

聚丙烯酰胺凝胶的蛋白质荧光染色法

梁念慈 康景轩

(湛江医学院生化教研室)

十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 经常用于分离、鉴定蛋白质, 测定肽链分子量。蛋白质在聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 一般用考马斯亮蓝法染色^[1], 其优点是操作简易, 灵敏度较高。据我们的经验, 最低检出量约为每一蛋白带 $0.5\mu\text{g}$ 。此法的缺点是费时, 染色及脱色要一昼夜, 且染色后, 许多蛋白质丧失抗原性及其它生物学活性。最近我们研究出蛋白质 PAGE 的荧光染色法, 蛋白质样品在上胶前用荧光素标记, 电泳后可立即在紫外光灯下看到清晰的蛋白带, 其灵敏度不低于考马斯亮蓝法。现介绍如下。

一、样品的荧光标记

蛋白质样品用牛血清白蛋白 (68,000)、卵白蛋白 (44,000)、肌红蛋白 (16,800)、溶菌酶 (14,600) 的混合溶液。蛋白质浓度为每 $10\mu\text{l}$ 含上述蛋白质各 $1\mu\text{g}$ ($0.1\mu\text{g}/\mu\text{l}$)。分别取蛋白混合液 $20\mu\text{l}$ 、 $10\mu\text{l}$ 、 $5\mu\text{l}$ 与用 1M NaHCO_3 配制的异硫氰酸荧光素 (Fluorescein isothiocyanate FITC) 溶液 ($2\text{mg}/\text{ml}$) 对半体积 ($10\mu\text{l}$ 、 $5\mu\text{l}$ 、 $2.5\mu\text{l}$) 混合于小试管中, 混匀, 置室温下反应 2 小时 (或在 4°C 冰箱中过夜更佳), 然后于加样前加入等体积 ($30\mu\text{l}$ 、 $15\mu\text{l}$ 、 $7.5\mu\text{l}$) 样品缓冲液, 置沸水浴中二分钟以中止反应并使亚基解离。样品缓冲液的组成为 Tris-HCl 250mM , 甘油 25%, SDS 86mM , 2-巯基乙醇 320mM , 溴酚蓝 0.003%, pH 6.8。

二、电泳

用垂直板 ($15 \times 10\text{cm}$) 电泳。凝胶厚度为 1.5mm , 浓缩胶 (3%) 分离胶 (12%) 均含 0.1% SDS, 按 Laemmli 等的方法配制^[2]。样品瓶容积约为 $100\mu\text{l}$ 。电极缓冲液 2 升, 含甘氨酸 28 克, Tris 6 克, SDS 2 克, 电泳约进行 5 小时, 维持电流 40—50mA。

三、观察结果

电泳后, 拆去玻璃板, 在紫外灯 (8200 型、波长 $2537\text{\AA}$) 下可观察到 4 条荧光带。蛋白含量各为 $0.5\mu\text{g}$

以上者清晰可见。未与蛋白质结合的荧光素 (FITC) 在前沿线形成一条荧光带 (见封三图 1)。

凝胶可摄影, 亦可放在 30% 甲醇溶液中固定, 并洗去未结合的 FITC。蛋白质荧光带至少在 4 天内保持稳定。

四、考马斯亮蓝法染色对比

电泳过程及方法与上述一样。电泳样品中的蛋白量及样品缓冲液与上同, 但上述的异硫氰酸荧光素溶液用蒸馏水代替。

电泳后用 0.25% 考马斯亮蓝 R-250 的 10% 醋酸-45% 甲醇溶液染色 4 小时, 然后用 10% HAc-45% 甲醇三次脱色各一小时, 最后用 10% HAc 溶液脱色过夜。结果可见 4 条蓝色蛋白带, 其灵敏度和荧光染色法大致相同或略低 (见图 1)。

五、讨论

荧光染色法的优点是省时间, 电泳结束立即可见结果, 且染色后的蛋白质仍保持抗原性; 可进行抗原抗体反应, 亦可作糖蛋白染色或切下来作其他试验。

FITC 与蛋白质的反应是使荧光基团共价地与氨基结合, 极少数不含有由氨基的小分子肽可能漏检。蛋白带的荧光强弱取决于所含氨基的多少, 对不同种类蛋白质, 不宜用此法作定量测定。同时, 蛋白质溶液不应含有带氨基的缓冲剂如 Tris (可透析除去)。蛋白质与 FITC 的结合物在酸性条件下不稳定, 故电泳后凝胶不可用含 HAc 的溶液固定或漂洗。我们认为, 荧光染色法与考马斯亮蓝染色法各有长短, 在许多情况下荧光染色法更好。

参考文献

- [1] Weber, K. et al.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406, 1969.
- [2] Laemmli, UK., et al.: *J. Mol. Biol.*, **80**, 575, 1973.

