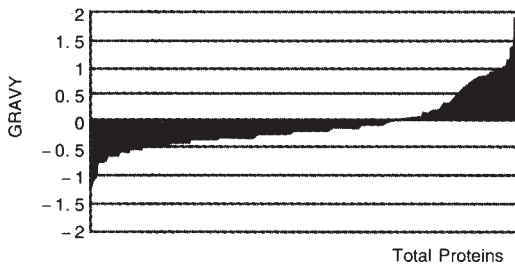


图 1 *E. coli* 全蛋白的 GRAVY 图  
Fig.1 The GRAVY distribution for total proteins of *E. coli*

碱性蛋白质 (alkaline proteins) 包括组蛋白、染色体蛋白、核糖体蛋白和鱼精蛋白等<sup>[3]</sup>，碱性蛋白质在总蛋白质中占有相当大的比例，比如在人胎肝总蛋白质中约占 40%，因此，解决其在 2-DE 中的分离具有重大的意义。

因为疏水性和碱性蛋白质在全蛋白中占了相当大的比例及其重要的生物意义，近年来，越来越多的研究者将目标瞄准这些蛋白质，并且取得了一些可喜的成绩，下面就 2-DE 技术中疏水性和碱性蛋白质的分离的最新研究进展作一个简单介绍。

GRAVY 为负的是亲水性蛋白质，GRAVY 越大，疏水性就越强<sup>[5]</sup>。由图 1 可见，*E. coli* 的疏水性蛋白质含量高，约占总蛋白质的 30%，而且 GRAVY 可高达 1.8，但它们在 2-DE 中很难得以体现，常规 2-DE 中展现的蛋白质的 GRAVY 一般小于 0，通常专门的膜蛋白研究中其 GRAVY 大于 0 的也只占 10% 左右 (图 2 是 Fountoulakis 和 Gasser<sup>[6]</sup> 研究 *E. coli* 膜蛋白时鉴定到的膜蛋白的 GRAVY 图，GRAVY 大于 0 的约占 12%)。其主要原因是：疏水性蛋白质难溶，在等电点易沉淀，低丰度。然而，疏水性蛋白质如膜蛋白是神经系统科学研究的重要目标，它占人类整个基因编码蛋白质 20% ~ 30%<sup>[7]</sup>，参与生物体内许多重要过程如物质运送、能量转换、细胞识别、细胞免疫、神经传导和代谢调节以及激素和药物作用等等<sup>[3]</sup>。因此，对疏水性蛋白质的研究意义重大，许多研究组 (包括我们实验室) 都致力于解决疏水性蛋白质的分离鉴定问题，并且取得了一些进展，主要集中在疏水性蛋白质的富集和溶解上。

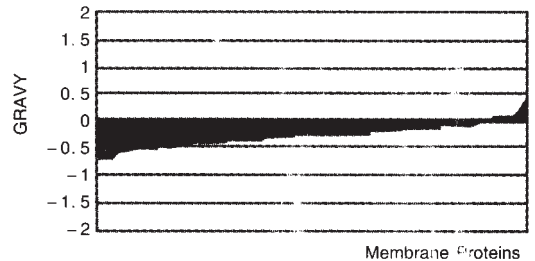


图 2 鉴定到的 *E. coli* 膜蛋白的 GRAVY 图  
Fig.2 The hydrophobicity profiles of the proteins identified of *E. coli* membrane proteins

### 1 样品的预处理

样品的预处理对蛋白质组的分离起着非常重要的作用<sup>[8,9]</sup>。样品预处理的目的在于：将成千上万种难以一次性分辨的蛋白质，进行样品的预分级分离，这样能使蛋白质更好地在双向凝胶中显示出来，同时有利于富集低丰度蛋白质<sup>[10]</sup>。

#### 1.1 亚细胞器分级分离

由于不同蛋白质的溶解度不同，对疏水性强的蛋白质使用一步法很难提取出来，同时，疏水性蛋白质相对丰度较低，这样在一开始制备样品时就会丢失重要的蛋白质。目前一些实验室采用亚

细胞器分级分离蛋白质<sup>[11]</sup>,即基于蛋白质组分的大小和密度的不同,采用超速离心分离出不同细胞器,如质膜、线粒体、细胞核等组分,该法可以获得尽可能多的蛋白质,还可以确定被测蛋白质的亚细胞部位。

