



评述

基于凝胶电泳技术的蛋白质复合体研究进展

郝其琛[†], 秦亮[†], 陈路路[†], 胡浩, 李金融, 刘海强, 许华磊, 郭华, 杨晨钰, 吴冉,
蒋东旭, 陈涤凡, 周宜君, 王晓东^{*}

中央民族大学生命与环境科学学院, 生物成像与系统生物学研究中心, 质谱成像与代谢组学国家民委重点实验室(中央民族大学), 北京 100081

[†] 同等贡献^{*} 联系人, E-mail: Xiaodong@muc.edu.cn

收稿日期: 2023-06-22; 接受日期: 2023-11-21; 网络版发表日期: 2024-04-19

国家自然科学基金(批准号: 31770384, 21605164)、中央民族大学一流大学一流学科项目基金(批准号: Y1dxxk201819)和国家民族事务委员会中青年英才培养计划基金(批准号: 10301-0190040110)资助

摘要 蛋白质复合体(protein complexes, PCs)在细胞组成及各类生理生化过程中发挥重要而关键的作用, 如质膜形成、信号转导、抗原抗体识别、物质运输、能量代谢、蛋白质合成与降解、DNA损伤修复等。但由于其结构的复杂性, 分离纯化对PCs的结构与功能研究至关重要; 如何保持PCs结构完整性及生物活性是该领域研究的热点问题之一。凝胶电泳技术由于其简便、易操作、经济、高效等特点, 在PCs研究中得到广泛的应用。本文概括适用于PCs研究的非变性凝胶电泳和多种电泳级联的方法、特点及相关技术流程, 为有效分离PCs提供一定的理论基础和技术参考, 并基于此进一步系统性地综述这些技术在细胞、细胞外以及非细胞PCs中的研究进展。凝胶电泳技术在PCs研究中已取得长足进步, 但仍有较大的发展空间, 例如个性化、模块化、微型化、自动化是其将来发展的主要趋势。可以预见的是, 随着凝胶电泳方法与其他联用技术的进一步发展, 人们对PCs的了解也将不断加深。

关键词 凝胶电泳, 蛋白质复合体, 非变性, 分离纯化, 相互作用蛋白质

蛋白质复合体(protein complexes, PCs)是由多个蛋白质或亚基通过疏水性相互作用, 氢键、盐键以及范德华力等非共价键结合的一类具有四级空间构象的特定相互作用蛋白质集群^[1]。PCs组成性蛋白质(亚基)具有特定空间排布序列及构象布局, 从整体上行使一种或多种特定的生物学功能^[2]。作为21世纪后基因组时代蛋白质组学研究热点之一, PCs参与调控生物体

内众多生理生化过程, 在质膜形成^[3]、信号转导^[4]、抗原抗体识别^[5]、物质运输^[6]、能量代谢^[7]、蛋白质合成与降解^[8]、DNA损伤修复^[9]等过程中均发挥重要作用。例如, 核孔复合体参与核膜的形成, 精确调控细胞核与细胞质间的物质运输及信号转导, 是控制细胞生长发育的重要通道^[10]; 呼吸链复合体与能量代谢过程密切相关, 不同类型呼吸链复合体具有不同功能,

引用格式: 郝其琛, 秦亮, 陈路路, 等. 基于凝胶电泳技术的蛋白质复合体研究进展. 中国科学: 生命科学, 2024, 54: 883–910

Hao Q C, Qin L, Chen L L, et al. Recent advances in gel electrophoresis for the study of protein complexes (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2024, 54: 883–910, doi: 10.1360/SSV-2023-0124

共同参与线粒体电子传递以及 H^+ 梯度形成, 后者作为能量来源直接参与ATP合成^[11]; 蛋白酶体广泛存在于真核细胞中, 参与胞内蛋白质降解, 其不同的含量及修饰将直接影响蛋白质调控及稳态维持^[12]; Fanconi贫血单泛素连接酶复合体参与DNA损伤修复, 同时具有稳定复制叉和调节胞质分裂等维护功能^[13]。因此, 对PCs深入研究有助于揭示其在细胞生理生化过程中的调控机制及解读生命活动本质规律^[14]。近年来, 随着生物学技术不断发展完善, 对某些PCs生物学功能研究日益深入, 但对于生物体内绝大多数PCs复杂生物学功能及作用机理研究仍显不足。

与单一蛋白质相比, PCs往往具有较大的分子量或体积, 其结构的复杂性以及亚基之间相互作用的多样性使PCs研究相较于一般蛋白质更为艰难。此外, 生物体在响应外部刺激时通常也会引起体内PCs组成性蛋白质亚基的多种翻译后修饰^[15], 进一步增加研究PCs结构与功能的难度。PCs亚基间的非共价键相互作用, 在分离纯化过程中极易受到实验步骤或实验试剂的影响而破坏, 引起亚基间的解离, 进而有可能导致其生物学功能的部分或全部丧失。此外, 在PCs分离纯化过程中普遍存在蛋白质非特异性聚集现象, 也会对PCs的深入分析造成一定干扰。因此, 在PCs分离纯化过程中如何消除蛋白质非特异性聚集现象并保持PCs结构完整性及生物活性一直是该领域研究的热点问题之一。

对于PCs的研究报道最早可追溯于20世纪初^[16]。经过近百年发展, 目前对PCs研究方法大致可分为原位研究和离体研究两个方向: 原位研究无需将PCs提取分离, 而是依靠分子标记等方式检测分析PCs于细胞内分布及与其他分子相互作用的情况, 研究手段主要包括酵母双杂交(yeast two-hybrid, Y2H)^[17]、荧光共振能量转移显微技术(fluorescence resonance energy transfer microscopy, FRET microscopy)^[18]、双分子荧光互补技术(bimolecular fluorescence complementation, BiFC)^[19]等; 离体研究需将PCs分离提纯, 避免细胞内其他成分对分析PCs结构与功能时造成干扰, 方法主要包括膜分离法(membrane separation)^[20]、密度梯度离心法(density gradient centrifugation, DGC)^[21]、分析超速离心法(analytical ultracentrifugation, AUC)^[21]、免疫共沉淀法(co-immunoprecipitation, Co-IP)^[22]、亲和层析法(affinity chromatography)^[23]、凝胶电泳技术^[24]

等。PCs经上述技术分离提纯后可通过质谱(mass spectrometry, MS)^[25]、核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)^[26]、中子散射(neutron scattering)^[27,28]、天然质谱(native mass spectrometry, nMS)^[29]等其他技术进一步表征其序列或空间结构。

离体研究中分离提纯步骤可极大减少干扰因素, 降低PCs分析难度, 故该研究方式是目前PCs结构与功能表征普遍采用的分析策略。其中, 膜分离法依据渗透与反渗透原理, 采用不同孔径半透膜对样品进行分离, 具有适用范围广、操作简单、能耗低、分离速度快的优点, 但分离受膜孔径大小限制, 分辨率低, 膜易受污染^[30]。DGC与超速离心法利用样品中各组分沉降系数差异加速PCs的沉降, 具有应用广、操作简单、分离速度快的优点, 但对于分子量相近的PCs分离效果不佳^[31]。Co-IP通过抗原抗体特异性结合使特定PCs沉淀以达到分离提纯目的, 通过该方法获得的PCs大多处于天然状态并具有生物活性, 同时也尽可能避免分离过程中其他不可控因素的影响, 提高实验的重现性, 但该方法需在实验前预测目的蛋白以选择合适抗体, 大大降低其广谱适用性^[22]。亲和层析法核心在于固定相与待分离样品(例如PCs)具有特异亲和性, 可根据亲和性程度不同实现分离提纯目的, 该方法具有分离效率高、分析速度快、检测灵敏度高等特点, 但操作复杂、特异性配基昂贵等不足极大限制该方法的广泛应用^[32]。凝胶电泳技术根据蛋白质等电点(isoelectric point, pI)、分子量(molecular weight, MW)、分子形状等不同物理特性差异而实现其在凝胶中移动速率不同, 以完成分离提纯目的^[33]。凝胶电泳技术出现较早, 技术较为成熟, 相对于上述其他技术具有操作简单、经济、高效、适用对象无偏好性等优点, 在PCs研究中得到较为广泛的应用^[24,34]。因此, 本文系统性综述多种凝胶电泳技术及其在PCs研究中的应用进展。

1937年, 化学家Tiselius^[35]首次利用电泳完成复杂生物样本中血清蛋白的成功分离, 并因此获得1948年诺贝尔化学奖, 充分彰显电泳的重要性^[36]。早期电泳技术基本以自由电泳(电泳介质为溶液)为主, 因外加电场产生的焦耳效应易使溶液流动发生扰动^[37], 致其处理复杂样品的分辨率及分离效果降低, 难以满足后续实验对样品分离纯化的要求。为克服该问题, 以滤纸^[38,39]、琼脂糖凝胶^[40]、醋酸纤维素薄膜^[41]、聚丙烯酰胺凝胶(polyacrylamide gel, PAG)^[33,42]等为载体的

区带电泳在20世纪中叶得到快速发展. 在此之后, 1959年及1966年先后出现的非变性PAGE电泳技术(native PAGE electrophoresis, Native-PAGE)^[33]及等电聚焦电泳技术(isoelectric focusing, IEF)^[43,44]在一定程度上克服之前电泳技术对PCs及相互作用蛋白质分离的不足. 随后, 众多学者以Native-PAGE和IEF为基础, 不断对其成胶配方及电泳试剂进行更新与优化, 衍生/拓展出一系列适用于PCs或相互作用蛋白质分离纯化的新型凝胶电泳技术, 如蓝色非变性PAGE(blue native-PAGE, BN-PAGE)^[45,46]、无色非变性PAGE(colorless native-PAGE, CN-PAGE)^[47,48]、高分辨无色非变性PAGE(high resolution CN-PAGE, HrCN-PAGE)^[49,50]、苯乙烯马来酸PAGE(styrene maleic acid-PAGE, SMA-PAGE)^[51](图1). 此外, 还有学者通过不同电泳技术间的互相级联, 利用不同的蛋白质分离原理而实现PCs或相互作用蛋白质的高效分离纯化. 例如, 非变性微型凝胶二维电泳(nondenaturing micro two-dimensional electrophoresis, Nondenaturing μ 2-DE)^[52-55]技术成功级联非变性IEF(Native-IEF)和Native-PAGE(表1), 完成凝胶的微型化. 为实现PCs或相互作用蛋白质高效分离纯化及其亚基亚型的全面电泳表征分析, 四维正交凝胶电泳系统(four-dimensional orthogonal electrophoresis system, 4-DES)^[56]、广谱4-DES(broad-spectrum 4-DES, BS4-DES)^[57]也已成功构建. 这两种系统成功级联Native-IEF, Native-PAGE, 变性IEF(denaturing IEF)及十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium do-

decyl sulfate-PAGE, SDS-PAGE)四种电泳技术(表1). 不同类型的凝胶电泳技术在PCs研究中各有侧重, 如Native-PAGE衍生技术BN-PAGE, CN-PAGE, HrCN-PAGE及SMA-PAGE多用于膜蛋白质复合体的分离纯化研究; 而电泳级联技术则适用于PCs及其亚基亚型分离纯化及表达差异研究. 值得注意的是, 上述众多电泳技术与其他现代分析技术(例如质谱技术)的偶联, 可进一步完成对PCs及其亚基亚型鉴定及翻译后修饰的深入研究^[57].

PCs结构的完整性直接影响着电泳分离效果及后续研究结果的可靠性, 因此如何实现PCs非变性分离是电泳领域研究热点之一. 尽管目前许多基于不同分离原理、分离目的的凝胶电泳技术已经得到广泛应用, 但目前关于这些凝胶技术的系统性综述仍显不足. 因此, 本文基于多种适用于PCs研究的凝胶电泳技术、特点及相关技术流程, 系统性综述这些技术应用于细胞膜、细胞质、细胞核及其他非细胞结构PCs的研究进展, 以期对PCs深入研究及相关凝胶电泳技术进一步拓展提供一定参考.

1 适用于PCs研究的凝胶电泳技术

随着电泳技术的不断发展与完善, 迄今为止已经涌现出多种针对PCs不同特性而实现分离纯化的凝胶电泳技术, 主要分为两大类: (i) 利用单一分离原理的非变性凝胶电泳技术, 如最早应用于细胞质PCs分离

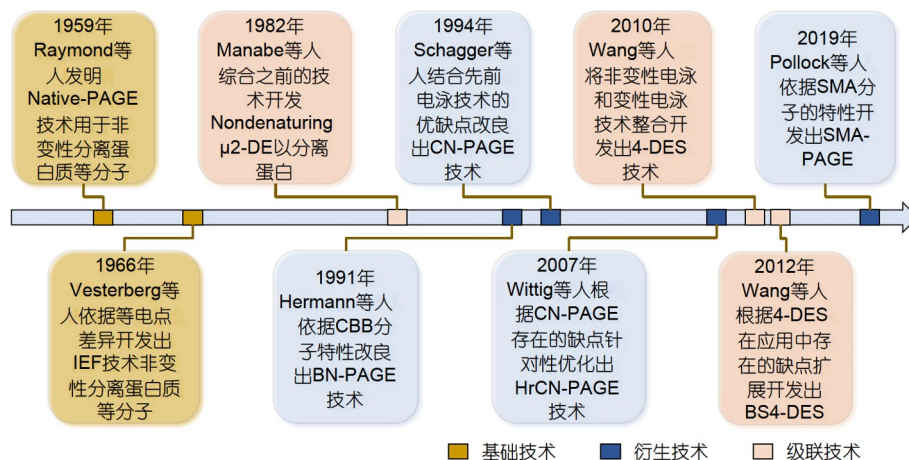


图 1 非变性凝胶电泳技术研究进展

Figure 1 Research advances in non-denaturing gel electrophoresis

表 1 凝胶电泳技术种类及特点

Table 1 Types and properties of gel electrophoresis techniques

电泳	时间	特点	原理	主要用途	文献
Native-PAGE	1959/2021	不添加SDS、巯基乙醇等致蛋白质变性的试剂	等电点、分子的大小和形状	蛋白质非变性分离、蛋白质相互作用鉴定	[33,34]
IEF	1966/2017	凝胶具有pH梯度	等电点	同工酶、蛋白质微量分析	[43,44]
BN-PAGE	1991/2023	添加温和试剂CBB替代SDS提高分辨率	避免样品聚集、排除电荷数干扰	分离膜蛋白、疏水性PCs	[45,46]
CN-PAGE	1994/2019	无带电荷染料, 添加洋地黄皂苷替换CBB提高分辨率	分子的大小、形状和带电荷量	分离膜蛋白超复合体、具有酶活性的低聚物	[47,48]
HrCN-PAGE	2007/2023	添加无色的阴离子去污剂、中性去污剂提高分辨率	增大溶解性、排除电荷数干扰	分离膜蛋白复合体	[49,50]
SMA-PAGE	2019	添加SMA保护膜蛋白	分子的大小和形状	膜蛋白分离、提纯	[51]
Nondenaturing μ 2-DE	1982/2016	综合的电泳分离方法、保持蛋白活性	等电点、分子的大小和形状	分析PCs的浓度及其分布情况	[52,53,55]
4-DES	2010	综合的电泳分离方法、分离~3.0~8.4等电点范围	等电点、分子所带电荷、分子的大小和形状	分析PCs种类、含量、亚基型差异	[56]
BS4-DES	2012	综合的电泳分离方法、分离~3.0~11.0等电点范围	等电点、分子所带电荷、分子的大小和形状	分析PCs种类、含量、亚基型差异	[57]

纯化的Native-PAGE, IEF电泳和以Native-PAGE为基础衍生的BN-PAGE, CN-PAGE, HrCN-PAGE, SMA-PAGE技术等; (ii) 利用多种分离原理的级联电泳技术如Nondenaturing μ 2-DE, 4-DES和BS4-DES(表1). 在非变性凝胶技术方面, Native-PAGE于1959年被首次开发并成功应用于血清白蛋白和血红蛋白的分离纯化^[33]. 该电泳技术的核心在于凝胶、缓冲液配制过程中并不添加变性试剂(如SDS、尿素、硫脲等). 针对PCs的靶向性分析, Native-PAGE通常可以根据待分离PCs酸碱性调整凝胶pH值, 用以增强特定PCs的电泳分离效果. 1966年出现的IEF则是利用PCs的两性解离特性, 根据PCs等电点差异而实现不同PCs之间的分离, 具有较高分辨率($\Delta pI=0.01$ pH)^[57]. 目前, IEF电泳在PCs等电点测定、分离、富集、纯化分析中得到广泛应用^[33]. BN-PAGE, CN-PAGE, HrCN-PAGE及SMA-PAGE则以Native-PAGE为基础, 遵循尽可能不破坏PCs结构的原则, 在制胶及电泳缓冲液配制过程中通过改变部分试剂来实现PCs高分辨率非变性电泳分离效果. 例如, BN-PAGE与Native-PAGE相比, 主要区别在于在BN-PAGE凝胶制备及电泳缓冲液配制过程中添加考马斯亮蓝(coomassie brilliant blue, CBB), 利用CBB⁻离子与蛋白质的强结合力以提高PCs水溶性并防止蛋白质非

特异性聚集, 进而实现BN-PAGE对于PCs高效分离效果(该电泳技术尤其适用于膜蛋白质复合体的分离纯化)^[33]. 但是过多的CBB⁻离子结合会使PCs中部分亚基间产生过强的库伦斥力, 容易引起亚基的解离, 进而造成PCs结构的部分破坏^[33]. CN-PAGE通过替换BN-PAGE中的CBB试剂, 增加PCs分离种类. 例如, 使用洋地黄皂苷(digitonin)替换考马斯亮蓝G250, 从而更好地保证PCs的完整结构. HrCN-PAGE在CN-PAGE的基础上进行进一步改良, 添加中性去污剂如十二烷基- β -D-麦芽糖苷(N-dodecyl- β -D-maltoside, DDM)等以提高分辨率. SMA-PAGE是利用苯乙烯马来酸脂质颗粒(SMA lipid particle, SMALP)的特性对PCs进行分离的电泳技术, 在分离过程中对膜蛋白的结构具有良好保护效果, 常用于膜蛋白的分离提纯. 以上电泳衍生技术一般用于膜蛋白以及相互作用蛋白质的研究中, 在检测分离特定种类PCs方面各具优势. 在电泳-电泳级联技术方面, Nondenaturing μ 2-DE将两种非变性电泳结合成二维电泳技术, 该技术可在保持PCs结构不变的同时检测样品中特定PCs的浓度及其分布, 常与液相色谱-质谱联用(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)进行定量分析. 4-DES和BS4-DES将非变性电泳与变性电泳方法相结合, 对样品进行多次分离富集.