[本文于 1985 年 6 月 17 日收到]

曹锡清等：《老化红细胞膜的脂质及蛋白质变化》一文的图 1、2

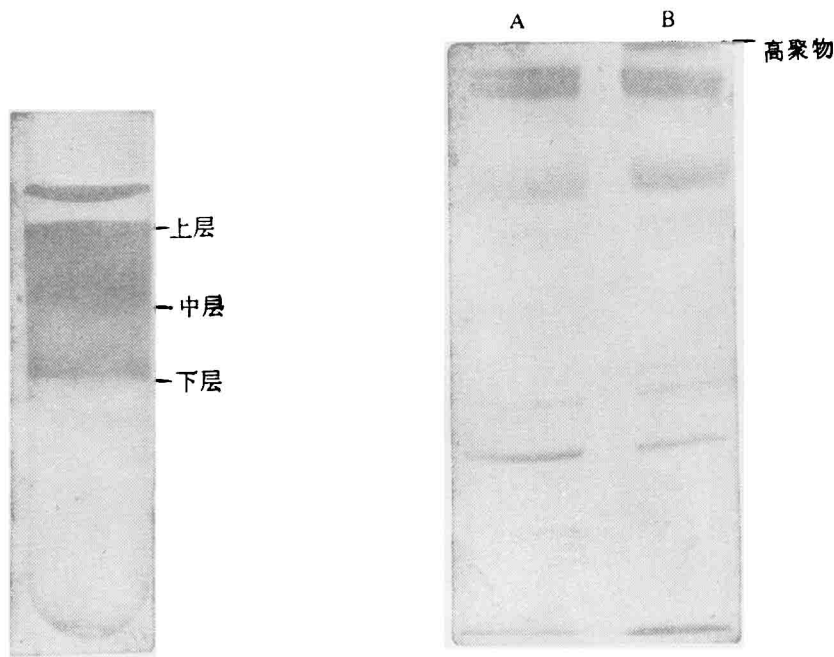


图 1 红细胞密度梯度离心结果

图 2 SDS-PAGE 图谱

A——年轻红细胞膜
B——老化红细胞膜

梁念慈等：《聚丙烯酰胺凝胶的蛋白质荧光染色法》一文的图 1

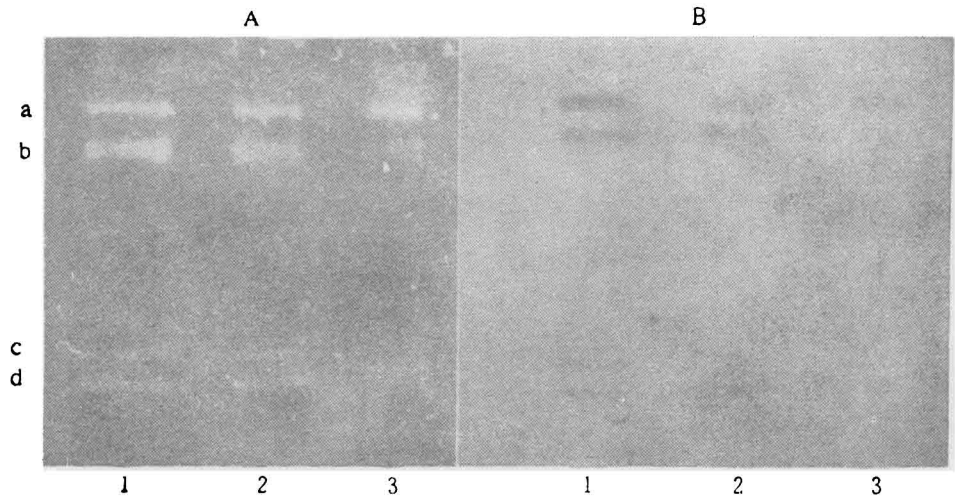


图 1 荧光染色法(A)和考马斯亮蓝染色法(B)的对比

a. 牛血清白蛋白。b. 卵白蛋白。c. 肌红蛋白。d. 溶菌酶。1, 2, 3 行含各种蛋白质分别为 $2\mu\text{g}$, $1\mu\text{g}$ 和 $0.5\mu\text{g}$