## 1.2 顺序提取法

顺序提取法是基于不同蛋白质的溶解度的差异,结合不同强度离液剂(chaatropes)表面活性剂(surfactants)提取不同的蛋白组分<sup>[2]</sup>。Klose<sup>[12]</sup>等报道了 3 步顺序提取法,第 1 步抽提可溶性蛋白质,第 2 步用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液、0.2 mol/L KCl、20% 甘油、1 mmol/L PMSF、25 mol/L 脲及 2% CHAPS,进行抽提第 1 步的不溶性组分,从而获得了来自细胞膜的蛋白质、细胞的结构蛋白及细胞器中的蛋白质等疏水性蛋白质;第 3 步是采用 50 mmol/L Tris 碱、1 mmol/L MgSO<sub>4</sub>、benzonase (一种降解 DNA 的酶)处理第 2 步的不溶性组分,从而获得了碱性的组蛋白及染色体中的蛋白质。据报道应用这种分级顺序抽提方法抽提肝细胞中的总蛋白质,然后将不同组分进行 2-DE 分离,共获得约 11 270 个不同的蛋白质点。Molloy<sup>[13]</sup>等首先提出的 4 步抽提法,应用增溶剂(硫脲,尿素)表面活性剂 CHAPS、还原剂 TBP 富集到了常规提取法不能溶解的疏水性膜蛋白。

## 1.3 根据等电点进行预分离

为了减少样品的复杂性,富集低丰度蛋白质,提高对碱性蛋白质的分离,当前最有前景的预分离方法是:在做窄的 pH 范围的 2-DE 之前,根据等电点的不同进行预分离,即在另一 IEF 装置上进行预聚焦,将蛋白质按不同等电点范围分成不同组分。近来,Gorg<sup>[14]</sup>等设计一个简单、便宜、快速的样品预分离程序:在 2-DE 之前,将鼠肝脏蛋白质样品先进行交联葡聚糖等电聚焦,使蛋白质沿着 pH 梯度聚焦成 10 个凝胶片段,再将这些凝胶片段切割下来,转移到 IPG 胶条上,进行双向电泳。这种方法的主要优点是:由于预分离得到的样品不需要进行稀释、洗涤、浓缩、去盐,而且在交联葡聚糖等电聚焦片段中的载体两性电解质对随后的 IPG-IEF 没影响,预分离的蛋白质能够很好地从交联葡聚糖等电聚焦片段中等电转移到 IPG 胶条中,这种电泳方法是一种很好的分离极酸或极碱蛋白质的方法。另外,BIO-RAD 公司研制的 Rotofor 体系<sup>[15]</sup>根据蛋白质所带电荷的多少,能在 4 h 内将样品分成 20 个组分。发玛西亚公司研制

的 Iso-Prime 体系,也是一种很好的根据等电点进行预分离的装置<sup>[16]</sup>。

## 1.4 其它的预处理方法

除了根据蛋白质所处的亚细胞部位、蛋白质的溶解性、等电点进行预分离外,还可以对样品进行分子筛、疏水色谱等预处理。Mary F. Lopez<sup>[17]</sup>等以线粒体蛋白质为材料,用辛基琼脂糖树脂亲和柱来富集疏水性蛋白质。

# 2 蛋白质的提取

## 2.1 裂解液的改进

Dr. B. M. Riederer<sup>[18]</sup>等在综述中对样品缓冲液的组成作了一个很好的分析。对于疏水性蛋白质而言,离液剂硫脲的引进改善了其溶解性<sup>[19-22]</sup>,但是如果第一向电泳前进行蛋白质还原和烷基化时,在 pH 8.5-9 胶条处,硫脲的硫原子会和碘乙酰胺(IAA)反应,影响蛋白质的烷基化,为了避免这种情况发生,可以先不在溶解液中加入硫脲,蛋白质烷基化后,再将硫脲加到样品液中<sup>[23]</sup>,再进行第一向电泳;或者在第一向电泳之后,平衡时再将蛋白质烷基化。实际应用中常用 2 mol/L 硫脲与 5~7 mol/L 尿素联合使用<sup>[24]</sup>,这样有利于对于疏水性蛋白质的溶解和提取。对于疏水性蛋白质而言,研究者探讨得最多,改进的最多的是寻找和使用更好的去垢剂。近年来,研究者发现和合成了一些新的有效的去垢剂:非离子型去垢剂如 Tween 80、NP-40、Triton X-100、Triton X-114<sup>[25]</sup>等,和更有效的两性离子去垢剂如 CHAPS、SB3-10、SB3-8、ASB-14、ASB-16、C8 $\phi$ 、C7 $\phi$ <sup>[26]</sup>等以及还原剂三丁基磷(TBP),选择一向 IEF 的去垢剂时,还要考虑去垢剂是否能溶解于尿素,如 SB3-10 是一种很强的去垢剂,却只能溶于低浓度的尿素,但是弱一些的去垢剂 SB3-8 能溶于高浓度的尿素,ASB-14 是一种能溶于高浓度尿素(9M)的强去垢剂。还值得一提的是,一些研究者还对各种去垢剂的溶解能力作了比较,Henningsen<sup>[27]</sup>等比较了 5 种去垢剂对内在膜蛋白受体 rP2X3 的溶解能力,发现:C8 $\phi$ >CHAPS>ASB-14>SB3-10 $\geq$ ASB-16。对于溶解内在膜蛋白 FLAG-hH2R,C8 $\phi$  仍是最强的,但 ASB-14 比 CHAPS 强,这说明选择去垢剂和合适的溶解试剂主要由蛋白质本身性质决定,这需要从实践中获得经验。同时,科研工作者还将几种去垢剂结合,发现恰当的结合可以增加溶解效果,如将 CHAPS、ASB-14 等与高浓度的尿素和