4-DES在检测PCs及其亚基型特征的同时可对其进行分离富集。相较于4-DES, BS4-DES进一步扩大PCs的可检测范围, 增加对极端碱性PCs的适用性。为更好地理解及应用这些凝胶电泳技术, 本研究还对这些技术的特点、原理及相关技术流程进行详细阐述。

1.1 单一分离原理的非变性凝胶电泳技术

(1) Native-PAGE. Native-PAGE是最早应用于PCs分离提纯的凝胶电泳技术。该技术在凝胶制备、缓冲液配制过程中不添加变性试剂, 从而最大限度地保持蛋白质活性, 因此可用于蛋白质相互作用的分析。Native-PAGE分离原理与样品等电点、分子量及其形状有关, 如图2A所示。为保持PCs的结构, 制备样品时需先对样品进行初步的非变性提取, 电泳需要在较小电流以及较低温度的条件下进行^[58]。对于电泳分离结果受等电点影响的样品, 在分离酸性PCs与碱性PCs时会出现电泳方向相反的情况, 因此, 在分离之前需要根据样品的酸碱性选择合适的凝胶及pH环境。例如, 分离酸性PCs时要在偏碱性的缓冲系统中进行, 使PCs整体带负电荷, 而分离碱性PCs时通常则是在微酸的环境中进行, 其电极方向与分离酸性PCs时相反。

Native-PAGE的实验流程可分为5大模块: 凝胶制备、样品准备、电泳、凝胶处理以及检测分析。首先是电泳凝胶制备, 在该步骤中, 分离酸性PCs和分离碱性PCs的凝胶所用的缓冲液pH存在差异, 并且使用的示踪剂也不同, 如酸性PCs一般使用溴酚蓝, 碱性PCs则可以使用甲基绿进行标记。其次是样品准备, 将调整到合适浓度的样品加入到加样孔中, 在调整电极方向后进行电泳。最后是电泳后凝胶处理, 即对凝胶进行染色、脱色以及图像采集等; 此外, 也可以切割凝胶后提取胶粒中PCs进行后续分析。

Native-PAGE不添加任何对蛋白质结构造成改变的试剂, 因此在分离过程中能够保持最为完整的PCs结构以及其生物活性^[33,59]。然而PCs的电泳分离效果也易受到其等电点、分子量和形状等因素的影响, 容易引起Native-PAGE分辨率的降低。

(2) IEF. PCs具有两性解离的物理特性, 其pI为复合体在溶液呈现电中性时的pH值^[60]。基于等电点差异IEF实现不同PCs的有效分离, 如图2B所示。在电泳过程中, 当PCs移动到凝胶特定位置(即该处 $\text{pH}=\text{pI}$)时, PCs由于呈电中性而失去电场力作用, 从而停止运动,

最终具有相同等电点的PCs聚集在一个狭窄区带内。因此, 在IEF中需要使用pH梯度凝胶作为分离PCs的载体介质, 并且该凝胶需满足从正极到负极pH值呈线性升高的要求。在制备pH梯度凝胶过程中用于形成pH梯度的常用方法有3种: 载体两性电解质(carrier ampholyte, CA)、固定化电解质(immobilized pH gradient, IPG)以及载体两性电解质-固定化电解质复合电解质(IEF on CA containing IPG, ICAPG)^[61]。综上所述, IEF分离PCs仅取决于样品等电点, 其分辨率在理论上没有上限, 因此窄pH范围和高场强条件下的IEF分辨率极高。这一特性有效弥补Native-PAGE分辨率不足的缺陷, 在分离等电点不同的PCs时具有极大优势。

基于薄层PAG的IEF操作与基本实验流程略有不同, 凝胶需进行预聚焦以形成线性pH梯度^[62]。电泳后检测与其他电泳的后续检测方法相同, 处理后的凝胶通过适当方法用于PCs种类鉴定以及PCs亚基型组成等后续研究。例如, Hegen等人^[63]使用IEF有效分离脑脊液样品中的PCs, 随后对其进行免疫印迹检测^[64], 该方法成功地对样品脑脊液中的寡克隆区带进行有效分析。

IEF介质种类多样, 不仅可在装有溶液的玻璃管(如毛细管)中进行, 也可在琼脂糖平板凝胶中进行^[65], 聚丙烯酰胺凝胶也是其常用电泳载体介质。超薄IEF技术(ultrathin-layer IEF, UTL-IEF)的出现使IEF电泳技术得到更加广泛的应用^[66,67]。Stastna和Slais^[68]发明的二维凝胶IEF(two-dimensional gel IEF, 2-D gel IEF)适用于分离较低浓度的蛋白质样品。该技术能够在同一凝胶横向和纵向两个方向上先后实现蛋白质两次IEF电泳分离, 从而增加IEF分辨率。更为重要的是, 其分离过程在同一块凝胶中进行, 进而有效避免样品的损失和污染。该方法成功实现 β -乳球蛋白两种不同形式在单纯一维IEF中的分离。

IEF基于等电点分离PCs在理论上具有极高的分辨率, 但在实际应用中无法实现对等电点相近或相同PCs的完全分离。并且由于PCs存在聚集现象, IEF对该类PCs如线粒体呼吸链复合体 I ~ V 无法进行分离^[47]。而由于PCs在等电点处溶解度变小, 在进行IEF时等电点处常发生PCs析出现象, 同样不利于后续实验的开展。

(3) BN-PAGE. BN-PAGE是以Native-PAGE以及

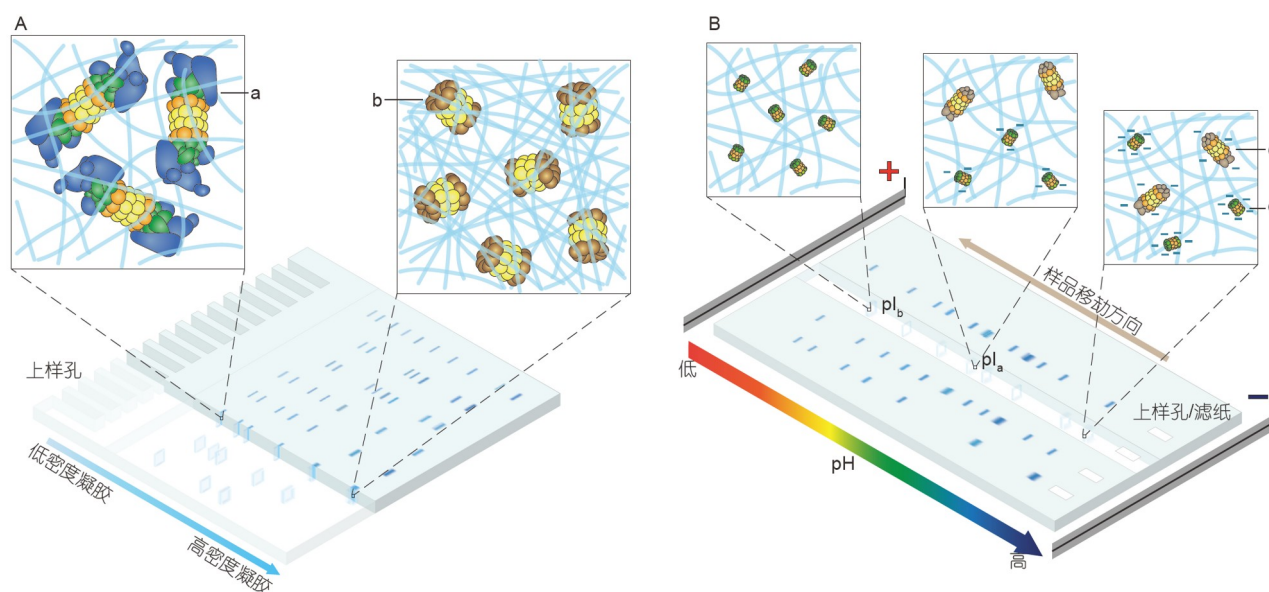


图 2 Native-PAGE与IEF分离PCs模式图。A: Native-PAGE。图中凝胶为梯度聚丙烯酰胺凝胶, 剖面放大图中蓝色线条代表聚丙烯酰胺, 线条密度表示凝胶浓度/孔径大小。a为分子量较大的PCs, b为分子量较小的PCs; B: IEF。c为具有较高 pI 值的PCs, d为具有较低 pI 值的PCs

Figure 2 Diagram of the Native-PAGE and IEF for PCs isolation. A: Native-PAGE. The figure depicts gradient polyacrylamide gel, where the blue line in the enlarged section signifies polyacrylamide, and the line density represents the concentration or pore size of the gel. In this figure, a denotes PCs with higher molecular weights and b denotes PCs with lower molecular weights; B: IEF. In this figure, c denotes PCs with higher pI values, and d denotes PCs with lower pI values

SDS-PAGE为基础进行改良并用于分离PCs的电泳技术^[69], 其特点主要是在电泳中使用CBB以及温和去污剂^[70], 并且不加入使蛋白质变性的巯基乙醇^[71], 因此, 该技术能够在电泳中保持PCs的原有形态。PCs表面可以按一定比率^[72,73]结合带负电荷的CBB染料, CBB染料能够在避免PCs非特异性聚集的同时排除样品在电场中因带电荷数不同对分子移动速率造成的干扰, 进而极大提高电泳的分辨率^[74], 如图3所示。一般情况下, CBB可以覆盖在PCs疏水基团上^[75], 有效地促进PCs的溶解, 使BN-PAGE对一些疏水性PCs具有良好的分离效果。

BN-PAGE技术的关键在于处理样品时低盐状态的保持以及去污剂的选择^[76]。此外, 由于电泳具有浓缩分离效果, 因此胶粒中的样品纯度通常较高, 能够在脱色提取后用于其他仪器检测^[24]。

近年来, 根据不同PCs的特性, 基于BN-PAGE的电泳技术的改良在不断进行。例如, Strecker等人^[77]改良大孔天然蓝色凝胶电泳(large pore blue native gel electrophoresis method, lpBN-PAGE), 其原理是在Native-PAGE制胶过程中改变丙烯酰胺和双丙烯酰胺的

浓度, 从而制得可分离PCs分子量上限高达45 MD的凝胶, 在lpBN-PAGE中通过该凝胶成功分离超过10 MD的超大型PCs。陆等人^[78]在对A型肉毒毒素的活性药用成分结构分析中对BN-PAGE进行改良: 调整缓冲液的配比及电泳时间以提高分辨率, 采用优化浓度以及在配比后使用丽春红替代原来的考马斯亮蓝G250, 从而使得样品处理过程更加温和, 最后通过改变试剂配比以及脱色方法将凝胶进行适当处理以便于后续分析。

与Native-PAGE相比, BN-PAGE不仅提高分辨率, 而且与SDS-PAGE联合可以检测分离的PCs亚基亚型。但由于CBB的加入改变PCs的带电情况, 可能会造成部分PCs的结构发生改变, 因此该技术对一些易变性样品的分离效果不理想。

(4) CN-PAGE。相较于BN-PAGE, CN-PAGE最大的特点是不加入带电荷的染料, 在分离过程中对PCs的影响更小^[79]。因此, 该电泳技术能够将生物膜蛋白质中的超复合体^[80]或线粒体ATP合酶中具有酶活性的低聚物^[81]等进行完整的分离, 并且在胶内酶催化活性测定以及荧光标记检测中更具优势。

CN-PAGE与BN-PAGE的操作流程基本相同, 但在

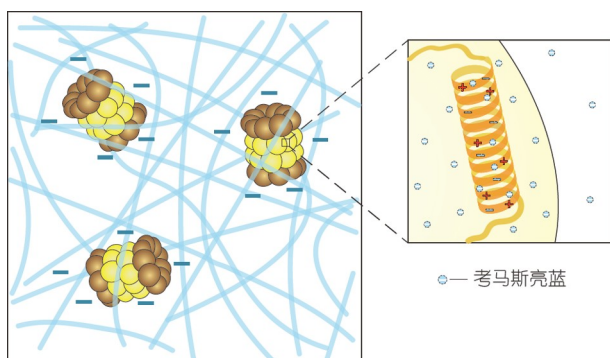


图3 BN-PAGE中CBB与PCs结合消除电荷差异

Figure 3 CBB combined with PCs in BN-PAGE to eliminate charge difference

配制阴极缓冲液时使用洋地黄皂苷替换考马斯亮蓝G250, 并且在样品进行分析鉴定时常与SDS-PAGE或与LC-MS等技术联用。Luckner等人^[82]将光谱技术与CN-PAGE偶合, 同时结合二级质谱, 实现对类囊体膜复合体的高精度定性定量分析。Newell等人^[83]结合BN-PAGE和CN-PAGE的优点开发一种混合电泳方法, 即BCN-PAGE。该方法成功应用于线粒体疾病诊断研究中, 实现皮肤成纤维细胞内物质中特定PCs的稳定分离。

由于CN-PAGE不使用带电荷染料, PCs在该技术中的移动速率取决于其本身分子的大小、形状及所带电荷的综合情况。因此, 该电泳技术相较于BN-PAGE, 其电泳分辨率相对较低, 并且只能分离 pI 值小于胶内 pH 值的PCs^[84], 如胞质酸性水溶性PCs或 $pI < 7$ 的膜PCs等。

(5) HrCN-PAGE. HrCN-PAGE与BN-PAGE的不同在于该技术使用无色阴离子去污剂以及中性去污剂替代CBB。这些去污剂与PCs结合从而屏蔽PCs自身的电荷, 进而降低电泳过程中PCs自身电荷对迁移速率的影响, 有效弥补CN-PAGE分辨率低以及可检测样品范围小的缺点。HrCN-PAGE分辨率与BN-PAGE接近, 但该电泳技术增加疏水性蛋白质的溶解性, 从而降低PCs之间的非特异性聚集作用^[85]。

研究表明, HrCN-PAGE中去污剂的选择与PCs分离效果密切相关。例如Wittig等人^[49]将样品处理中采用DDM溶解膜蛋白复合体的不同HrCNE电泳技术进行对比, HrCNE-1选用添加DDM的阴极缓冲液, HrCNE-2则选用添加聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)的阴极缓冲液。两种方法的分离结果与采用CN-

PAGE和BN-PAGE方法的结果进行对比, 发现HrCNE-1对牛(Bovini)心线粒体膜蛋白复合体的结构保护以及分离效果都优于其他电泳方法。此外, HrCN-PAGE可以直接进行胶内酶活检测以及荧光活性检测, 并且不会受到其他因素(如CBB)的干扰^[86,87]。例如, 在二维电泳HrCN-PAGE/SDS-PAGE中, 样品可以先在HrCN-PAGE中进行酶活性检测^[88], 随后使用SDS-PAGE对其亚基进行分离。近年来, 关于HrCN-PAGE电泳技术的改进仍在进行中, 如Ladig等人^[89]开发基于组氨酸和脱氧胆酸盐的HDN-PAGE。与HrCN-PAGE相比, HDN-PAGE更改部分缓冲液成分并提高其 pH 值, 在分析叶绿体膜、类囊体膜的PCs中具有更好的分离效果。

BN-PAGE, CN-PAGE以及HrCN-PAGE皆是以Native-PAGE为基础, 针对不同特性的PCs进行个性化调整而出现的凝胶电泳技术。不仅如此, 还有大量以其为基础进行个性化调整的凝胶电泳技术, 例如专用于分离类囊体PCs的天然绿色凝胶电泳(native green gel electrophoresis, NG-PAGE)^[90], 该方法同时采用凝胶微型化的设计, 节省试剂的同时缩短电泳时间。

(6) SMA-PAGE. 相较于BN-PAGE, CN-PAGE在凝胶制备模块进行试剂替换, SMA-PAGE脱离传统电泳直接对样品进行分离的思路, 在样品准备模块中添加SMA先行处理样品。传统去污剂存在破坏PCs结构导致样品聚集的风险, 而该试剂能够与膜PCs周围磷脂结合, 进而产生包含膜PCs及其周围脂质的SMALP颗粒, 有效避免分离膜蛋白过程中原脂质环境的丢失, 进而避免蛋白质稳定性降低、溶解效果差等不利影响^[91]。

SMALP颗粒是SMA共聚物^[92], 将环绕膜PCs的脂质包裹在内部的纳米级脂质盘, 增强内部包裹的膜PCs结构稳定性。此外, SMA大小均一, 具有很高的负电荷密度^[51]。对于SMALP颗粒具体的物化结构, Jamshad等人^[93]对SMA与1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DMPC)混合制得的SMALP颗粒进行全面分析。在该研究中, 利用中子小角散射结合电子显微镜(electron microscope, EM)检测SMALP颗粒的形状及尺寸, 并通过傅里叶变换衰减全反射红外光谱法探究SMA中化学基团在颗粒中对脂质的取向, 随后采用核磁共振波谱法分析确定SMA苯乙烯基团与脂酰基链的相互作用, 最后使用差示扫描量热法(differential scanning calori-

metry, DSC)来分析SMALP的形成对脂质相变的影响. 这些研究不仅解析SMALP颗粒保留天然膜环境作为最小功能单位的机制, 更为应用该颗粒进行膜PCs的研究提供参考.