2 mol/L 的硫脲混合使用可以大大的提高膜蛋白在等电聚集时的溶解性能,提高膜蛋白从第一向转移到第二向时的转移率,将 ASB-14 和 C8 $\phi$  联合使用可以增加对疏水性蛋白质的分离<sup>[28]</sup>. 样品缓冲液还需要加一些载体两性电解质,这样可以抑制碱性端的疏水性蛋白质和 Immobilines 的相互作用. 通过对样品预分离处理和有效的增溶剂的使用,疏水性蛋白质的富集和溶解已经取得了明显的进展,可以分离鉴定到的蛋白的最大疏水值达到了 0.80<sup>[29]</sup>.

## 2.2 有机溶剂的提取

根据相似相溶原理,有机溶剂可以较好地溶解疏水性蛋白质,当膜用适当比例的 CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH 处理后可以提取到疏水性蛋白质相当强的整合膜蛋白<sup>[30-32]</sup>,Dr. Rolland<sup>[32,33]</sup>等发现 CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH 为 5:4 对叶绿体膜蛋白的提取效果最好. Dr. Michael Hecker<sup>[34,35]</sup>等在实验中证明:用三氯乙酸/丙酮(TCA/acetone)沉淀纯化蛋白质后可分离到更多的蛋白质,包括疏水性蛋白质和碱性蛋白质.

## 3 2-DE 中蛋白质的分离

### 3.1 第一向等电聚焦(IEF)

#### 3.1.1 试剂的改进

蛋白质研究大规模化,全息化的障碍之一是 2-DE 中碱性端的分离很糟糕,一般对 PI 值大于 7 的蛋白质的分离感到困难<sup>[36]</sup>. Dr. Stuart J. Cordwell<sup>[37]</sup>等提到碱性蛋白质在 2-DE 中难分离的 3 个主要原因及其对策如下:

1) 还原剂的迁移. 为了完全使蛋白质折叠打开,需断开蛋白质分子内的二硫键,一般使用二硫苏糖醇(DTT), $\beta$ -硫基乙醇和二硫赤藓糖醇(dithioerythritol, DTE)作还原剂,但这些硫醇还原剂本身带有负电荷,在等电聚焦时,常常向阳极移动,这使得阴极端的 DTT 耗尽,导致某些蛋白质的二硫键重新配对,使样品溶解度降低而重新沉淀下来,造成水平条纹. Herbert<sup>[38-40]</sup>等采用非离子还原剂如三丁基膦(tributyl-phosphine, TBP)代替含硫醇还原剂, TBP 的还原效果比 DTT 强,可大大增加蛋白质的溶解性并可帮助蛋白质从第一向转移到第二向. TBP 的优点是不带电,这样在等电聚焦过程中碱性端的 TBP 并不像带负电的 DTT 那样向正极移动,但是, TBP 不稳定<sup>[41,42]</sup>,半衰期短只有几个小时. 有人提出,在抽提的时候使

用 TBP,在再水化和聚焦过程中使用 DTT. 或者在使用 TBP 做还原剂时,也加 DTT 使蛋白质在整个水化和聚焦过程中都维持还原状态<sup>[42]</sup>. 针对 IEF 时还原剂 DTT 发生迁移,一些研究者提出了其它一些克服方法:Kyla Dr. Sjouke Hoving<sup>[41]</sup>等提出在 IPGstrip 阴极处加过量的还原试剂 DTT,从而防止因缺少 DTT 使蛋白质重新沉淀下来;Kyla Pennington<sup>[36]</sup>等以人的脑组织碱性蛋白为材料,证明了在 IEF 之前,在阳极以样品上样杯方式上样,并且在胶条水化液中加二硫酸羟己基(hydroxyethylidissulphide, HED)可以改善 2-DE 对碱性蛋白质的分辨率. Olsson I<sup>[43,44]</sup>等提出用 HED 代替 DTT 来改善对碱性蛋白质的分离.

2) 反向电渗流 REOF(reverse-endosmofic flow)的影响<sup>[45]</sup>. 在碱性 IPGs 中,离子化的水朝阳极移动形成 REOF,根据 Gorg<sup>[46]</sup>的报道,在这种情况下,水的转运撞击蛋白质的稳定聚焦. 为了抵消这种效应的影响,在凝胶基质或胶条水化液中加入山梨糖醇、甲基纤维素、异丙醇和甘油<sup>[41,45]</sup>等试剂可以阻止这一过程,改善蛋白质在碱性 IPG 胶条中的聚焦状况.

3) 丙烯酰胺的水解. 在极酸或者极碱的条件下,丙烯酰胺不稳定,易水解形成丙烯酸<sup>[37,45,47]</sup>,基质中这些带电基团的存在形成了 EOF(endosmofic flow),使得 IEF 中的 pH 梯度不稳定,会影响蛋白质的分离,降低蛋白质的分辨率. 由于丙烯酰胺的局限性,这些年来人们正在寻求新材料以适合电泳分离的需要. Chiari 和 Righetti<sup>[48]</sup>对电泳用的新型分离材料,包括丙烯酰胺单体的一些替代物和新型大孔材料做了综述. 其中丙烯酰胺氧乙基乙醇(N-acryloylaminoethoxyethanol, AAEE)具有极强的水解稳定性,即使在 0.1 mol/L NaOH 中,70 $^{\circ}$ C 时也十分稳定,在酸性环境中也同样十分稳定,它还具有高度亲水性,适合作为酸、碱性 pH 范围等电聚焦的支持介质. Mark P. Molloy 等对丙烯酰胺,及其 N 取代衍生物二甲基丙烯酸酰胺(dimethylacrylamide, DMA)和 AAEE 3 种基质的 pH8-10 胶条进行了比较发现:至少 20 个碱性很强的蛋白质用 DMA 和 AAEE 能分离得到,但用标准的丙烯酸酰胺凝胶分离不到,有文献报道<sup>[49]</sup>这不仅因为丙烯酰胺易水解,还因为其疏水性使蛋白质分辨率降低,另外,AAEE 还具有高度亲水性,比 DMA 更适合做碱性 IEF 的支持介质.

还值得一提的是:不少蛋白质既是疏水性蛋

白质,也是碱性蛋白质,如膜蛋白中碱性蛋白的比例是相当大的,组蛋白、核糖体蛋白质等碱性蛋白是疏水性蛋白质。Mark P. Molloy<sup>[44]</sup>等以 *Caulobacter crescentus* 为材料,采用 pH8-11 的 IPG 胶条,研究了几个可能影响碱性膜蛋白分离的因素(包括样品上样方式——胶内水化上样、阳极以及阴极杯上样、胶的基质组成等)。Mark P. Molloy 等发现样品上样位置是最大的影响膜蛋白分离的因素,阳极杯上样可以得到最高质量的 2DE 分离效果,2DE 分离后,他们用质谱鉴定了 32 个碱性膜蛋白。

### 3.1.2 IPGs 的改进

对于 IPGs 的改进,在 IEF 中,近年来,许多研究者试着用 pH 范围分布较窄的一向等电聚焦胶条分离蛋白质<sup>[50-52]</sup>,研究结果表明,窄范围 pH 梯度胶条在低丰度蛋白质、极酸、极碱蛋白质分离中有巨大的潜力,例如 Gorg<sup>[50]</sup> 等利用 pH 4-5, pH 4.5-5.5, pH 5-6, pH 5.5-6.7 和 pH 6-9 等窄范围 pH 胶条分离酵母蛋白质,一共分辨出了 2286 个蛋白质点,而用 pH 3-10 的胶条只鉴定出了 755 个蛋白质点。后来, Oguri<sup>[51]</sup> 等利用 pH 3.5-4.5, pH 4-5, pH 4.5-5.5, pH 5-6, pH 5.5-6.7, pH 6-9, pH 6-11 7 种窄范围 pH 梯度胶条,结合两种不同浓度(7.5%, 13.5%)的大面积 SDS 垂直二向胶分离大鼠海马神经元蛋白质,一共分辨出了 6 677 个蛋白质点,而用 pH 3-10 的胶条只分辨出 853 个蛋白质点,每个 pH 单位能鉴定到的蛋白点数明显增多,这足以证明 pH 重叠窄范围胶条在蛋白质分离中的巨大潜力。还可以通过延长第一向等电聚焦的分离距离,从 18 cm 到 24 cm,到 28 cm,甚至到 40 cm<sup>[53-55]</sup>,来提高分辨率。在实验中 pH 3-10 的胶条用得很普遍, Gorg<sup>[46,56]</sup> 等提出,用 pH 4-12, pH 9-12, pH 10-12 的胶条能更好的分离碱性蛋白质。他还提出用 pH 3-12 的胶条适合于全细胞的整体分离<sup>[55]</sup>,在他们的实验中把分离距离从 18 cm 扩大到 24 cm 来增加分辨率,用三氯乙烷/丙酮沉淀纯化,结果检测到了碱性非常强的核糖体蛋白质,但是 pH 3-10 的胶条没检测到这些蛋白质。

### 3.2 第二向凝胶电泳(SDS-PAGE)

双向电泳技术中第一向等电聚焦技术有了很多改进,但第二向 SDS-PAGE 电泳几乎没有太大的变化,只有水平和垂直两种形式, Gorg<sup>[57]</sup> 在 1995 年的综述中用图表明 SDS-PAGE 水平电泳在分辨