SMALP颗粒对膜蛋白结构及功能具有一定的保护作用. SMALP颗粒能够分离膜PCs与周围部分脂质从而有助于研究膜PCs周围局部脂质环境. 膜PCs在经过SMA-PAGE分离后, 还可以与其他技术, 如MS, 冷冻电镜(cryo-electron microscopy, cryo-EM)等联用, 从而进一步检测样品理化性质. SMALP颗粒在SMA-PAGE电泳中极为重要, 因为电泳过程中分离对象为包裹膜PCs的SMALP颗粒. 如图4所示, 其内部的膜PCs大小以及囊泡形状与该技术分离效果密切相关.

尽管如此, SMA形成SMALP颗粒也存在一些不足. 例如其形成的SMALP圆盘状纳米颗粒最大直径接近15 nm, 通过计算可知, 可与该颗粒结合的膜PCs分子量小于400 kD^[93]; 此外, 由于SMA在pH低于6.5时不溶于水, 因此形成并维持SMALP颗粒需在pH高于6.5的环境中, 这对后续以SMALP颗粒为样品的实验产生一定的限制, 即实验环境要求pH高于6.5; 最后, 由于SMA聚合物是二价阳离子的螯合剂, 其产生的螯合物往往不可溶, 因此实验样品中高浓度二价阳离子的存在会造成SMALP颗粒一定程度的瓦解, 不利于后续分析.

1.2 利用多种分离原理的级联电泳技术

(1) Nondenaturing μ 2-DE. Nondenaturing μ 2-DE是将两种非变性电泳结合的二维电泳技术, 其一维和二维电泳分别由IEF和Native-PAGE组成. 该技术能够在保持PCs结构不变的同时利用二维电泳的优点检测样品中特定PCs的浓度及其分布情况, 并且能够按照不同物理特性将样品分离, 有效地解决单一电泳中相同特性PCs在同一点重合的问题. 与普通电泳相比, Nondenaturing μ 2-DE中第二维电泳采用微型化的设计, 使用的凝胶尺寸较小, 使得该方法的样品、凝胶试剂用量以及电泳所耗时间明显减少.

如图5所示, 在组成Nondenaturing μ 2-DE的电泳中, 第一维电泳使用IEF电泳, 应用于该电泳技术的凝胶的选择取决于样品的种类^[94,95]. 在IEF电泳中, 通电产生的热量可能会破坏PCs结构, 因此合适的电泳时间以及电压对一维IEF电泳非常重要^[96]. 第二维电泳

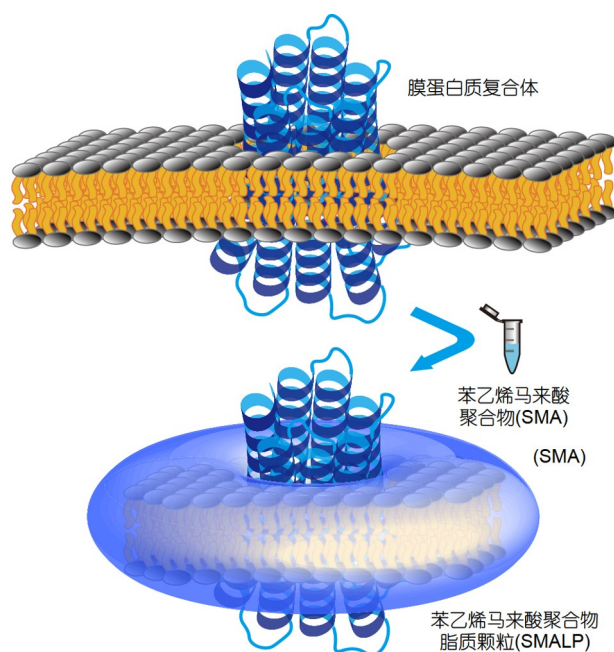


图4 SMA作用于膜PCs形成SMALP颗粒模式图

Figure 4 The particle pattern diagram of SMALP by SMA acting on membrane PCs

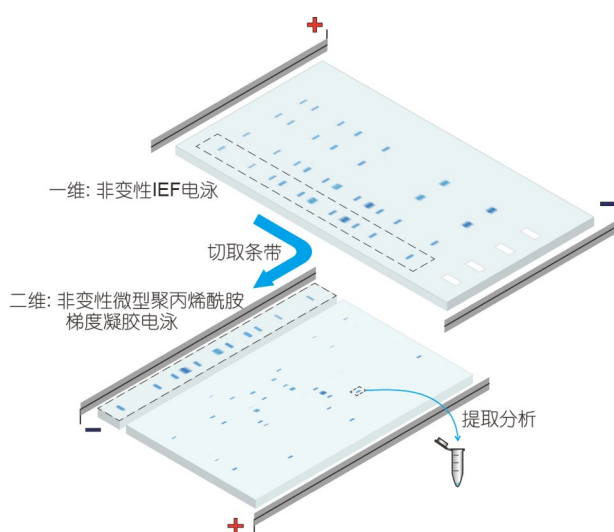


图5 非变性微型2DE流程图

Figure 5 Flowchart of the non-denaturing micro 2DE

通常使用Native-PAGE, 该技术中所使用的凝胶是由一维IEF上分离的样品切取条带制作而成. 第二维电泳使用的凝胶较小, 减少制备凝胶所需试剂量以及电泳所需时间. 此外电泳后可从凝胶中提取样品进而应用于其他研究方法, 如Chen等人^[55]将大鼠(*Rattus nor-*

vegicus) 血浆蛋白进行Nondenaturing μ 2-DE分离后, 提取相应凝胶分离样品, 随后用LC-MS/MS对这些样品进行定性定量分析, 成功绘制大鼠血浆蛋白质组图谱。

(2) 4-DES. 4-DES是将非变性电泳和变性电泳技术级联的综合电泳方法, 该技术通过运用不同的分离原理以及PCs本身具有的物理特性, 将复杂样品中各类PCs进行细致地区分。4-DES由非变性的一维、二维电泳以及变性的三维、四维电泳组成^[56], 利用样品等电点、分子所带电荷、分子大小和形状进行分离, 使得凝胶清楚呈现出PCs在种类、含量上的差异, 从而得到生物样本广谱PCs凝胶电泳表达谱。

4-DES由非变性的第一维非变性薄层等电聚焦电泳(nondenaturing or native thin layer IEF, nondenaturing or native tl-IEF)、第二维Native-PAGE和变性的第三维变性等电聚焦电泳(denaturing IEF)、第四维SDS-PAGE级联而成。非变性第一、二维将一维线性分辨率扩展为二维平面分辨率, 在不改变PCs结构及生物活性情况下提高分离效果。随后采用碱-超声蛋白萃取方法从凝胶中提取分离后的PCs, 通过SDS-PAGE以及MS对其组成成分进行初步检测, 之后使用变性第三、四维电泳分离待测PCs中的亚基, 最终通过MS等技术鉴定亚基的具体类别^[97]。

4-DES对PCs以及相互作用蛋白质的分离提取具有一定的广谱性, 可用于完整分离并富集样品中的PCs并对其亚基亚型进行检测。但由于受凝胶pH范围的影响, 在分离提取如极端碱性PCs方面有一定的局限性。

(3) BS4-DES. BS4-DES是在4-DES的基础上进行改进的电泳方法, 该技术针对4-DES对极碱性蛋白质检测的不足, 在第二维电泳原有碱性非变性凝胶电泳(basic-native-PAGE)的基础上构建酸性非变性凝胶电泳(acidic-native-PAGE), 将可检测PCs等电点范围由原来3.0~8.4扩展到3.0~11.0^[57], 实现对更多种类的PCs进行检测。

如图6所示, BS4-DES的操作流程与4-DES相似, 可以分为六大部分^[57], 主要操作包括非变性第一维电泳、非变性第二维电泳、胶内样品提取、变性第三维电泳、变性第四维电泳以及样品检测。首先利用PCs等电点的不同对待测样品进行第一维电泳, 第一维电泳选用Nondenaturing或Native tl-IEF。电泳后将凝胶沿泳道切成条带以进行第二维电泳。第二维电泳使用Ba-

sic-native-PAGE或Acidic-native-PAGE。在该操作中, 先将第一维电泳后含样品的凝胶条带在平衡缓冲液中进行平衡使PCs重新带电, 之后制作第二维电泳凝胶。凝胶类型的选取取决于待分离样品的等电点, 例如, 若待测PCs等电点在3.0~8.4范围内选择使用Basic-native-PAGE, 若在8.4~11.0范围内则选择Acidic-native-PAGE。若样品的等电点在以上pH范围内均有分布时应该分别选取不同凝胶条带进行Basic-native-PAGE和Acidic-native-PAGE, 之后将电泳后凝胶染色进行分析。对于切取待测PCs所在凝胶, 使用氨水-超声胶内萃取方法将样品进行萃取浓缩。接着进行第三维和第四维电泳, 采取Denaturing IEF和SDS-PAGE将分离富集的PCs样品进行分离, 最后将提取的样品进行检测分析, 如将样品提取后进行MS检测以确定其序列信息。

综上所述, 凝胶电泳技术具有操作简单、经济、高效、适用对象无偏好性等优点, 并且针对不同类型PCs开发的不同电泳技术均有保持其结构及生物活性的特点。截至目前, 多种凝胶电泳技术已在PCs研究中得到较为广泛的应用。在实际应用中这些电泳技术在分离不同PCs时各具优势与不足。可以预见, 电泳技术的不断发展与改良将进一步推动生物样品PCs的有效分离, 促进PCs的深度研究, 极大拓展电泳技术的应用领域。

2 凝胶电泳技术在PCs研究中的应用

PCs种类繁多, 主要分布在细胞中, 不同种类PCs执行不同生理功能。研究PCs在细胞中的含量、组成及功能有助于解并揭示其在细胞生理生化过程中的机理, 对阐释细胞生命活动机理至关重要。

调整后的凝胶电泳技术可对PCs进行完整分离^[98,99]。而不同凝胶电泳方法各具特点, 在区分样品中不同种类PCs时, 需根据目标PCs类型及其理化特性选择合适的电泳方法(表2)。

凝胶电泳技术可对PCs进行分离提纯, 以达到后续分析技术的基本检测条件。例如, 电镜单颗粒分析技术对待测样品有很高的要求, 在解析其空间结构时样品需呈单分散状态才能进行成像分析。SMA-PAGE中形成的SMALP颗粒可以满足cryo-EM单颗粒分析技术检测时对蛋白质样品状态的要求^[51]。使用SMA包裹PCs形成蛋白质-SMALP颗粒, 纯化后提取或直接从凝

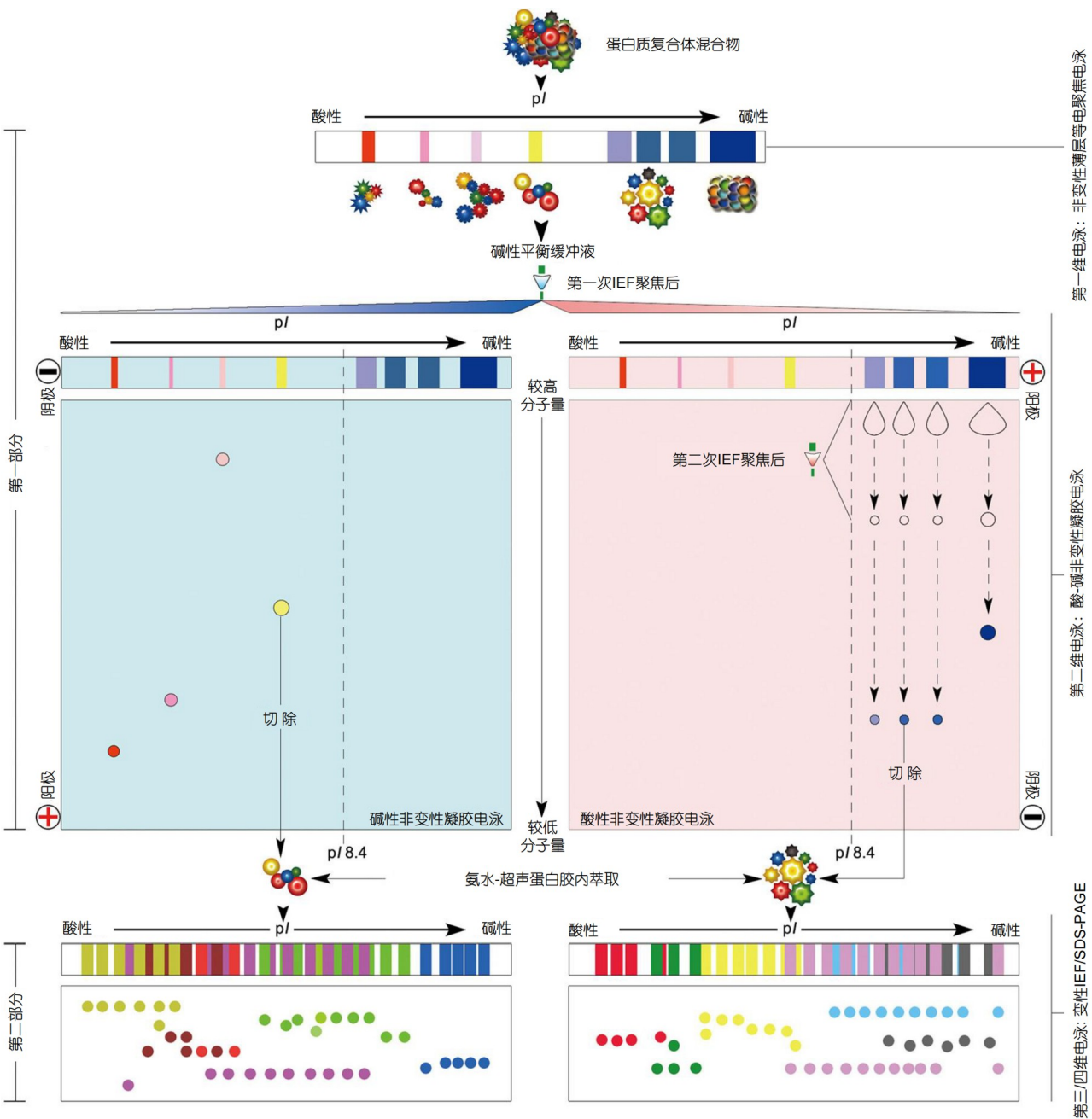


图 6 BS4-DES分离原理. 图片修改(引用)自文献[57](开放获取)
Figure 6 The separation principle of BS4-DES. Adapted (reproduced) from ref. [57] (Open Access)

胶转移至EM网格上进行成像,可清楚观察到呈单分散状态的蛋白质-SMALP颗粒,该结果有效证明SMA-PAGE处理后的样品能够满足cryo-EM单颗粒分析技术成像的要求.