率、点的大小和分布方面都明显的优于垂直电泳。二硫键是否完全被还原是第二向的关键,因为只有二硫键被彻底还原后,蛋白质分子才能被解聚, SDS 才能定量地结合到亚基上而给出相对迁移率和分子量对数的线性关系。几乎所有的蛋白质都可以溶解在阴离子去污剂 SDS 中,甚至包括疏水和变性的蛋白,但高碱性蛋白(如精蛋白)和高酸性蛋白(如铁氧化还原蛋白)由于不能很好的结合 SDS,在电泳中,前者产生沉淀,后者会出现异常行为,所以应该用阳离子去污剂十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)<sup>[58]</sup>或十六烷基吡啶盐(CPC)<sup>[47]</sup>来代替 SDS,方法与 SDS 电泳基本相同,只是电泳方向是向阴极迁移。但这两种阳离子去污剂也都是一些局限性,如 CTAB 会在凝胶中产生沉淀物,影响蛋白迁移,影响蛋白和去污剂的结合平衡<sup>[59,60]</sup>,因此找到更合适的溶剂是有待解决的问题。

## 4 其它的 2-DE 技术

### 4.1 16-BAC/SDS-PAGE

膜蛋白等疏水性蛋白质用常规的 2-DE 技术分离时,在等电点附近,易发生沉淀,为了克服这个困难, Macfarlane<sup>[61,62]</sup> 提出了一种特殊的双向电泳技术:第一向为阴极电泳,第二向为阳极电泳的 2-DE 技术。第一向和 SDS-PAGE 相似,根据蛋白质的分子质量进行分离,用阳离子去垢剂二甲苄基十六烷基氯化铵(16-BAC)作为变性剂和助溶性试剂,是阴极电泳,第二向为 SDS-PAGE 阳极电泳。Joachim Hartinger<sup>[63]</sup> 等采用这种 2-DE 系统分离到带有 10 个以上跨膜区的膜蛋白。

### 4.2 2-DE 蓝染

由于常规 2-DE 技术对疏水性蛋白质的分离的限制和对蛋白质功能研究的限制, Brookes 等<sup>[64,65]</sup> 用 2-DE 蓝染技术对线粒体蛋白质进行分离和功能研究。在这种技术中,蛋白质在非变性的条件下溶解和进行第一向分离,第二向时将蛋白质变性,然后进行 SDS 凝胶电泳。这方法已成功地用于线粒体的信号传导混合物<sup>[64]</sup>,氧化磷酸化膜蛋白质组的研究,是与氧化磷酸化体系紊乱有关的几种疾病的诊断分析的有用的工具。

### 4.3 自由流电泳(free flow electrophoresis, FFE)

2DE 一向中,一些疏水性蛋白质和碱性蛋白质往往发生聚沉现象,用自由流电泳可以解决这个问题, FFE 是一种基于液相的等电聚焦的方法。

Dr. Simpson 等<sup>[66]</sup> 先用 FFE 将胞质溶胶蛋白质分

离成 96 个组分,再用 SDS-PAGE 作为第二向将各个组分分离,得到了满意的结果。

#### 4.4 非平衡 pH 梯度电泳(NEPHGE)

在 2-DE 中,NEPHGE(非平衡 pH 梯度电泳系统)<sup>[67]</sup>主要用于分离碱性蛋白质,蛋白质在等点聚焦电场中达到平衡前,电泳已结束,但鉴于其分辨率、重复性的限制和 IPG-DALT 分离碱性蛋白的优势,NEPHGE 电泳已不是分离碱性蛋白的优选方法。

## 5 展望

尽管近年来对 2-DE 技术有了多方面的改进,并且已经得到了广泛的应用,可检测到总平均疏水值达 0.80 的蛋白质和等电点达 11.7 的蛋白质<sup>[58]</sup>。然而这仍远远不能满足蛋白质组学全息化的需要。还有必要通过改善样品的预处理,寻找更好的去垢剂,优化 IEF 的条件等进一步优化 2-DE,再结合传统的 1D-MS/MS 以及最近发展起来的多维色谱技术、毛细管电聚焦在线串联质谱(CIEF-MS<sup>n</sup>)、鸟枪法(shotgun)等新的分离技术<sup>[68-71]</sup>,解决疏水性蛋白质和碱性蛋白质等蛋白质分离上的难点。我们有理由相信,通过全世界生物学家、化学家、物理学家等科研工作者的共同努力,这些问题将会得到圆满解决。