实验验证方面,凝胶电泳技术结合其他检测技术

可作为一种系统的分析方法对实验结果进行对比验证.例如,利用大肠杆菌异源性表达*Aquifex aeolicus* F1FO ATP合酶时^[172],通过亲和尺寸排阻色谱纯化样品,随后使用BN-PAGE、免疫印迹分析以及质谱方法测定酶活性,最后使用单粒子EM观察其结构.该研究

表 2 研究PCs及相互作用蛋白质的凝胶电泳技术与相关联用技术

Table 2 Gel electrophoresis and correlation techniques to study PCs and interacting PCs

时间	蛋白质复合体类型	联用技术	文献
Native-PAGE			
2016	绿脓杆菌(<i>Pseudomonas aeruginosa</i>) MexAB-OprM 复合体	纳米磷脂盘、尺寸排阻色谱、透射电子显微镜 (transmission EM, TEM)	[100]
2017	人类(<i>Homo sapiens</i>)血清、血浆蛋白质复合体	LC-MS/MS	[101]
2017	大肠杆菌(<i>Escherichia coli</i>)细菌铁蛋白质	尺寸排阻色谱, 温度相关圆二色光谱, TEM	[102]
2018	海洋红大藻(<i>Centroceras clavulatum</i>)新型藻蓝、藻红蛋白	紫外光谱分析, SDS-PAGE和LC-MS/MS	[103]
2018	人类、酵母(yeast)胰岛素降解酶(insulin-degrading enzyme, IDE)	LC-MS/MS	[104]
2019	HIV-1细胞融合抑制剂T20	圆二色光谱	[105]
2019	人类单宁酸-血浆蛋白复合体	动态光散射、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS)、圆二色光谱、扫描电子显微镜 (scanning EM, SEM)	[106]
2019	青霉菌(<i>Penicillium</i>)异质二聚体凝集素	SDS-PAGE	[107]
2019	钩端螺旋体(<i>Leptospira</i>)超分子ErpY样脂蛋白	SDS-PAGE, 化学交联, 动态光散射, 场发射TEM	[108]
2020	酵母细胞纤维素体	免疫荧光显微镜, MS	[109]
2020	人类保守转运蛋白颗粒复合体	免疫荧光显微镜, SDS-PAGE, 免疫印迹分析	[110]
2020	ErpA载体蛋白、泛醌氧化还原酶	蔗糖梯度离心	[111]
2020	铁蛋白	SDS-PAGE, MALDI-TOF/TOF-MS	[112]
2020	脱氢抗坏血酸还原酶	SDS-PAGE, 免疫印迹分析, LC-MS/MS	[113]
2020	ATP合酶-光系统I反应中心超复合体	蔗糖梯度离心, 免疫印迹分析, nLC-MS/MS	[114]
2020	β -葡萄糖苷酶同工型II分子聚集体	SDS-PAGE, 醋酸尿素PAGE, nano LC-ESI-MS/MS	[115]
2020	神经源性丝氨酸蛋白酶抑制剂-组织型纤溶酶原激活剂	SDS-PAGE, 免疫荧光染色	[116]
2020	植物产生的猪瘟病毒(<i>Swine fever virus</i>) E2融合蛋白	尺寸排阻色谱, SDS-PAGE, 免疫印迹分析	[117]
2020	梭状芽孢杆菌(<i>Clostridium</i>) Na ⁺ 转运型谷氨酰辅酶A脱羧酶	SDS-PAGE, 尺寸排阻色谱, 激光诱导液珠离子解析质谱 (laser-induced liquid bead ion desorption mass spectrometry, LILBID-MS), TEM	[118]
2020	新型蛋白酶体组装中间体sub-13S	SDS-PAGE, LC-MS/MS	[119]
2021	人类PYRIN结构域蛋白3	SDS-PAGE, 尺寸排阻色谱	[120]
2021	酪蛋白胶粒	SDS-PAGE, 高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC), 尺寸排阻色谱, 小角X射线散射、分析超速离心	[34]
2022	纤维蛋白、葡萄球菌(<i>Staphylococcus</i>)凝固酶	尺寸排阻色谱、核磁滴定法、荧光各向异性法、圆二色光谱	[121]
BN-PAGE			
2006	膜复合体	IEF/SDS-PAGE	[24]
2015	类囊体膜蛋白	Nano HPLC-ESI-MS/MS	[122]
2016	瞬时受体电位通道Melastatin 4	尺寸排阻色谱, TEM, 荧光寿命成像	[123]
2017	疟原虫(<i>Plasmodium</i>)蛋白质输出复合体PTEX孔蛋白亚基EXP2	尺寸排阻色谱, SDS-PAGE, EM	[124]
2017	叶绿体膜TOC-TIC超复合体	SDS-PAGE, 免疫印迹分析	[125]
2018	蛋白质螺旋结构域CHCHD10	2D-BN-PAGE/SDS-PAGE, 免疫荧光分析, TEM	[126]
2018	VirB6/VirB10相互作用蛋白	SDS-PAGE, 免疫印迹分析, 荧光显微镜	[127]
2018	酸敏感离子通道/ATP敏感P2X受体的同源受体	膜片钳技术、免疫共沉淀、免疫荧光/共聚焦激光扫描显微镜	[128]

(表2续1)

时间	蛋白质复合体类型	联用技术	文献
2019	叶绿体MORF2-MORF9	Co-IP-MS	[129]
2019	肽基甘氨酸 α 酰胺化单加氧酶-V-ATPase	免疫印迹分析, LC-MS/MS, Co-IP	[130]
2019	杆状病毒PIF复合体	LC-MS/MS, 免疫印迹分析, Co-IP	[131]
2019	线粒体钙单向转运蛋白mtCU	免疫印迹分析	[132]
2019	B位淀粉样前体蛋白裂解酶1	免疫印迹分析, Co-IP	[133]
2020	线粒体酰基载体蛋白及其相互作用蛋白	亲和富集质谱(Affinity enrichment-mass spectrometry, AE-MS)	[134]
2020	P型Na/K-ATP水解酶复合体	SDS-PAGE, 毛细管免疫印迹光谱分析, MS	[135]
2020	叶绿体金属蛋白酶	SDS-PAGE, 免疫印迹分析	[136]
2020	细胞通讯网络因子6、线粒体呼吸复合体	SDS-PAGE, 免疫印迹分析, EM	[137]
2020	线粒体Ca ²⁺ 转运单向复合体-线粒体ATP合酶	免疫共沉淀、酵母双杂交技术、免疫荧光显微镜	[138]
2020	脑血清素受体-KIF13A复合体	SDS-PAGE, 免疫印迹分析	[139]
2020	线粒体呼吸链复合体V及其相互作用蛋白质	nano-ESI-LC MS/MS	[140]
2020	小麦(<i>Triticum aestivum</i> L.)线粒体氧化磷酸化复合体	SDS-PAGE, MALDI-TOF/TOF-MS	[141]
2020	钙蛋白酶CAPN ₃ 同源三聚体	SDS-PAGE, 免疫印迹分析, Co-IP	[142]
2020	PsbQ样蛋白3	SDS-PAGE, 免疫印迹分析	[143]
2020	ORAI1蛋白低聚体复合体	免疫印迹分析, SDS-PAGE	[144]
2021	阿尔茨海默病脑前额叶皮层PCs	2D-BN-PAGE/SDS-PAGE, LC-MS/MS, Co-IP, 免疫印迹分析	[145]
2021	噬菌体T4衣壳蛋白, 牛心脏线粒体呼吸链复合体 I, 补体蛋白C5, C6	SDS-PAGE, LC-MS, 胶内交联质谱(In-gel cross-linking mass spectrometry, IGX-MS)	[146]
2021	细胞色素bc1-aa3超复合体	SDS-PAGE, 免疫印迹分析, 尺寸排阻色谱法, nano-LC-MS/MS	[147]
2021	拟南芥(<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.)质体编码RNA聚合酶(plastid-encoded RNA polymerase, PEP)复合体	实时荧光定量PCR, SDS-PAGE, 免疫印迹分析, 共聚焦激光扫描显微镜	[148]
2021	秋葵(<i>Abelmoschus esculentus</i> (L.) Moench)叶绿体PSII核心二聚体等PCs	2D-BN-PAGE/SDS-PAGE, MALDI-TOF/TOF MS, 免疫印迹分析	[149]
2021	LHCII-PSI-LHCI超复合体	NG-PAGE, SDS-PAGE、	[150]
2021	线粒体呼吸链超复合体	免疫印迹分析, TEM, 动态光散射、	[151]
2021	类囊体色素-蛋白质复合体	圆二色光谱, 小角中子散射, TEM, SEM, HPLC	[152]
CN-PAGE			
2013	异位F0F1 ATP合酶	SDS-PAGE, 免疫印迹分析, LC-MS/MS	[153]
2017	有色类囊体膜复合体	LC-MS/MS, SING光谱分析	[82]
2018	微拟球藻(<i>Nannochloropsis granulata</i>)色素-蛋白质复合体超分子	SDS-PAGE, LC-MS/MS	[80]
2019	拟南芥叶绿体金属蛋白酶FtsH	Phos-tag SDS-PAGE, 免疫印迹分析	[154]
2019	拟南芥PCs	LC-MS/MS	[79]
2019	光系统II修复相关PCs	SDS-PAGE, LC-MS/MS	[48]
2019	线粒体呼吸链超复合体	BN-PAGE, 免疫印迹分析	[155]
2020	磷酸甘油糖异构酶聚合体	SDS-PAGE, 动态光散射, TEM, 荧光显微镜	[156]
2020	光捕复合体(light -harvesting complex, Lhc)	蔗糖梯度离心, lpBN-PAGE, SDS-PAGE, LC-MS/MS	[157]
2021	拟南芥/小立碗藓(<i>Physcomitrella patens</i>)类囊体PCs	SDS-PAGE, 免疫印迹分析	[158]
2021	岩藻黄质叶绿素a/c结合蛋白(fucoanthin Chl a/c binding protein, FCP)复合体	SDS-PAGE, HPLC, 时间分辨荧光分析法	[159]
2021	PSI-PSII巨型复合体, PSII-LHCII超复合体, PSI-LHC I, LHCII三聚体	SDS-PAGE, 蔗糖密度梯度离心, 免疫印迹分析, LC-MS/MS	[160]

(表2续2)

时间	蛋白质复合体类型	联用技术	文献
HrCN-PAGE			
2007	线粒体膜蛋白	SDS-PAGE	[49]
2011	叶绿体膜复合体	HD(组氨酸-脱氧胆酸盐)Native-PAGE, MALDI-TOF/TOF MS	[89]
2013	孔蛋白复合体	2D-HrCN-PAGE/SDS-PAGE	[161]
2014	膜蛋白	MALDI-TOF/TOF-MS	[85]
2020	G蛋白-B类降钙素样G蛋白偶联受体及相互作用蛋白质	SDS-PAGE	[162]
2021	线粒体呼吸链复合体I、酮戊二酸脱氢酶复合体	蛋白质印迹分析, LC-MS/MS	[163]
IEF			
2010	促红细胞生成素	Nano-ESI-MS/MS	[62]
2015	血清蛋白	SDS/ SAR(十二烷基肌氨酸钠)-PAGE, LC-MS/MS	[164]
2017	酵母、人癌细胞蛋白质	LC-MS	[44]
2019	甲状腺肿瘤相关抗体	双向差异凝胶电泳(2D-DIGE)、免疫印迹分析	[165]
2020	葡萄球菌(<i>Staphylococcus</i>)蛋白质	2D-DIGE, MS	[166]
4-DES/BS4-DES			
2010	细胞质蛋白质	MALDI-TOF/TOF MS	[56]
2012	血清蛋白复合体	基质辅助激光解吸/电离傅里叶变换离子回旋共振质谱(MALDI-FTICR MS)	[57]
Nondenaturing μ 2-DE			
2007	人血浆蛋白	MALDI-TOF MS	[167]
2007	人血浆蛋白	MALDI-MS	[168]
2008	人血浆蛋白	SDS-PAGE, MALDI-MS	[94]
2011	大肠杆菌可溶性蛋白质	SDS-PAGE, MALDI-MS-PMF	[169]
2014	高密度脂蛋白	LC-MS/MS	[95]
2015	人血浆蛋白	LC-MS/MS	[96]
2015	可溶性蛋白质	LC-MS/MS	[170]
2016	大鼠血浆蛋白	LC-MS/MS	[55]
SMA-PAGE			
2019	膜蛋白	LC-MS, cryo-EM	[51]
2019	膜蛋白、磷脂	LC-MS/MS	[91]
2020	高密度脂蛋白	LC-MS/MS	[171]

验证大肠杆菌异源性表达超耐热菌(*Aquifex aeolicus*) F1FO ATP合酶与超耐热菌中提取的ATP合酶复合体具有相同的酶活性和结构, 该异源性表达方法为研究呼吸复合体、核孔复合体或转运体系统等其他相关膜蛋白复合体提供新的研究思路.

2.1 凝胶电泳技术在细胞PCs研究中的应用

细胞中PCs可根据其位置分为膜PCs和非膜PCs. 分离检测这些PCs时采用合适的电泳方法会极大提升结果的准确度.

(1) 凝胶电泳技术在膜PCs研究中的应用. 叶绿体膜、线粒体膜、细胞膜乃至核膜上都分布有独特的PCs. 这些PCs功能不同, 相互协作共同发挥一种或几种生物学功能, 在细胞中发挥着信号转导, 物质筛选、运输等重要作用^[173~175]. 对这些PCs的研究有助于揭示生物膜系统能量转化、信号传导以及物质筛选等功能的运行机理. 目前研究的膜PCs主要集中在能量传递、物质筛选方面: 能量传递包括光系统复合体、呼吸链复合体; 物质筛选则包括细胞膜通道蛋白、受体蛋白以及核孔复合体^[176~178]. 分析这些PCs的作用机理

对阐释能量转化、细胞间协同、细胞调控等现象具有重要意义。

(i) 叶绿体膜相关复合体. 叶绿体膜相关复合体主要包括光系统复合体, 其位于类囊体膜上并参与光合作用。光系统复合体通常以超复合体的形式存在, 包含捕光复合体和光反应中心复合体, 以光能为驱动力为后续能量固定过程提供电子, 同其他PCs共同参与光合作用^[179]。光系统复合体可分为光系统 I 复合体(plastocyanin-ferredoxin oxidoreductase, PSI)和光系统 II 复合体(water-plastoquinone oxidoreductase, PSII)。研究表明, 复杂样品中的这两种光系统复合体可通过凝胶电泳方法实现有效分离, 从而为其后续结构及相关生物学功能研究奠定基础。

在叶绿体类囊体PCs研究中, 最初应用于分离线粒体中高分子量复合体的IpBN-PAGE^[77]电泳技术针对样品经个性化优化后可用于分离类囊体膜PCs^[122,180]。通过利用IpBN-PAGE分离拟南芥类囊体膜PCs, 并结合二维SDS-PAGE以及MS, 结果有效证明非贴附类囊体区域中色素-蛋白质复合体在短期光适应方面发挥重要作用。Kouril等人^[181]利用CN-PAGE检测并高产率地从类囊体膜中分离出光系统 I -还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸脱氢酶超复合体(photosystem I-NAD(P)H dehydrogenase complex, PSI-NDH)后, 酶解后运用LC-MS/MS对分离的PCs进行鉴定。通过单粒子EM对经CN-PAGE纯化的PSI-NDH空间结构进行观察分析, 并将结果与X射线技术检测得到的相关数据进行拟合, 最终构建出在20 Å分辨率下的PSI-NDH结构功能模型。相较于CN-PAGE, 改良后的BN-PAGE也可用于类囊体膜相关PCs的纯化与检测。叶绿体中存在大量为光合作用酶提供附着位点的基粒, 这些基粒由于排列形式不同而导致其功能不同。通常基粒可分为堆叠型与未堆叠型, 但通过cryo-EM观察发现基粒边缘因其特殊结构可能存在第三个功能区域。因此, Koochak等人^[182]将类囊体膜分离成核心、边缘和薄层三类并统计各组分差异, 采用改良后的BN-PAGE对PSII超复合体进行检测, 然后借助免疫印迹等方法分析PSII超复合体完整结构及其亚基组成进而推断各区域功能。PSI反应中心能与多个光捕获复合体 II (light-harvesting complex II, LHCII)组成PSI-LHCII巨复合体, 此类巨复合体对光强变化反应迅速, 并可通过非变性凝胶电泳进行观测。利用由BN-PAGE改良的NG-

PAGE, Schwarz等人^[183]对菠菜(*Spinacia oleracea* L.) PSI-LHCII巨复合体的组成进行表征, 结果表明该巨复合体的动力可能依赖于PSII核心磷酸化, 对于当前的类囊体动力学模型构建具有深远意义。通过适当调整BN-PAGE凝胶成分配比, 该技术可实现叶绿体外/内包膜上转座子(translocon at the outer/inner envelope membrane of chloroplasts, TOC-TIC)超复合体的分离。利用该方法Chen和Li^[125]成功发现豌豆(*Pisum sativum* L.)叶绿体膜TOC-TIC上存在叶绿体前蛋白, 证明叶绿体前蛋白可通过TOC-TIC超复合体介导进入叶绿体。

(ii) 线粒体膜相关复合体. 线粒体膜复合体包括位于线粒体外膜的translocase of the outer mitochondrial membrane(TOM)复合体、位于线粒体内膜的内膜载体转位酶复合体(translocase of the inner mitochondrial membrane 22 complex, TIM22 complex), 前序列转位酶复合体(presequence translocase of the inner mitochondrial membrane 23 complex, TIM23 complex), presequence translocase-associated motor(PAM)复合体, 以及位于线粒体内膜参与能量代谢的呼吸链复合体。

TOM复合体负责将外界前体蛋白跨线粒体外膜转运至线粒体膜间隙中, 其主要组成亚基包括Tom5, Tom20, Tom40等。Wang等人^[184]在对TOM核心复合体组装结构研究中, 先通过BN-PAGE及免疫印迹对TOM核心复合体进行检测, 随后采用MS以及cryo-EM对sorting and assembly machinery(SAM)-TOM40复合体的结构进行研究, 为进一步阐明TOM-SAM超级复合体的结构提供依据。TIM22复合体位于线粒体内膜, 主要由Tim22, Tim9, Tim10等亚基组成。Geibert等人^[185]采用BN-PAGE对琥珀酸脱氢酶亚基3(subunit 3 of succinate dehydrogenase, Sdh3)的功能进行检测, 通过对Tim35进行35S标记, 发现Tim18组装到TIM22复合体中需要Sdh3, 随后通过SDS-PAGE和蛋白质印迹进一步进行分析, 最终发现Sdh3存在于至少两种线粒体内膜PCs中, 并在电子传递和蛋白质组装中起重要作用。TIM23复合体位于线粒体内膜, 主要组成亚基为Tim21, Tim23, Tim50等。Gomkale等人^[186]在研究TOM-TIM23超复合体中的蛋白质相互作用时, 借助BN-PAGE检测TOM-TIM23超复合体的形成过程, 发现其含量随前体蛋白Jac1^{sGFP}含量的升高而上升, 并生成稳定的TOM-TIM23易位中间体, 为随后研究TOM和TIM23膜间空间界面的分子环境及其相互作用提供

良好的检测对象。

呼吸链复合体位于线粒体内膜, 参与呼吸作用, 负责形成膜内外 H^+ 梯度, 为 H^+ -ATP酶合成ATP提供最直接的驱动力, 是线粒体中能量转化的重要PCs之一。呼吸链复合体包括复合体 I, II, III和IV, 在线粒体中共同参与电子的传递。线粒体膜上附着的大多数PCs都参与呼吸作用, 使用BN-PAGE分离线粒体中的膜PCs^[187], 结合SDS-PAGE、免疫印迹法和放射自显影技术, 可对线粒体呼吸链复合体亚基结构、线粒体蛋白导入机制进行分析。该方法同样适用于分析过氧化物酶体。凝胶内活性测定法(in-gel activity assay, IGA)因无需特异性抗体而可替代蛋白质印迹法研究真核生物中多种超复合体, 但复合体III的辅酶难以获得, 因此无法使用IGA对复合体III进行分析。新开发的IGA-细胞色素c(IGA-cytochrome c, IGA-Cyt c)方法可用于检测复合体III及复合体IV在凝胶中的活性^[88]。利用Cyt c与复合体III、复合体IV的缔合特性, 可通过hrCN/SDS 2D-PAGE进行检测。在第一维电泳后将hrCN-PAGE条带浸入去污剂孵育松散样品结构, 使Cyt c与复合体III、复合体IV的缔合状态出现差异, 进而可通过IGA检测复合体III。电子传递链(electron transport chain, ETC)是由呼吸链复合体通过不同的组合方式形成的具有高催化效率及稳定性的超复合体, 通过BN-PAGE结合其他检测方法可对ETC与脂肪酸 β -氧化(fatty acid β -oxidation, FAO)相关酶的相互作用进行研究^[188]。

(iii) 细胞膜PCs。细胞膜PCs有信号转导、物质筛选等功能, 是细胞与外界进行物质、信息交流的重要通道。在细胞膜PCs中, 通道蛋白开关以及受体蛋白相关的信息介导通路存在复杂的调控机制。凝胶电泳可用于检测这些目标PCs的分子量及其相互作用蛋白质, 同时通过比较分析膜PCs亚基组成及占比, 对研究细胞膜PCs空间结构以及功能位点具有重要参考价值。

电泳过程中, 根据膜PCs特性对样品进行适当处理可明显抑制样品降解, 同时对电泳相关参数进行优化可提高电泳分离效果。例如, 通过SMA与脂质相互作用的特性将膜PCs包裹后进行SMA-PAGE电泳^[91], 根据分子大小不同将样品与SMA结合形成的SMALP颗粒从凝胶中分离提取, 随后利用LC-MS/MS及EM对该颗粒进行检测, 可在检测目标PCs的同时实现对其周围脂质环境特征的分析。凝胶电泳技术同样可用于

估量膜蛋白复合体及其组成亚基的分子量, 为分析膜蛋白空间结构及亚基数量提供参考。Melastatin 4型瞬时受体电位通道(transient receptor potential melastatin 4 channel, TRPM4)的突变、不规则表达和持续激活与人类多种心血管疾病有关。Constantine等人^[123]利用纯化的异源表达TRPM4-增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, eGFP)融合蛋白, 通过BN-PAGE, 多角度激光散射和EM研究洗涤剂束中TRPM4-eGFP的寡聚状态。在使用BN-PAGE对TRPM4-eGFP进行分离时得到一条明显的条带, 该条带在凝胶中所在位置的分子量约为单体TRPM4-eGFP分子量(167 kD)的3.8倍, 表明该PCs很可能是四聚体。该结果为提出TRPM4形成四聚体离子通道的观点提供充分的证据。非变性PAGE也可用于膜PCs及相互作用蛋白质的检测。例如在G蛋白偶联受体(G protein-coupled receptors, GPCRs)、降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)和肾上腺髓质素(adrenomedullin, ADM)受体的偶联表征中^[162], 通过Native-PAGE和hrCNE进行检测, 评估在哺乳动物细胞中表达的CLR-RAMP异二聚体的形成和热稳定性。该研究进一步测定受体激动剂对mini- G_s (mG_s)偶联受体和 mG_s 对激动剂占据受体的表观亲和力, 为了解CGRP, AM和AM2/IMD信号通过其共享受体传递的共性和差异提供依据, 有助于未来的结构研究和治疗肽类似物的开发。对样品进行适当处理可实现非变性PAGE对膜蛋白结构进行解析, 同时分析非同源性亚基的相互作用。例如, 通过Native-PAGE和EM研究绿脓杆菌MexAB-OprM复合体^[100]。该膜PCs由内膜转运蛋白, 外膜通道和周质衔接蛋白组成。将各部分单独插入纳米磷脂盘后按一定比例混合并通过Native-PAGE进行分离, 分析各部分在完整膜PCs中的占比; 同时将该膜PCs利用尺寸排阻色谱提纯后经EM分析空间结构, 最终得到其具体组成结构, 为革兰氏阴性细菌抗药性研究以及抑制剂的开发提供参考。

核膜上的核孔复合体(nuclear pore complexes, NPCs)连接细胞核与细胞质, 是细胞核控制细胞的重要通道。NPCs控制细胞核中核糖的进出, 对细胞的生命周期、物质合成及对外界信息反应有重要调控作用。核孔复合体分子量极大, 功能涉及基因表达调控, 当前研究多为SDS-PAGE结合免疫印迹分析, 联用MS及cryo-EM检测其亚基序列和空间结构^[176-178]。

凝胶电泳在研究膜PCs时通常须添加CBB, 洋地黄皂苷等温和去污剂以增加膜PCs的溶解度, 选用的分离方法以BN-PAGE居多。同时针对膜PCs可能存在少量脂质成分, 在分离过程中破坏其周围脂质环境可能导致结构发生改变的特点, 专门用于分离膜PCs的电泳方法如SMA-PAGE也在不断探索中。

(2) 凝胶电泳技术在细胞非膜PCs研究中的应用。细胞质是细胞进行生命活动的重要区域, 包括基质及细胞器, 执行代谢及物质合成功能。细胞质中存在大量核糖体、酶等生物大分子以及代谢产物、营养物质等。PCs在细胞质的生物大分子中作为参与细胞各种生理功能的重要成分, 研究其功能与结构可为解析细胞运作以及细胞生命活动机理提供佐证。相比分离膜蛋白需在电泳中添加CBB试剂增溶膜蛋白, 非膜PCs的提取更加温和, 例如对分子量较大、结构易破坏的非膜PCs常采用Native-PAGE进行提取分离, 也可添加更为温和的试剂如洋地黄皂苷等替代CBB进行提取。

(i) 细胞质PCs研究。蛋白酶体是一种大型蛋白质复合体^[189], 广泛分布在各类细胞的细胞质中^[12]。作为泛素-蛋白酶体系统的重要组成成分, 蛋白酶体可通过降解生物体内蛋白质实现调控细胞周期、信号转导、细胞凋亡^[190]等多种生理生化过程。蛋白酶体结构复杂, 至少由32种不同亚基组成^[191], 例如26S蛋白酶体全酶包含2个19S调节颗粒(19S regulatory particle, RP)和1个20S核心颗粒(20S core particle, CP), 而这些颗粒内部包含不同种类的亚基。RP位于CP的两端, 可识别带有泛素化标签的蛋白质, 而CP具有蛋白质水解活性, 其酶活性位点位于桶状结构内部^[192,193]。

Native-PAGE在蛋白酶体全酶研究中具有在分离过程中保持PCs结构完整的特点, 因此在非变性分离提纯中应用广泛。Elsasser等人^[194]将Native-PAGE分离蛋白酶体的流程进行总结, 在凝胶制备阶段, 对比丙烯酰胺浓度为3%~4%制得的凝胶对蛋白酶体的分离效果, 最终确认浓度为3.5%的聚丙烯酰胺凝胶对蛋白酶体分离效果最为理想。

对于组成蛋白酶体的RP, CP颗粒, 同样可通过Native-PAGE进行分离纯化^[195]。Leggett等人^[196]通过离子交换树脂和亲和纯化蛋白酶体后, 采用凝胶电泳纯化蛋白酶体的主要亚组件如CP, RP等核心颗粒, 随后利用多种活性分析结合Native-PAGE进行对比研究纯化后蛋白酶体功能。蛋白酶体CP是由4个堆叠的7亚基异

聚环以 $\alpha 7\beta 7\beta 7\alpha 7$ 结构排列的桶状复合体, 其蛋白质水解位点位于中心 β 环内侧, 而降解底物经RP的识别后须穿过CP-RP界面到达CP。在对组成该界面两个对齐异聚环亚基研究中, 通过3.5%(w/v)Native-PAGE对制备的总细胞裂解物中的蛋白酶体进行粗分离, 并用蛋白酶体20S荧光底物(suc-LLVY-AMC)对分离后的蛋白酶体进行活性检测^[197], 随后通过免疫印迹法检测RP中6个亚基与CP中7个 α 亚基的相互作用, 发现环CP-RP界面存在不对称性。

此外, Native-PAGE可分离纯化26S蛋白酶体用于后续单粒子cryo-EM分析^[198]。例如, Iwanczyk等人^[199]开发出一种高效纯化方法, 可产生大量稳定的Blm10-20S蛋白酶体复合体, 这些样品可用于cryo-EM以获得Blm10-20S蛋白酶体复合体的图像。

除利用Native-PAGE对蛋白酶体进行分离提纯外, 该方法还可与其他电泳联合, 如Native-PAGE可与SDS-PAGE组合为2D Native/SDS PAEG对样品进行分离鉴定; 而联用2D Native/SDS PAGE以及suc-LLVY-AMC凝胶活性测定方法还可获得分离的蛋白酶体活性及组成信息, 通常用于检测RP和RP-CP复合体的结构及活性^[200]。Roelofs等人^[58]经实验发现在凝胶中加入ATP可有效保持蛋白酶体复合体结构的完整性, 而通过基因改造技术使蛋白酶体复合体带有荧光标记可实现凝胶中蛋白酶体复合体快速筛选检测; 同时将2D Native/SDS PAGE与免疫印迹法相结合, 在显著提高目标蛋白质检测的灵敏度的同时还可额外提供分子量等信息^[201]。而在研究蛋白酶体稳定性可通过蛋白水解活性位点参与变构调节中^[202], 开发出的高分辨率2D Native/SDS PAEG系统克服Native-PAEG不能完全揭示样品中复合体数量或类型的缺点, 结合体外蛋白酶体重组分析发现酵母CP-RP复合体中包含紧密结合的ATP, 并且发现蛋白酶体抑制剂能够有效稳定蛋白酶体结构, 防止CP-RP的解离。由此判断CP-RP相互作用的稳定性与溶液中ADP或ATP有关, 推测蛋白质降解过程可能会抑制蛋白酶体分解, 间接提高蛋白质水解速率。

凝胶电泳还可对实验结论进行验证。Verma等人^[203]利用亲和纯化方法从出芽酵母细胞中分离纯化完整的26S蛋白酶体, RP和CP, 并开发出一种能够识别这些蛋白酶体相互作用蛋白的方法, 利用该方法可通过质谱检测直接分析大蛋白复合体(direct analysis of the composition of large protein complexes, DALPC)的

组成. 该研究利用Native-PAGE评估并验证纯化的蛋白酶体复合体和亚复合体的组装状态及其活性. 同样, 在探究脑26S蛋白酶体及其相互作用蛋白的研究中, Tai等人^[204]采用亲和纯化方法从大鼠大脑皮层的细胞溶质和神经元突触隔室中分离出26S蛋白酶体, 并通过LC-MS/MS比较突触和胞质中发现的26S蛋白酶体亚基和蛋白酶体相互作用蛋白质, 随后通过Native-PAGE检测分离纯化的蛋白酶体的完整性, 发现在皮层中26S蛋白酶体(19S-20S-19S)比例高于肝脏或肾脏, 且不同种类蛋白酶体分布在不同细胞和组织之间, 甚至在大脑细胞中不同亚细胞区室之间分布也存在差异; 随后将培养的神经元暴露于谷氨酸受体激动剂N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartate, NMDA)中, 通过梯度Native-PAGE观察26S蛋白酶体的分解情况, 发现蛋白酶体及其相互作用蛋白质的含量可通过神经元活动而改变.

除蛋白酶体外, 非变性PAGE同样可对细胞质中其他PCs进行分离. 例如在植物细胞质中, BN-PAGE可作为分离提纯方法对实验结论进行验证. 大量研究发现, NDUFAB1是维持细胞活性必需的线粒体酰基载体蛋白(acyl carrier protein, ACP), 可以与含有亮氨酸-酪氨酸-精氨酸序列(leucine-tyrosine-arginine motif, LYRM)的蛋白质家族相互作用, 但部分功能仍然未知, 通过AE-MS等多种方法对NDUFAB1作用网络进行研究^[134], 结果表明其与9个已知的LYRM蛋白以及20多个线粒体呼吸链复合体、线粒体核糖体组装相关蛋白质之间存在联系; 随后通过BN-PAGE分离众多蛋白质, 结合免疫印迹方法对之前得到的分析结果进行验证. CN-PAGE同样可作为分离方法对细胞质PCs进行分离, 也可与其他检测方法联用进行鉴定分析. 例如, 赵^[205]在制胶过程中调整丙烯酰胺浓度优化凝胶孔径, 通过CN-PAGE分离细胞裂解液中的PCs, 随后结合SDS-PAGE与MALDI-TOF/TOF MS研究其中热休克蛋白的相关结构信息. 在研究白天和夜间拟南芥PCs的差异实验中^[79], CN-PAGE与LC-MS/MS联用作为PCs定量分析的新方法, 通过该方法发现MS分离的PCs可沿分子量梯度建立丰度相关的分布, 有助于鉴定白天及夜间PCs丰度变化情况, 并对蛋白质间相互作用进行预测. Kifer等人^[44]在研究IEF与LC-MS/MS联用时对上述研究方法进行优化, 提出三种算法, 使检测中LC-MS/MS不必对每个IEF样品分别进行分析

以节约实验成本和分析时间, 同时扩大检测范围, 通过分析酵母和人癌细胞中非变性PCs对方法进行验证. 此外, Jin等人^[170]通过将Nondenaturing μ 2-DE与nano-UPLC-MS/MS联用对人支气管平滑肌细胞中的可溶性蛋白质进行分析, 最终鉴定出4323个可溶性蛋白质的天然蛋白图谱, 并设计“重叠搜索”方法比对鉴定的天然蛋白图谱以预测蛋白质在电泳期间是否存在相互作用, 该方法可同时分析Nondenaturing μ 2-DE中存在的多种蛋白质复合体, 为检测分析阶段的自动化分析及预测提供新的思路.

(ii) 细胞核内PCs研究. 核蛋白一般是指在细胞核中起支持、调控、转录、合成相关作用的蛋白质. 对核蛋白复合体的研究有助于揭示细胞核中遗传物质的复制、转录以及与遗传物质调控相关作用机理, 并为细胞分裂分化相关生物过程研究提供新的思路与方法.

非变性PAGE可用于核PCs的分离提纯. 在DNA损伤反应方面, 范科尼贫血症(Fanconi anemia, FA)通路和跨损伤DNA合成(translesion DNA synthesis, TLS)通路是最早发现受可逆泛素化调节的DNA损伤修复途径, 其中USP1-UAF1复合体通过去泛素化调节FA及TLS. 在探究USP1-UAF1抑制剂对去泛素化以及DNA损伤反应的影响实验中, Liang等人^[206]选择ML323作为抑制剂, 通过8% Native-PAGE分离USP1-UAF1复合体, 对比由紫外线、顺铂诱导产生的DNA损伤反应中的去泛素化, 研究USP1-UAF1在细胞对DNA损伤反应中的作用. 非变性PAGE也用于核PCs的分离. Luo等人^[207]在对核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)进行电泳迁移率变动分析(electrophoresis mobility shift assay, EMSA)时开发出一种可从少量细胞中获得高纯度核蛋白的方法, 并在6%(v/v)的非变性PAGE中分离出核PCs.

一般认为, 在质体编码的光合作用基因表达研究中, 质体编码的RNA聚合酶(plastid-encoded RNA polymerase, PEP)复合体的组装被认为是激活质体编码的光合作用基因表达的限速步骤. Ji等人^[148]通过BN-PAGE对原质体和前质体进行分离, 发现其中存在完整的PEP复合体, 证明黑暗环境下黄化质体和前质体中存在组装完整PEP复合体的过程, 与之前检测到黑暗中PEP活性抑制因子表达量降低相一致, 表明PEP复合体的组装很可能不是激活质体编码光合作用基因表达的限速步骤.