#### 参考文献(References):

- [1] FEY S J, LARSEN P M. 2D or not 2D. Two-dimensional gel electrophoresis[J]. *Curr Opin Chem Biol* 2001, 5(1): 26-33.
- [2] 陈主初,梁宋平. 肿瘤蛋白质组学[M]. 湖南长沙:湖南科学技术出版社(CHEN Zhu-chu, LIANG Song-ping. *Cancer Proteomics*[M]. Changsha: Hunan Science and Technology Publishing House) 2002. 9.
- [3] 王镜岩,朱圣庚,徐长法. 生物化学[M]. 北京:高等教育出版社(WANG Jing-yan, ZHU Sheng-geng, XU Chang-fa. *Biochemistry*[M]. Beijing: Higher Education Press) 2002. 9.
- [4] KYTE J, DOOLITTLE R F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein[J]. *J Mol Biol* 1982, 157: 105-132.
- [5] GERT L, KURT K, MICHAEL F. Proteomics in brain research: potentials and limitations[J]. *Progress in Neurobiology* 2003, 69: 193-211.
- [6] FOUNTOULAKIS M, GASSER R. Proteomic analysis of the cell envelope fraction of *Escherichia coli*[J]. *Amino Acids*, 2003, 24: 19-41.
- [7] WALLIN W, VIN H G. Genome-wide analysis of integral membrane protein from eubacterial, archaean and eukaryotic organisms[J]. *Protein Sci*, 1998, 7: 1029-1038.
- [8] BLACKSTOCK W P, WEIR M P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins[J]. *Trends Biotechnol*, 1999, 17(3): 121-127.
- [9] PASQUALI C, FIALKA I, HUBER L A. Preparative two-dimensional gel electrophoresis of membrane proteins[J]. *Electrophoresis* 1997, 18(14): 1573-1581.
- [10] LILLEY K S, RAZZAQ A, DUPREE P. Two-dimensional gel electrophoresis: Recent advances in sample preparation, detection and quantitation[J]. *Curr Op in Chem Biol*, 2002, 6(1): 46-50.
- [11] CORDWELL S J, NOUWENS A S, VERRILLS N M, et al. Subproteomics based upon protein cellular location and relative solubilities in conjunction with composite two-dimensional electrophoresis gels[J]. *Electrophoresis*, 2000, 21(6): 1094-1103.
- [12] KLOSE J, KOBALZ U. Two-dimensional electrophoresis of proteins: An updated protocol and implications for a functional analysis of the genome[J]. *Electrophoresis*, 1995, 16: 1034-1059.
- [13] HERBERT B R, MOLLY M P, WALSH B J, et al. Improved protein solubility in two-dimensional electrophoresis using tributyl phosphine as reducing agent[J]. *Electrophoresis*, 1998, 19: 845-851.
- [14] GORG A, BOGUTH G, ANGELIKA K, et al. Sample pre-fractionation with Sephadex isoelectric focusing prior to narrow pH range two dimensional gel[J]. *Proteomics*, 2002, 2: 1652-1657.
- [15] GAGNÉ J P, JOANNA M, HUNTER, et al. A proteomic approach to the identification of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins as a new family of poly(ADP-ribose)-binding proteins[J]. *Biochem J* 2003, 371: 331-340.
- [16] GLUKHOVSKIY P, TERRY A, VIGH G. Preparative-scale isoelectric focusing separation of enantiomers using a multi-compartment electrolyzer with isoelectric membranes[J]. *Electrophoresis*, 2000, 21(4): 762-776.
- [17] MARY F L, KRISTAL B S. High-throughput profiling of the mitochondrial proteome using affinity fractionation and automation[J]. *Electrophoresis* 2000, 21: 3427-3440.
- [18] MARGARET M S, BEAT M R. Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis[J]. *Proteomics* 2003, 3: 1408-1417.
- [19] RABILLOUD T, ADESSI C, GIRAUDEL A, et al. Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients[J]. *Electrophoresis*, 1997, 18(3-4): 307-316.
- [20] PASQUALI C, FIALKA I, HUBER L A. Preparative two-dimensional gel electrophoresis of membrane proteins[J]. *Electrophoresis*, 1997, 18(14): 2573-2581.
- [21] MOLLOY M P, HERBERT B R, WALSH B J, et al. Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis[J].