2.2 凝胶电泳技术在细胞外分泌PCs研究中的应用

外分泌PCs自核糖体产生, 经内质网、高尔基体加工后由囊泡包裹穿过细胞膜进入细胞外部环境中, 包括酶、抗体以及执行转运、信号传递相关功能的PCs. 该方面研究可为探究机体内稳态以及适应外部环境相关机理提供参考.

触珠蛋白(haptoglobin, HP)广泛分布在血清中, 负责清除游离的血红蛋白以避免其对肾小管造成损伤. 作为一种细胞外分泌PCs, HP经电泳分离后共有4种复合体表型^[57], 其中Hp1-1, Hp2-1, Hp2-2在正常血清中表达, 而Hp0型常在白血病患者血清中分离得到. 不同类型Hp由不同多肽链组成, 通过BS4-DES系统分离后在凝胶中得到直观显示. 此外也发现Hp2-1, Hp2-2存在多聚体, 相比SDS-PAGE分离正常和不同患者血清Hp, BS4-DES系统分离后凝胶上呈现出明显差异, 表明其在疾病诊断方面具有潜在应用价值.

Hakamada等人^[124]研究疟原虫蛋白质输出复合体(plasmodium translocon of exported proteins, PTEX)中构成跨膜孔的蛋白质EXP2时, 采用BN-PAGE和尺寸排阻色谱对其在膜上构成的孔进行分子量测定, 同时采用EM以及测量孔通道电流的方法计算得到孔洞直径及EXP2的亚基数量, 综合两种方法测得的结果确定该孔蛋白复合体包含10~12个EXP2亚基, 为解析PTEX转运蛋白质机制及开发针对PTEX的新药物提供参考.

2.3 凝胶电泳技术在病毒相关PCs研究中的应用

病毒结构简单, 主要由外部蛋白质衣壳及内部包裹的遗传物质组成. 凝胶电泳技术可对病毒相关蛋白质进行分离提纯, 对比分析其分子量大小以及相互作用等信息, 为病毒相关毒理机制研究以及疫苗开发、转基因载体构建等应用提供参考.

牛乳头瘤病毒的E5蛋白是一种具有44个残基的跨膜蛋白, 其可与血小板衍生出的生长因子 β 受体(platelet-derived growth factor β receptor, PDGF β R)跨膜结构域(transmembrane domain, TMD)相结合, 进而引起受体二聚化并激活. Karabadzhak等人^[208]通过BN-PAGE确定E5/PDGF β R跨膜复合体的分子量, 并使用抗PDGF β R抗体检测到一条明显的条带, 通过对比该条带与可溶性球蛋白标准品位置, 最终计算出E5蛋白相对分子量约为60 kD. 杆状病毒入侵昆虫中

肠细胞多依赖于其表面的感染性因子(per os infectivity factor, PIF)复合体, Wang等^[131]人通过BN-PAGE、免疫印迹分析及LC-MS/MS联用对三种不同杆状病毒分析, 表明该复合体完整结构由9种PIF组成, 其中PIF1, PIF2, PIF3组成其核心复合体. Park等人^[117]利用基因工程技术使植物产生猪瘟病毒E2重组蛋白, 并进一步采用Native-PAGE结合尺寸排阻色谱对该重组蛋白质结构进行分析, 之后将其作为抗原注射到小鼠及仔猪体内, 检测发现实验动物产生大量抗体, 证明该蛋白质可作为抗原用于猪瘟病毒疫苗的开发.

3 总结与展望

研究PCs以及蛋白质相互作用的凝胶电泳技术关键在于保持PCs结构完整及生物活性. 随着凝胶电泳技术发展成熟, 可针对不同PCs及相互作用蛋白质的特性进行调整, 不仅可以用于分离这些复合体, 同时可在分离PCs及相互作用蛋白质后保持其结构及生物活性正常, 并用于后续其他检测方法. 然而, 凝胶电泳技术在对PCs的分离研究中仍存在诸多问题: PCs种类多、功能复杂, 研究不同PCs需要针对其特点采用不同方法; 部分PCs的极端特性使普通凝胶电泳技术已较难分离得到高纯度样品; 在保持样品结构方面, 普通凝胶电泳技术没有针对性地对目标样品进行保护, 少量样品在电泳分离过程中及分离后会出现结构改变的情况.

针对以上问题, 目前凝胶电泳技术已出现技术个性化、模块化、微型化以及自动化的趋势. 个性化解决PCs及相互作用蛋白质种类多、功能复杂造成其不同特性对电泳分离造成影响的问题. 分离不同种类PCs需根据其特性对凝胶电泳技术进行相应调整, 使其最大程度适用于分离该类样品, 提高分离纯度并根据该类PCs特性进行针对性保护. 由于PCs种类多、功能复杂而产生大量个性化电泳, 用于总结归类凝胶电泳技术模块化方法则应运而生. 大多数凝胶电泳技术都需经过制胶、样品准备、电泳、凝胶处理、检测分析5个步骤, 模块化可在这五部分基础上进行改动. 微型化是电泳发展的另一趋势. 电泳微型化主要体现在凝胶大小上, 小型凝胶分离样品也可与正常凝胶相比无明显区别, 在满足分离样品的同时减少试剂使用,

缩短电泳时间, 避免长时间电泳产生的热量对PCs结构造成影响。此外电泳自动化目前已得到广泛应用, 通过自动化可实现电泳的标准化操作, 达到高效、快

速分离样品的目的。凝胶电泳技术还在不断发展优化, 随着更多PCs的发现并对其深入分析, 凝胶电泳技术将会得到更广泛的应用。

参考文献

- 1 Marsh J A, Teichmann S A. Structure, dynamics, assembly, and evolution of protein complexes. *Annu Rev Biochem*, 2015, 84: 551–575
- 2 Pireyre M, Burow M. Regulation of MYB and bHLH transcription factors: a glance at the protein level. *Mol Plant*, 2015, 8: 378–388
- 3 Hagan C L, Silhavy T J, Kahne D. β -barrel membrane protein assembly by the bam complex. *Annu Rev Biochem*, 2011, 80: 189–210
- 4 Levitan I B. Signaling protein complexes associated with neuronal ion channels. *Nat Neur*, 2006, 9: 305–310
- 5 Alegre M L, Frauwirth K A, Thompson C B. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immunol*, 2001, 1: 220–228
- 6 Noinaj N, Guillier M, Barnard, T J, et al. TonB-dependent transporters: regulation, structure, and function. *Annu Rev Microbiol*, 2010, 64: 43–60
- 7 Letts J A, Sazanov L A. Clarifying the supercomplex: the higher-order organization of the mitochondrial electron transport chain. *Nat Struct Mol Biol*, 2017, 24: 800–808
- 8 Goldberg A L. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature*, 2003, 426: 895–899
- 9 Sancar A, Lindsey-Boltz L A, Ünsal-Kaçmaz K, et al. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem*, 2004, 73: 39–85
- 10 Kim S J, Fernandez-Martinez J, Nudelman I, et al. Integrative structure and functional anatomy of a nuclear pore complex. *Nature*, 2018, 555: 475–482
- 11 Lobo-Jarne T, Ugalde C. Respiratory chain supercomplexes: structures, function and biogenesis. *Semin Cell Dev Biol*, 2018, 76: 179–190
- 12 Lu H, Li Y C, Huang X S. Mechanistic studies of post-translational modifications on the proteasome (in Chinese). *Chin J Biochem Mol Biol*, 2021, 37: 710–719 [卢慧, 李衍常, 黄学石. 蛋白酶体翻译后修饰功能机制研究. *中国生物化学与分子生物学报*, 2021, 37: 710–719]
- 13 Shakeel S, Rajendra E, Alcón P, et al. Structure of the Fanconi anaemia monoubiquitin ligase complex. *Nature*, 2019, 575: 234–237
- 14 Rezende S M, Simmonds R E, Lane D A. Coagulation, inflammation, and apoptosis: different roles for protein S and the protein S-C4b binding protein complex. *Blood*, 2004, 103: 1192–1201
- 15 Niehrs C. The complex world of WNT receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13: 767–779
- 16 Gay F P, Robertson T B. The antigenic properties of globin caseinate. *J Exp Med*, 1913, 17: 535–541
- 17 Styne B, Tournu H, Tavernier J, et al. Diversity in genetic *in vivo* methods for protein-protein interaction studies: from the yeast two-hybrid system to the mammalian split-luciferase system. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2012, 76: 331–382
- 18 Sekar R B, Periasamy A. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations. *J Cell Biol*, 2003, 160: 629–633
- 19 Kerppola T K. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. *Annu Rev Biophys*, 2008, 37: 465–487
- 20 Glad M, Larsson P O. New methods for separation and recovery of biomolecules. *Curr Opin Biotechnol*, 1991, 2: 413–418
- 21 Mulvey C M, Breckels L M, Geladaki A, et al. Using hyperLOPIT to perform high-resolution mapping of the spatial proteome. *Nat Protoc*, 2017, 12: 1110–1135
- 22 Mohammed H, Taylor C, Brown G D, et al. Rapid immunoprecipitation mass spectrometry of endogenous proteins (RIME) for analysis of chromatin complexes. *Nat Protoc*, 2016, 11: 316–326
- 23 Vassilyeva M N, Klyuyev S, Vassilyev A D, et al. Efficient, ultra-high-affinity chromatography in a one-step purification of complex proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114: E5138–E5147
- 24 Wittig I, Braun H P, Schägger H. Blue native PAGE. *Nat Protoc*, 2006, 1: 418–428
- 25 Laganowsky A, Reading E, Hopper J T S, et al. Mass spectrometry of intact membrane protein complexes. *Nat Protoc*, 2013, 8: 639–651
- 26 Huang C, Kalodimos C G. Structures of large protein complexes determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Annu Rev Biophys*, 2017, 46: 317–336

- 27 Jeffries C M, Graewert M A, Blanchet C E, et al. Preparing monodisperse macromolecular samples for successful biological small-angle X-ray and neutron-scattering experiments. [Nat Protoc](#), 2016, 11: 2122–2153
- 28 Pokorski J K, Hore M J A. Structural characterization of protein-polymer conjugates for biomedical applications with small-angle scattering. [Curr Opin Colloid Interface Sci](#), 2019, 42: 157–168
- 29 Liu R, Xia S, Li H. Native top-down mass spectrometry for higher-order structural characterization of proteins and complexes. [Mass Spectrom Rev](#), 2023, 42: 1876–1926
- 30 Saxena A, Tripathi B P, Kumar M, et al. Membrane-based techniques for the separation and purification of proteins: an overview. [Adv Colloid Interface Sci](#), 2009, 145: 1–22
- 31 Geladaki A, Kočevár Britovšek N, Breckels L M, et al. Combining LOPIT with differential ultracentrifugation for high-resolution spatial proteomics. [Nat Commun](#), 2019, 10: 331
- 32 Gautam S, Loh K C. Immunoglobulin-M purification—challenges and perspectives. [Biotechnol Adv](#), 2011, 29: 840–849
- 33 Raymond S, Weintraub L. Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis. [Science](#), 1959, 130: 711
- 34 Sun Y, Tai Z, Yan T, et al. Unveiling the structure of the primary caseinate particle using small-angle X-ray scattering and simulation methodologies. [Food Res Int](#), 2021, 149: 110653
- 35 Tiselius A. Electrophoresis of serum globulin. I. [Biochem J](#), 1937, 31: 313–317
- 36 Putnam F W. α -, β -, γ -Globulin—Arne Tiselius and the advent of electrophoresis. [Perspect Biol Med](#), 1993, 36: 323–337
- 37 Bosse M A, Arce P. Role of Joule heating in dispersive mixing effects in electrophoretic cells: convective-diffusive transport aspects. [Electrophoresis](#), 2000, 21: 1026–1033
- 38 Wieland T, Fischer E. Über elektrophorese auf filtrierpapier. [Sci Nat](#), 1948, 35: 29–30
- 39 Kunkel H G, Tiselius A. Electrophoresis of proteins on filter paper. [J Gen Physiol](#), 1951, 35: 89–118
- 40 Gordon A H, Keil B, Åebesta K. Electrophoresis of proteins in agar jelly. [Nature](#), 1949, 164: 498–499
- 41 Kohn J. A cellulose acetate supporting medium for zone electrophoresis. [Clinica Chim Acta](#), 1957, 2: 297–303
- 42 Chrambach A, Rodbard D. Polyacrylamide gel electrophoresis. [Science](#), 1971, 172: 440–451
- 43 Vesterberg O, Svensson H, Nevald R, et al. Isoelectric fractionation, analysis, and characterization of ampholytes in natural pH gradients. IV. Further studies on the resolving power in connection with separation of myoglobins. [Acta Chem Scand](#), 1966, 20: 820–834
- 44 Kifer I, Branca R M, Ben-Dor A, et al. Optimizing analytical depth and cost efficiency of IEF-LC/MS proteomics. [IEEE ACM Trans Comput Biol Bioinf](#), 2017, 14: 272–281
- 45 Schagger H, von Jagow G. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. [Anal Biochem](#), 1991, 199: 223–231
- 46 Zheng Y, Gibb A A, Xu H, et al. The metabolic state of the heart regulates mitochondrial supercomplex abundance in mice. [Redox Biol](#), 2023, 63: 102740
- 47 Schagger H, Cramer W A, Vonjagow G. Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. [Anal Biochem](#), 1994, 217: 220–230
- 48 Weisz D A, Johnson V M, Niedzwiedzki D M, et al. A novel chlorophyll protein complex in the repair cycle of photosystem II. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2019, 116: 21907–21913
- 49 Wittig I, Karas M, Schagger H. High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes. [Mol Cell Proteomics](#), 2007, 6: 1215–1225
- 50 Potter A, Cabrera-Orefice A, Spelbrink J N. Let's make it clear: systematic exploration of mitochondrial DNA- and RNA-protein complexes by complexome profiling. [Nucleic Acids Res](#), 2023, 51: 10619–10641
- 51 Pollock N L, Rai M, Simon K S, et al. SMA-PAGE: a new method to examine complexes of membrane proteins using SMALP nano-encapsulation and native gel electrophoresis. [Biochim Biophys Acta Biomembr](#), 2019, 1861: 1437–1445
- 52 Manabe T, Kojima K, Jitzukawa S, et al. A normalized protein map of human plasma, and characterization of the normalized spots by microscale amino acid analysis. [Clin Chem](#), 1982, 28: 819–823
- 53 Manabe T, Takahashi Y, Okuyama T. An electroblotting apparatus for multiple replica technique and identification of human serum proteins on micro two-dimensional gels. [Anal Biochem](#), 1984, 143: 39–45
- 54 Manabe T, Jin Y. Analysis of protein/polypeptide interactions in human plasma using nondenaturing micro-2-DE followed by 3-SDS-PAGE

- and MS. [Electrophoresis](#), 2007, 28: 2065–2079
- 55 Chen S, Wen M, Bu S, et al. Global mapping of rat plasma proteins with a native proteomic approach using nondenaturing micro 2DE and quantitative LC-MS/MS. [Electrophoresis](#), 2016, 37: 3126–3136
- 56 Wang X, Chen G, Liu H, et al. Four-dimensional orthogonal electrophoresis system for screening protein complexes and protein-protein interactions combined with mass spectrometry. [J Proteome Res](#), 2010, 9: 5325–5334
- 57 Wang X, Li F, Song G, et al. Broad-spectrum four-dimensional orthogonal electrophoresis: a novel comprehensively feasible system for protein complexomics investigation. [Mol Cell Proteomics](#), 2012, 11: 786–799
- 58 Roelofs J, Supphiah A, Waite K A, et al. Native gel approaches in studying proteasome assembly and chaperones. *Methods Mol Biol*, 2018, 1844: 237–260
- 59 Li C, Arakawa T. Application of native polyacrylamide gel electrophoresis for protein analysis: bovine serum albumin as a model protein. [Int J Biol Macromolecules](#), 2019, 125: 566–571
- 60 Ganapathy-Kanniappan S. pI determination of native proteins in biological samples. [CP Protein Sci](#), 2019, 96: e85
- 61 Xue Y, Hu H L. Application of electrophoresis in the identification of crop varieties (in Chinese). *J Northwest A&F Univ (Nat Sci)*, 2003: 197–201 [薛雁, 胡辉林. 电泳技术在作物品种鉴定中的应用. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2003: 197–201]
- 62 Reichel C. Practicing IEF-PAGE of EPO: the impact of detergents and sample application methods on analytical performance in doping control. [Drug Test Anal](#), 2010, 2: 603–619
- 63 Hegen H, Zinganell A, Auer M, et al. The clinical significance of single or double bands in cerebrospinal fluid isoelectric focusing. a retrospective study and systematic review. [PLoS ONE](#), 2019, 14: e0215410
- 64 Moritz C P. 40 years Western blotting: a scientific birthday toast. [J Proteomics](#), 2020, 212: 103575
- 65 Matsumoto H, Haniu H, Kurien B T, et al. Two-dimensional gel electrophoresis by glass tube-based IEF and SDS-PAGE. *Methods Mol Biol*, 2019, 1855: 107–113
- 66 Massi G, Fabiano A, Ragusa D, et al. Characterization of α -1-antitrypsin by isoelectric focusing on an ultrathin polyacrylamide gel layer. [Hum Genet](#), 1979, 53: 91–95
- 67 Boutin B, Feng S H, Arnaud P. The genetic polymorphism of α 2-hs glycoprotein: study by ultrathin-layer isoelectric focusing and immunoblot. *Am J Hum Genet*, 1985, 37: 1098–1105
- 68 Stastná M, Slais K. Two-dimensional gel isoelectric focusing. [Electrophoresis](#), 2005, 26: 3586–3591
- 69 Liu J F, Sun Z X. Application of blue native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) to the study of multiprotein complexes (in Chinese). *Mil Med Sci*, 2010, 34: 191–194 [刘金凤, 孙志贤. 蓝色非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳系统在多蛋白质复合物研究中的应用. 军事医学科学院院刊, 2010, 34: 191–194]
- 70 Juszczuk I M, Rychter A M. BN-PAGE analysis of the respiratory chain complexes in mitochondria of cucumber MSC16 mutant. [Plant Physiol Biochem](#), 2009, 47: 397–406
- 71 Arndt C, Koristka S, Bartsch H, et al. Native polyacrylamide gels. *Methods Mol Biol*, 2012, 869: 49–53
- 72 Meng Q S, Zhang G X, Pan Y H. The technology and the application of native polyacrylamide gel electrophoresis in protein complex research (in Chinese). *Biotechnol Bull*, 2010: 57–64 [孟庆石, 张光祥, 潘映红. 蛋白质复合物非变性凝胶电泳技术及其应用新进展. 生物技术通报, 2010: 57–64]
- 73 Heuberger E H M L, Veenhoff L M, Duurkens R H, et al. Oligomeric state of membrane transport proteins analyzed with blue native electrophoresis and analytical ultracentrifugation. [J Mol Biol](#), 2002, 317: 591–600
- 74 Thines B, Katsir L, Melotto M, et al. JAZ repressor proteins are targets of the SCFCOII complex during jasmonate signalling. [Nature](#), 2007, 448: 661–665
- 75 Suorsa M, Sirpiö S, Aro E M. Towards characterization of the chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex. [Mol Plant](#), 2009, 2: 1127–1140
- 76 Desprez T, Juraniec M, Crowell E F, et al. Organization of cellulose synthase complexes involved in primary cell wall synthesis in *Arabidopsis thaliana*. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2007, 104: 15572–15577
- 77 Strecker V, Wumaier Z, Wittig I, et al. Large pore gels to separate mega protein complexes larger than 10 MD by blue native electrophoresis: isolation of putative respiratory strings or patches. [Proteomics](#), 2010, 10: 3379–3387
- 78 Lu J, Zhou Y, Wei Z H, et al. Establishment of improved blue native PAGE and analysis for native structure of botulinum toxin type A for injection (in Chinese). *Pharm Biotechnol*, 2019, 26: 217–222 [陆俭, 周易, 魏子昊, 等. 改良Blue Native PAGE方法的建立及对注射用A型肉

- 毒毒素活性药用成分天然结构的分析. 药物生物技术, 2019, 26: 217–222]
- 79 Gorka M, Swart C, Siemiatkowska B, et al. Protein complex identification and quantitative complexome by CN-PAGE. *Sci Rep*, 2019, 9: 11523
- 80 Umetani I, Kunugi M, Yokono M, et al. Evidence of the supercomplex organization of photosystem II and light-harvesting complexes in *Nannochloropsis granulata*. *Photosynth Res*, 2018, 136: 49–61
- 81 Krause F. Detection and analysis of protein-protein interactions in organellar and prokaryotic proteomes by native gel electrophoresis: (membrane) protein complexes and supercomplexes. *Electrophoresis*, 2006, 27: 2759–2781
- 82 Lucker B, Schwarz E, Kuhlert S, et al. Spectroanalysis in native gels (SING): rapid spectral analysis of pigmented thylakoid membrane complexes separated by CN-PAGE. *Plant J*, 2017, 92: 744–756
- 83 Newell C, Khan A, Sinasac D, et al. Hybrid gel electrophoresis using skin fibroblasts to aid in diagnosing mitochondrial disease. *Neurol Genet*, 2019, 5: e336
- 84 Lerouxel O, Cavalier D M, Liepman A H, et al. Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides—a complex process. *Curr Opin Plant Biol*, 2006, 9: 621–630
- 85 Dieguez-Casal E, Freixeiro P, Costoya L, et al. High resolution clear native electrophoresis is a good alternative to blue native electrophoresis for the characterization of the *Escherichia coli* membrane complexes. *J Microbiol Methods*, 2014, 102: 45–54
- 86 Li F H. Analysis of *Streptomyces coelicolor* membrane proteome and characteration of several lipoproteins (in Chinese). Dissertation for Doctoral Degree. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2015 [李福后. 天蓝色链霉菌膜蛋白复合物及部分脂蛋白功能的研究. 博士学位论文. 上海: 上海交通大学, 2015]
- 87 Shukolyukov S A. Proof of oligomeric state of frog rhodopsin: visualization of dimer and oligomers on gels after BN- and HRCN-PAGE using antibodies to rhodopsin and by retinylpsin fluorescence. *Biochem Moscow*, 2010, 75: 1045–1051
- 88 Hara T, Shibata Y, Amagai R, et al. Use of in-gel peroxidase assay for cytochrome *c* to visualize mitochondrial complexes III and IV. *Biol Open*, 2019, 9: bio.047936
- 89 Ladig R, Sommer M S, Hahn A, et al. A high-definition native polyacrylamide gel electrophoresis system for the analysis of membrane complexes. *Plant J*, 2011, 67: 181–194
- 90 Schwarz E, Blanchard G. Separation of spinach thylakoid protein complexes by native green gel electrophoresis and band characterization using time-correlated single photon counting. *J Vis Exp*, 2019, doi: 10.3791/58470
- 91 Teo A C K, Lee S C, Pollock N L, et al. Analysis of SMALP co-extracted phospholipids shows distinct membrane environments for three classes of bacterial membrane protein. *Sci Rep*, 2019, 9: 1813
- 92 Lee S C, Knowles T J, Postis V L G, et al. A method for detergent-free isolation of membrane proteins in their local lipid environment. *Nat Protoc*, 2016, 11: 1149–1162
- 93 Jamshad M, Grimard V, Idini I, et al. Structural analysis of a nanoparticle containing a lipid bilayer used for detergent-free extraction of membrane proteins. *Nano Res*, 2015, 8: 774–789
- 94 Manabe T, Jin Y. Noncovalent interactions in human plasma proteins analyzed by the comparison of nondenaturing and denaturing micro-2-D gel electrophoresis patterns after polypeptide assignment using matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry and peptide mass fingerprinting. *Electrophoresis*, 2008, 29: 2672–2688
- 95 Jin Y, Bu S, Zhang J, et al. Native protein mapping and visualization of protein interactions in the area of human plasma high-density lipoprotein by combining nondenaturing micro 2DE and quantitative LC-MS/MS. *Electrophoresis*, 2014, 35: 2055–2064
- 96 Bu S J. Interaction Proteomics Strategy based on nondenaturing micro 2DE-Grid gel cutting-quantitation LC-MS/MS and human plasma proteins analysis (in Chinese). Dissertation for Master's Degree. Guangzhou: South China University of Technology, 2015 [步淑杰. 基于非变性微型2DE-网格凝胶切取—定量LC-MS/MS蛋白质相互作用组学方法的建立及人类血浆蛋白质的分析. 硕士学位论文. 广州: 华南理工大学, 2015]
- 97 Wang X D. Four-dimensional orthogonal electrophoresis system for investigation of protein complex structures and protein- protein interactions (in Chinese). Dissertation for Doctoral Degree. Beijing: Peking Union Medical College, 2012 [王晓东. 蛋白质复合体及蛋白质相互作用研究新策略——四维正交凝胶电泳系统(4-DES, BS4-DES). 博士学位论文. 北京: 北京协和医学院, 2012]
- 98 Dresler J, Klimentova J, Stulik J. Bacterial protein complexes investigation using blue native PAGE. *Microbiol Res*, 2011, 166: 47–62
- 99 D'Amici G M, Rinalducci S, Zolla L. Depletion of hemoglobin and carbonic anhydrase from erythrocyte cytosolic samples by preparative clear native electrophoresis. *Nat Protoc*, 2012, 7: 36–44

- 100 Daury L, Orange F, Taveau J C, et al. Tripartite assembly of RND multidrug efflux pumps. *Nat Commun*, 2016, 7: 10731
- 101 Wen M, Jin Y, Manabe T, et al. A comparative analysis of human plasma and serum proteins by combining native PAGE, whole-gel slicing and quantitative LC-MS/MS: utilizing native MS-electropherograms in proteomic analysis for discovering structure and interaction-correlated differences. *Electrophoresis*, 2017, 38: 3111–3123
- 102 Zhang Y, Zhou J, Ardejani M, et al. Designability of aromatic interaction networks at *E.coli* bacterioferritin B-type channels. *Molecules*, 2017, 22: 2184
- 103 Nair D, Krishna J G, Panikkar M V N, et al. Identification, purification, biochemical and mass spectrometric characterization of novel phycobiliproteins from a marine red alga, *Centroceras clavulatum*. *Int J Biol Macromol*, 2018, 114: 679–691
- 104 Sbardella D, Tundo G R, Coletta A, et al. The insulin-degrading enzyme is an allosteric modulator of the 20S proteasome and a potential competitor of the 19S. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75: 3441–3456
- 105 Zhang X, Ding X, Zhu Y, et al. Structural and functional characterization of HIV-1 cell fusion inhibitor T20. *AIDS*, 2019, 33: 1–11
- 106 Pinto A F, Nascimento J M, Sobral R V S, et al. Tannic acid as a precipitating agent of human plasma proteins. *Eur J Pharm Sci*, 2019, 138: 105018
- 107 Singh R S, Walia A K, Kennedy J F. Purification and characterization of a heterodimeric mycelial lectin from *Penicillium proteolyticum* with potent mitogenic activity. *Int J Biol Macromolecules*, 2019, 128: 124–131
- 108 Ghosh K K, Prakash A, Dhara A, et al. Role of supramolecule erpy-like lipoprotein of *Leptospira* in thrombin-catalyzed fibrin clot inhibition and binding to complement factors H and I, and its diagnostic potential. *Infect Immun*, 2019, 87: e00536-00519
- 109 Anandharaj M, Lin Y J, Rani R P, et al. Constructing a yeast to express the largest cellulosome complex on the cell surface. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117: 2385–2394
- 110 Van Bergen N J, Guo Y, Al-Deri N, et al. Deficiencies in vesicular transport mediated by TRAPPC4 are associated with severe syndromic intellectual disability. *Brain*, 2020, 143: 112–130
- 111 Oppermann S, Höfflin S, Friedrich T. ErpA is important but not essential for the Fe/S cluster biogenesis of *Escherichia coli* NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Biochim Biophys Acta Bioenerg*, 2020, 1861: 148286
- 112 Yang L A, Wang J, Toufeeq S, et al. Identification of FerLCH, isolation of ferritin and functional analysis related to interaction with pathogens in Eri-silkworm, *Samia cynthia ricini*. *Arch Insect Biochem Physiol*, 2020, 104: e21659
- 113 Loi M, De Leonardi S, Mulè G, et al. A novel and potentially multifaceted dehydroascorbate reductase increasing the antioxidant systems is induced by beauvericin in tomato. *Antioxidants*, 2020, 9: 435
- 114 Bhaduri S, Singh S K, Cohn W, et al. A novel chloroplast super-complex consisting of the ATP synthase and photosystem I reaction center. *PLoS ONE*, 2020, 15: e0237569
- 115 Cruz Rodriguez A, Sánchez Esperanza F A, Pérez-Campos E, et al. Aggregation and molecular properties of β -glucosidase isoform II in Chayote (*Sechium edule*). *Molecules*, 2020, 25: 1699
- 116 Ali M F, Kaushik A, Gupta D, et al. Changes in strand 6B and helix B during neuroserpin inhibition: implication in severity of clinical phenotype. *Biochim Biophys Acta*, 2020, 1868: 140363
- 117 Park Y, Lee S, Kang H, et al. A classical swine fever virus E2 fusion protein produced in plants elicits a neutralizing humoral immune response in mice and pigs. *Biotechnol Lett*, 2020, 42: 1247–1261
- 118 Vitt S, Prinz S, Hellwig N, et al. Molecular and low-resolution structural characterization of the Na^+ -translocating glutacetyl-CoA decarboxylase from *Clostridium symbiosum*. *Front Microbiol*, 2020, 11: 480
- 119 Hammack L J, Panfair D, Kusmierczyk A R. A novel proteasome assembly intermediate bypasses the need to form α -rings first. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 525: 107–112
- 120 Ahmed Bhat E, Sajjad N, Ahmad Tantray J, et al. *In vitro* complex formation of human PYRIN domain-only protein 3 prevented by self-oligomerization of ASC PYD domain. *Saudi J Biol Sci*, 2021, 28: 1607–1614
- 121 Maddur A A, Voehler M, Panizzi P, et al. Mapping of the fibrinogen-binding site on the staphylocoagulase C-terminal repeat region. *J Biol Chem*, 2022, 298: 101493
- 122 Suorsa M, Rantala M, Mamedov F, et al. Light acclimation involves dynamic re-organization of the pigment-protein megacomplexes in non-appressed thylakoid domains. *Plant J*, 2015, 84: 360–373
- 123 Constantine M, Liew C K, Lo V, et al. Heterologously-expressed and liposome-reconstituted human Transient Receptor Potential Melastatin 4

- Channel (TRPM4) is a functional tetramer. [Sci Rep](#), 2016, 6: 19352
- 124 Hakamada K, Watanabe H, Kawano R, et al. Expression and characterization of the *Plasmodium* translocon of the exported proteins component EXP2. [Biochem Biophys Res Commun](#), 2017, 482: 700–705
- 125 Chen L J, Li H M. Stable megadalton TOC-TIC supercomplexes as major mediators of protein import into chloroplasts. [Plant J](#), 2017, 92: 178–188
- 126 Straub I R, Janer A, Weraarpachai W, et al. Loss of CHCHD10-CHCHD2 complexes required for respiration underlies the pathogenicity of a CHCHD10 mutation in ALS. [Hum Mol Genet](#), 2018, 27: 178–189
- 127 Mary C, Fouillen A, Bessette B, et al. Interaction via the N terminus of the type IV secretion system (T4SS) protein VirB6 with VirB10 is required for VirB2 and VirB5 incorporation into T-pili and for T4SS function. [J Biol Chem](#), 2018, 293: 13415–13426
- 128 Stephan G, Huang L, Tang Y, et al. The ASIC3/P2X3 cognate receptor is a pain-relevant and ligand-gated cationic channel. [Nat Commun](#), 2018, 9: 1354
- 129 Huang C, Li Z R, Yu Q B, et al. MORF2 tightly associates with MORF9 to regulate chloroplast RNA editing in *Arabidopsis*. [Plant Sci](#), 2019, 278: 64–69
- 130 Rao V K, Zavala G, Deb Roy A, et al. A pH-sensitive luminal His-cluster promotes interaction of PAM with V-ATPase along the secretory and endocytic pathways of peptidergic cells. [J Cell Physiol](#), 2019, 234: 8683–8697
- 131 Wang X, Shang Y, Chen C, et al. Baculovirus per os infectivity factor complex: components and assembly. [J Virol](#), 2019, 93: e02053-02018
- 132 Lambert J P, Luongo T S, Tomar D, et al. MCUB regulates the molecular composition of the mitochondrial calcium uniporter channel to limit mitochondrial calcium overload during stress. [Circ](#), 2019, 140: 1720–1733
- 133 Lopez-Font I, Boix C P, Zetterberg H, et al. Characterization of cerebrospinal fluid BACE1 species. [Mol Neurobiol](#), 2019, 56: 8603–8616
- 134 Dibley M G, Formosa L E, Lyu B, et al. The mitochondrial acyl-carrier protein interaction network highlights important roles for LYRM family members in complex I and mitoribosome assembly. [Mol Cell Proteomics](#), 2020, 19: 65–77
- 135 Nie Y, Bai F, Chaudhry M A, et al. The Na/K-ATPase α 1 and c-Src form signaling complex under native condition: a crosslinking approach. [Sci Rep](#), 2020, 10: 6006
- 136 Qi Y, Wang X, Lei P, et al. The chloroplast metalloproteases VAR2 and EGY1 act synergistically to regulate chloroplast development in *Arabidopsis*. [J Biol Chem](#), 2020, 295: 1036–1046
- 137 Padhan D K, Sengupta A, Patra M, et al. CCN6 regulates mitochondrial respiratory complex assembly and activity. [FASEB J](#), 2020, 34: 12163–12176
- 138 Huang G, Docampo R. The mitochondrial calcium uniporter interacts with subunit c of the atp synthase of trypanosomes and humans. [mBio](#), 2020, 11: e00268-00220
- 139 Miyagishi H, Tsuji M, Miyagawa K, et al. Characterization of 5-HT1A receptor and transport protein KIF13A expression in the hippocampus of stress-adaptive and -maladaptive mice. [Neur Lett](#), 2020, 733: 135082
- 140 Zhu B, Feng Z, Guo Y, et al. F0F1 ATP synthase regulates extracellular calcium influx in human neutrophils by interacting with Cav2.3 and modulates neutrophil accumulation in the lipopolysaccharide-challenged lung. [Cell Commun Signal](#), 2020, 18: 19
- 141 Gazizova N, Rakhmatullina D, Minibayeva F. Effect of respiratory inhibitors on mitochondrial complexes and ADP/ATP translocators in the *Triticum aestivum* roots. [Plant Physiol Biochem](#), 2020, 151: 601–607
- 142 Hata S, Doi N, Shinkai-Ouchi F, et al. A muscle-specific calpain, CAPN3, forms a homotrimer. [Biochim Biophys Acta](#), 2020, 1868: 140411
- 143 Ishikawa N, Yokoe Y, Nishimura T, et al. PsbQ-like protein 3 functions as an assembly factor for the chloroplast NADH dehydrogenase-like complex in *Arabidopsis*. [Plant Cell Physiol](#), 2020, 61: 1252–1261
- 144 Alansary D, Peckys D B, Niemeyer B A, et al. Detecting single ORAI1 proteins within the plasma membrane reveals higher order channel complexes. [J Cell Sci](#), 2019, 133: jcs.240358
- 145 Hasan B, Khan A, Lenz C, et al. Characterization of functional protein complexes from Alzheimer's disease and healthy brain by mass spectrometry-based proteome analysis. [Sci Rep](#), 2021, 11: 13891
- 146 Hevler J F, Lukassen M V, Cabrera-Orefice A, et al. Selective cross-linking of coinciding protein assemblies by in-gel cross-linking mass spectrometry. [EMBO J](#), 2021, 40: e106174
- 147 Fedotovskaya O, Albertsson I, Nordlund G, et al. Identification of a cytochrome *bc*1-*aa*3 supercomplex in *Rhodobacter sphaeroides*. [Biochim Biophys Acta Bioenerg](#), 2021, 1862: 148433