- Electrophoresis, 1998, 19(5): 837-844.
- [22] RABILLOU T. Use of thiourea to increase the solubility of membrane proteins in two-dimensional electrophoresis[J]. Electrophoresis, 1998, 19(5): 758-760.
- [23] GALVANI M, ROVATTI L. Protein alkylation in the presence/absence of thiourea in proteome analysis: a matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry investigation[J]. Electrophoresis, 2001, 22(10): 2066-2074.
- [24] MARK P M. Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins using immobilized pH gradients[J]. Analytical Biochemistry, 2000, 280: 1-10.
- [25] VERONIAUE S, SYLVIE K, DOMINIQUE D, et al. Membrane proteomics: Use of additive main effects with multiplicative interaction model to classify plasma membrane proteins according to their solubility and electrophoretic properties [J]. Electrophoresis, 2000, 21: 3329-3344.
- [26] CHEVALLET M, SANTONI V, RABILLOU T, et al. New zwitterionic detergents improve the analysis of membrane proteins by two dimensional electrophoresis[J]. Electrophoresis, 1998, 19: 1901-1909.
- [27] ROBERT H, BRENDA L G, KENNETH M S, et al. Application of zwitterionic detergents to the solubilization of integral membrane proteins for two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry[J]. Proteomics, 2002, 2: 1479-1488.
- [28] TAYLOR C M, PFEIFFER S E. Enhanced resolution of glycosylphosphatidylinositol anchored and transmembrane proteins from the lipid-rich myelin membrane by two-dimensional gel electrophoresis[J]. Proteomics, 2003, 3: 1303-1312.
- [29] SANTONI V, MOLLOY M, RABILLOU T, et al. Membrane proteins and proteomics: un amour impossible? [J]. Electrophoresis, 2000, 21(6): 1054-1070.
- [30] VÉRONIQUE S, SYLVIE K, DOMINIQUE D, et al. Membrane proteomics: Use of additive main effects with multiplicative interaction model to classify plasma membrane proteins according to their solubility and electrophoretic properties [J]. Electrophoresis, 2000, 21: 3329-3344.
- [31] FERRO M, SEIGNEURIN B D, ROLLAND N, et al. Organic solvent extraction as a versatile procedure to identify hydrophobic chloroplast membrane proteins[J]. Electrophoresis, 2000, 21(16): 3517-3526.
- [32] DAPHNÉ S B, NORBERT R. Differential extraction of hydrophobic proteins from chloroplast envelope membranes: a subcellular-specific proteomic approach to identify rare intrinsic membrane proteins[J]. The Plant Journal, 1999, 19(2): 217-228.
- [33] MICHAEL H, JENS K. Towards functional proteomics of membrane protein complexes: analysis of thylakoid membranes from *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. The Plant Journal, 2001, 28(5): 595-606.
- [34] JENNY L, MARC R, BEN R, et al. Proteomics: capacity versus utility[J]. Electrophoresis, 2000, 21(6): 1071-1081.
- [35] STEFFEN O, MICHAEL H, HECKER M. ALKAline proteins of *Bacillus subtilis*: First steps towards a two-dimensional alkaline master gel[J]. Electrophoresis, 2000, 21: 3701-3709.
- [36] KYLA P, EMMA M, CLARE L B, et al. Optimization of the first dimension for separation by two-dimensional gel electrophoresis of basic proteins from human brain tissue[J]. Proteomics, 2004, 4: 27-30.
- [37] SOO-HAN B, ANDREW G H, PETER G H, et al. Strategies for the enrichment and identification of basic proteins in proteome projects[J]. Proteomics, 2003, 3: 569-579.
- [38] HERBERT B R, MOLLOY M P, GOOLEY A A, et al. Improved protein solubility in two-dimensional gel electrophoresis using tributyl phosphine as reducing agent[J]. Electrophoresis, 1998, 19: 845-851.
- [39] HERBERT B. Advances in protein solubilization for two-dimensional electrophoresis[J]. 1999, 20(4-5): 660-663.
- [40] GOVORUN V M, ARCHAKOV A I. Proteomic technologies in modern biomedical science [J]. Biochemistry (Moscow), 2002, 67(10): 1109-1123.
- [41] SJOJKE H, BERTRAN G, VOSHOL H, et al. Preparative two-dimensional gel electrophoresis at alkaline pH using narrow range immobilized pH gradients[J]. Proteomics, 2002, 2: 127-134.
- [42] TOM B, TIRRA S. 2-D Electrophoresis Using Immobilized pH Gradients Principles and Methods [M]. America: Amersham Biosciences, 1998.
- [43] OLSSON I, LARSSON K, PALMGREN R, et al. Organic disulfides as a means to generate streak-free two-dimensional maps with narrow range basic immobilized pH gradient strips as first dimension[J]. Proteomics, 2002, 2(11): 1630-1632.
- [44] MARTA C, GEMMA V, JOSÉ I B. Improved resolution of the human adipose tissue proteome at alkaline and wide range pH by the addition of hydroxyethyl disulfide [J]. Proteomics, 2004, 4(2): 438-441.
- [45] MARK P M, MIKHIL D P, HONG C. Profiling the alkaline membrane proteome of *Caulobacter crescentus* with two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry[J]. Proteomics, 2002, 2: 899-910.
- [46] GORG A, OBERMAIER C, BOGUTH G, et al. Very alkaline immobilized pH gradients for two-dimensional electrophoresis of ribosomal and nuclear proteins[J]. Electrophoresis, 1997, 18: 328-337.
- [47] 郭晓君. 蛋白质电泳实验技术 [M]. 北京: 科学出版社 (GUO Xiao-jun. Electrophoresis: An Experimental Technology for Proteins [M]. Beijing: Science Press, 2001. 3.
- [48] CHIARI M, RIGHETTI P G. New types of separation matrices for electrophoresis[J]. Electrophoresis, 1995, 16(16): 1815-1829.
- [49] CHIARI M, MICHELETTI C, NESI M, et al. Towards new formulations for polyacrylamide matrices: N-acryloylaminoethoxyethanol, a novel monomer combining high hydrophilicity with extreme hydrolytic stability[J]. Electrophoresis, 1994, 15(2): 177-186.