- 148 Ji Y, Lehotai N, Zan Y, et al. A fully assembled plastid-encoded RNA polymerase complex detected in etioplasts and proplastids in *Arabidopsis*. [Physiol Plantarum](#), 2021, 171: 435–446
- 149 Razi K, Bae D W, Muneer S. Target-based physiological modulations and chloroplast proteome reveals a drought resilient rootstock in okra (*Abelmoschus esculentus*) genotypes. [Int J Mol Sci](#), 2021, 22: 12996
- 150 Wu G, Ma L, Yuan C, et al. Formation of light-harvesting complex II aggregates from LHCII-PSI-LHCI complexes in rice plants under high light. [J Exp Bot](#), 2021, 72: 4938–4948
- 151 Cogliati S, Herranz F, Ruiz-Cabello J, et al. Digitonin concentration is determinant for mitochondrial supercomplexes analysis by BlueNative page. [Biochim Biophys Acta Bioenerg](#), 2021, 1862: 148332
- 152 Kanna S D, Domonkos I, Kóbori T O, et al. Salt stress induces paramylon accumulation and fine-tuning of the macro-organization of thylakoid membranes in *Euglena gracilis* cells. [Front Plant Sci](#), 2021, 12: 725699
- 153 Rai A K, Spolaore B, Harris D A, et al. Ectopic F0F1 ATP synthase contains both nuclear and mitochondrially-encoded subunits. [J Bioenerg Biomembr](#), 2013, 45: 569–579
- 154 Kato Y, Sakamoto W. Phosphorylation of the chloroplastic metalloprotease FtsH in *Arabidopsis* characterized by Phos-Tag SDS-PAGE. [Front Plant Sci](#), 2019, 10: 1080
- 155 Cuillerier A, Burelle Y. Hybrid clear/blue native electrophoresis for the separation and analysis of mitochondrial respiratory chain supercomplexes. [J Vis Exp](#), 2019, doi: 10.3791/59294
- 156 Rodríguez-Bolaños M, Miranda-Astudillo H, Pérez-Castañeda E, et al. Native aggregation is a common feature among triosephosphate isomerases of different species. [Sci Rep](#), 2020, 10: 1338
- 157 Calvaruso C, Rokka A, Aro E M, et al. Specific Lhc proteins are bound to PSI or PSII supercomplexes in the Diatom *Thalassiosira pseudonana*. [Plant Physiol](#), 2020, 183: 67–79
- 158 Kameo S, Aso M, Furukawa R, et al. Substitution of deoxycholate with the amphiphilic polymer amphipol A8-35 improves the stability of large protein complexes during native electrophoresis. [Plant Cell Physiol](#), 2021, 62: 348–355
- 159 Nagao R, Yokono M, Ueno Y, et al. Basic pH-induced modification of excitation-energy dynamics in fucoxanthin chlorophyll *a/c*-binding proteins isolated from a pinguiphyte, *Glossomastix chrysoplata*. [Biochim Biophys Acta Bioenerg](#), 2021, 1862: 148306
- 160 Aso M, Matsumae R, Tanaka A, et al. Unique peripheral antennas in the photosystems of the streptophyte alga *Mesostigma viride*. [Plant Cell Physiol](#), 2021, 62: 436–446
- 161 Freixeiro P, Diéguez-Casal E, Costoya L, et al. High resolution clear native electrophoresis (hrCNE) allows a detailed analysis of the heterotrimeric structure of recombinant *Neisseria meningitidis* porins inserted into liposomes. [J Proteome Res](#), 2013, 12: 777–784
- 162 Roehrkasse A M, Warner M L, Booe J M, et al. Biochemical characterization of G protein coupling to calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin receptors using a native PAGE assay. [J Biol Chem](#), 2020, 295: 9736–9751
- 163 Ansari F, Yoval-Sánchez B, Niatsetskeya Z, et al. Quantification of NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) content in biological samples. [J Biol Chem](#), 2021, 297: 101204
- 164 Postnikov P, Krotov G, Mesonzhnik N, et al. Fc-fragment removal allows the EPO-Fc fusion protein to be detected in blood samples by IEF-PAGE. [Drug Testing Anal](#), 2015, 7: 999–1008
- 165 Belousov P V, Afanasyeva M A, Gubernatorova E O, et al. Multi-dimensional immunoproteomics coupled with *in vitro* recapitulation of oncogenic NRASQ61R identifies diagnostically relevant autoantibody biomarkers in thyroid neoplasia. [Cancer Lett](#), 2019, 467: 96–106
- 166 Bonar E, Chlebicka K, Dubin G, et al. Application of two-dimensional difference gel electrophoresis in identification of factors responsible for virulence of staphylococcus aureus. [Methods Mol Biol](#), 2020, 2069: 139–154
- 167 Jin Y, Manabe T. Alkaline extraction of human plasma proteins from nondenaturing micro-2-D gels for protein/polypeptide mass measurement and peptide mass fingerprinting using MALDI-TOF MS. [Electrophoresis](#), 2007, 28: 449–459
- 168 Manabe T, Jin Y, Tani O. Assignment of human plasma polypeptides on a nondenaturing 2-D gel using MALDI-MS and PMF and comparisons with the results of intact protein mapping. [Electrophoresis](#), 2007, 28: 843–863
- 169 Manabe T, Jin Y. Performance of nondenaturing micro 2-DE followed by third-dimension SDS-PAGE in the analysis of *Escherichia coli* soluble proteins. [Electrophoresis](#), 2011, 32: 300–309
- 170 Jin Y, Yuan Q, Zhang J, et al. Proteomic analysis of cellular soluble proteins from human bronchial smooth muscle cells by combining nondenaturing micro 2DE and quantitative LC-MS/MS. 2. Similarity search between protein maps for the analysis of protein complexes.

- [Electrophoresis](#), 2015, 36: 1991–2001
- 171 Wiseman D N, Otchere A, Patel J H, et al. Expression and purification of recombinant G protein-coupled receptors: a review. [Protein Expr Purif](#), 2020, 167: 105524
 - 172 Zhang C, Allegretti M, Vonck J, et al. Production of fully assembled and active *Aquifex aeolicus* F1FO ATP synthase in *Escherichia coli*. [Biochim Biophys Acta Gen Subj](#), 2014, 1840: 34–40
 - 173 Korn E D. Structure of biological membranes. [Science](#), 1966, 153: 1491–1498
 - 174 Singer S J, Nicolson G L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. [Science](#), 1972, 175: 720–731
 - 175 Singer S J. A fluid lipid-globular protein mosaic model of membrane structure *. [Ann N Y Acad Sci](#), 1972, 195: 16–23
 - 176 Raices M, D'Angelo M A. Nuclear pore complex composition: a new regulator of tissue-specific and developmental functions. [Nat Rev Mol Cell Biol](#), 2012, 13: 687–699
 - 177 Grossman E, Medalia O, Zwerger M. Functional architecture of the nuclear pore complex. [Annu Rev Biophys](#), 2012, 41: 557–584
 - 178 Lin D H, Hoelz A. The structure of the nuclear pore complex (an update). [Annu Rev Biochem](#), 2019, 88: 725–783
 - 179 Gao J, Wang H, Yuan Q, et al. Structure and function of the photosystem supercomplexes. [Front Plant Sci](#), 2018, 9: 357
 - 180 Järvi S, Suorsa M, Paakkarinen V, et al. Optimized native gel systems for separation of thylakoid protein complexes: novel super- and mega-complexes. [Biochem J](#), 2011, 439: 207–214
 - 181 Kouril R, Strouhal O, Nosek L, et al. Structural characterization of a plant photosystem I and NAD(P)H dehydrogenase supercomplex. [Plant J](#), 2014, 77: 568–576
 - 182 Koochak H, Puthiyaveetil S, Mullendore D L, et al. The structural and functional domains of plant thylakoid membranes. [Plant J](#), 2019, 97: 412–429
 - 183 Schwarz E M, Tietz S, Froehlich J E. Photosystem I-LHCII megacomplexes respond to high light and aging in plants. [Photosynth Res](#), 2018, 136: 107–124
 - 184 Wang Q, Guan Z, Qi L, et al. Structural insight into the SAM-mediated assembly of the mitochondrial TOM core complex. [Science](#), 2021, 373: 1377–1381
 - 185 Gebert N, Gebert M, Oeljeklaus S, et al. Dual function of Sdh3 in the respiratory chain and TIM22 protein translocase of the mitochondrial inner membrane. [Mol Cell](#), 2011, 44: 811–818
 - 186 Gomkale R, Linden A, Neumann P, et al. Mapping protein interactions in the active TOM-TIM23 supercomplex. [Nat Commun](#), 2021, 12: 5715
 - 187 Kanji O, Shigehiko T, Yukio F. Blue native PAGE: applications to study peroxisome biogenesis. [Methods Mol Bio](#), 2017, 1595: 197–205
 - 188 Wang Y, Palmfeldt J, Gregersen N, et al. Mitochondrial fatty acid oxidation and the electron transport chain comprise a multifunctional mitochondrial protein complex. [J Biol Chem](#), 2019, 294: 12380–12391
 - 189 Matilainen O, Arpalatti L, Rantanen V, et al. Insulin/IGF-I signaling regulates proteasome activity through the deubiquitinating enzyme UBH-4. [Cell Rep](#), 2013, 3: 1980–1995
 - 190 Tomko Jr. R J, Hochstrasser M. Molecular architecture and assembly of the eukaryotic proteasome. [Annu Rev Biochem](#), 2013, 82: 415–445
 - 191 Kusmierczyk A R, Hochstrasser M. Some assembly required: dedicated chaperones in eukaryotic proteasome biogenesis. [bchm](#), 2008, 389: 1143–1151
 - 192 Bohn S, Beck F, Sakata E, et al. Structure of the 26S proteasome from *Schizosaccharomyces pombe* at subnanometer resolution. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2010, 107: 20992–20997
 - 193 Sun P, Liu M, Feng L X, et al. Progress in study of clarifying the structure and the mechanisms that regulate the activity of the proteasome (in Chinese). [Prog Biochem Biophys](#), 2015, 42: 1084–1093 [孙鹏, 刘淼, 冯利兴, 等. 蛋白酶体结构和活性调节机制的研究进展. [生物化学与生物物理进展](#), 2015, 42: 1084–1093]
 - 194 Elsasser S, Schmidt M, Finley D. Characterization of the proteasome using native gel electrophoresis. [Method Enzymol](#), 2005, 398: 353–363
 - 195 Leggett D S, Hanna J, Borodovsky A, et al. Multiple associated proteins regulate proteasome structure and function. [Mol Cell](#), 2002, 10: 495–507
 - 196 Leggett D S, Glickman M H, Finley D. Purification of proteasomes, proteasome subcomplexes, and proteasome-associated proteins from budding yeast. [Methods Mol Biol](#), 2005, 301: 57–70
 - 197 Tian G, Park S, Lee M J, et al. An asymmetric interface between the regulatory and core particles of the proteasome. [Nat Struct Mol Biol](#), 2011, 18: 1259–1267

- 198 Nickell S, Beck F, Scheres S H W, et al. Insights into the molecular architecture of the 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 11943–11947
- 199 Iwanczyk J, Sadre-Bazzaz K, Ferrell K, et al. Structure of the Bim10-20 S proteasome complex by cryo-electron microscopy. Insights into the mechanism of activation of mature yeast proteasomes. *J Mol Biol*, 2006, 363: 648–659
- 200 Scudder S L, Gonzales F R, Howell K K, et al. Altered phosphorylation of the proteasome subunit Rpt6 has minimal impact on synaptic plasticity and learning. *eNeuro*, 2021, 8: ENEURO.0073-20.2021
- 201 Park S, Roelofs J, Kim W, et al. Hexameric assembly of the proteasomal ATPases is templated through their C termini. *Nature*, 2009, 459: 866–870
- 202 Kleijnen M F, Roelofs J, Park S, et al. Stability of the proteasome can be regulated allosterically through engagement of its proteolytic active sites. *Nat Struct Mol Biol*, 2007, 14: 1180–1188
- 203 Verma R, Chen S, Feldman R, et al. Proteasomal proteomics: identification of nucleotide-sensitive proteasome-interacting proteins by mass spectrometric analysis of affinity-purified proteasomes. *Mol Biol Cell*, 2000, 11: 3425–3439
- 204 Tai H C, Besche H, Goldberg A L, et al. Characterization of the brain 26S proteasome and its interacting proteins. *Front Mol Neur*, 2010, 3
- 205 Zhao Z Y. Study of protein complexes from pancreatic cancer cell lines (in Chinese). Dissertation for Doctoral Degree. Beijing: Peking Union Medical College, 2011 [赵志云. 胰腺癌细胞系中蛋白质复合体研究. 博士学位论文. 北京: 北京协和医学院, 2011]
- 206 Liang Q, Dexheimer T S, Zhang P, et al. A selective USP1-UAF1 inhibitor links deubiquitination to DNA damage responses. *Nat Chem Biol*, 2014, 10: 298–304
- 207 Luo Y, Hara T, Ishido Y, et al. Rapid preparation of high-purity nuclear proteins from a small number of cultured cells for use in electrophoretic mobility shift assays. *BMC Immunol*, 2014, 15: 586
- 208 Karabadzha A G, Petti L M, Barrera F N, et al. Two transmembrane dimers of the bovine papillomavirus E5 oncoprotein clamp the PDGF β receptor in an active dimeric conformation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114: E7262–E7271

Recent advances in gel electrophoresis for the study of protein complexes

HAO QiChen, QIN Liang, CHEN LuLu, HU Hao, LI JinRong, LIU HaiQiang, XU HuaLei,
GUO Hua, YANG ChenYu, WU Ran, JIANG DongXu, CHEN DiFan, ZHOU YiJun &
WANG XiaoDong

Key Laboratory of Mass Spectrometry Imaging and Metabolomics (Minzu University of China), State Ethnic Affairs Commission; Centre for Imaging & Systems Biology, College of Life and Environmental Sciences, Minzu University of China, Beijing 100081, China

Protein complexes (PCs) occupy indispensable roles in cellular composition, as well as various physiological and biochemical processes. These vital functions encompass plasma membrane formation, signal transduction, antigen and antibody recognition, substance transport, energy metabolism, protein synthesis and degradation, and DNA damage repair. However, the separation and purification of PCs are crucial for comprehending their intricate structural nature and functional properties. Ensuring the structural integrity and biological activity of PCs has become a significant concern within this field. Gel electrophoresis has been extensively utilized in studying PCs due to its simplicity, operational ease, cost-effectiveness, and high efficiency. In this review, we comprehensively examine non-denaturing gel electrophoresis techniques and various electrophoresis cascade methods, elucidating their respective attributes and associated technical procedures, all of which are suitable for studying PCs. This review provides a robust theoretical foundation, serving as a valuable technical resource for the efficient isolation of PCs. Additionally, it systematically evaluates the progress made in research involving cellular, extracellular, and non-cellular PCs, based on the aforementioned technologies. Despite significant advancements achieved through gel electrophoresis, there remains ample room for further development. Future directions in this technology involve customization, modularization, miniaturization, and automation, which emerge as primary trends shaping its evolution. Through progressive advancements in gel electrophoresis and synergistic integration of complementary techniques, our comprehension of PCs is destined to reach uncharted depths. The remarkable evolution of gel electrophoresis, coupled with synergistic technologies, will undeniably propel our understanding of PCs toward new frontiers.

gel electrophoresis, protein complex, native, separation and purification, interactive protein

doi: [10.1360/SSV-2023-0124](https://doi.org/10.1360/SSV-2023-0124)