- [50] ROBERT W, ALOIS H, ANGELIKA G, *et al.* Towards higher resolution: Two-dimensional electrophoresis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins using overlapping narrow immobilized pH gradients[J]. *Electrophoresis*, 2000, 21 : 2610-2616.
- [51] OGURL T, TAKAHATA I, KATSUTA K, *et al.* Proteome analysis of rat hippocampal neurons by multiple large gel two-dimensional electrophoresis[J]. *Proteomics*, 2002 2(6): 666-672.
- [52] TONELLA L, HOOGLAND C, BINZ P, *et al.* New perspectives in the *Escherichia coli* proteome investigation[J]. *Proteomics* 2001, 1(3): 409-423.
- [53] KLOSE J. Genotypes and phenotypes[J]. *Electrophoresis*, 1999, 20 :643-652.
- [54] GARRELS J I, MCLAUGHLIN , WARNER J R, *et al.* Proteome studies of *Saccharomyces cerevisiae*: identification and characterization of abundant proteins[J]. *Electrophoresis*, 1997, 18 :1347-1360.
- [55] GORG A, OBERMAIER C, GUNTHER B, *et al.* Recent developments in two-dimensional gel electrophoresis with immobilized pH gradients: Wide pH gradients up to pH 12, longer separation distances and simplified procedures[J]. *Electrophoresis*, 1999, 20 :712-717.
- [56] GORG A, BOGUTH G, OBERMAIER C, *et al.* Two-dimensional electrophoresis of proteins in an immobilized pH 4-12 gradient[J]. *Electrophoresis*, 1998, 19(8-9): 1516-1519.
- [57] GORG A, BOGUTH G, OBERMAIER C, *et al.* 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 systems[J]. *Electrophoresis*, 1995, 16(7): 1079-1086.
- [58] CATHERINE N, MARC B, KEIRYN L B, *et al.* Subproteomics: Identification of plasma membrane proteins from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Proteomics*, 2002, 2 : 1760-1714.
- [59] SCHICK M, Influence of a cationic detergent on electrophoresis in polyacrylamide gel[J]. *Anal Biochem*, 1975, 63(2): 345-349.
- [60] PANYIM S, THITIPONGPANICH R, SUPATIMUSRO D. A simplified gel electrophoretic system and its validity for molecular weight determinations of protein-cetyltrimethylammonium complexes[J]. *Anal Biochem*, 1977, 81(2): 320-327.
- [61] MACFARLANE D E. Use of benzyldimethyl-n-hexadecylammonium chloride ("16-BAC"), a cationic detergent, in an acidic polyacrylamide gel electrophoresis system to detect base labile protein methylation in intact cells[J]. *Anal Biochem*, 1983, 132 :231-235.
- [62] MACFARLANE D E. Two dimensional benzyldimethyl-n-hexadecylammonium chloride — sodium dodecyl sulfate preparative polyacrylamide gel electrophoresis: a high capacity high resolution technique for the purification of proteins from complex mixtures[J]. *Anal Biochem*, 1989, 176 :457-463.
- [63] HARTINGER J, STENIUM K, DAGMAR H, *et al.* 16-BAC/SDS-PAGE: A two-dimensional gel electrophoresis system suitable for the separation of integral membrane proteins[J]. *Analytical Biochemistry*, 1996, 240 :126-133.
- [64] PAUL S B, ANITA P, RAMACHANDRAN A, *et al.* High throughput two-dimensional blue-native electrophoresis: A tool for functional proteomics of mitochondria and signaling complexes[J]. *Proteomics* 2002, 2 :969-977.
- [65] BART D, FRAND V, JOÉL S, *et al.* Mass spectrometric identification of mitochondrial oxidative phosphorylation subunits separated by two-dimensional blue-native polyacrylamide gel electrophoresis[J]. *Electrophoresis* 2002, 23 :2525-2533.
- [66] HOFFMANN P, HONG J, ROBERT L M, *et al.* Continuous free-flow electrophoresis separation of cytosolic proteins from the Human colon carcinoma cell line LIM 1215: A non two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis strategy[J]. *Proteomics* 2001, 1: 807-818.
- [67] O'FARRELL P H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins[J]. *J Biol Chem*, 1975, 250(10): 4007-4021.
- [68] WU C C, MACCOSS M J, HOWELL K E, *et al.* A method for the comprehensive proteomic analysis of membrane proteins[J]. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(5): 532-538.
- [69] WU C C, MACCOSS M J. Shotgun proteomics: tools for the analysis of complex biological systems[J]. *Curr Opin Mol Ther* 2002, 4(3): 242-250.
- [70] CHELIUS D, ZHANG T, WANG G, *et al.* Global protein identification and quantification technology using two-dimensional liquid chromatography nanospray mass spectrometry[J]. *Anal Chem* 2003, 75(23): 6658-6665.
- [71] CHEN J, BALGLEY B M, DEVOE D L, *et al.* Capillary isoelectric focusing-based multidimensional concentration/separation platform for proteome analysis[J]. *Anal Chem*, 2003, 75(13): 3145-3152.