

O'Farrell 电泳的显示方法

刘亚霞 陈 勇 张明伟 姚志建

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京)

提 要

本文对 O'Farrell 电泳的显示方法做了比较, 特别对荧光谱技术的实际操作步骤进行了探讨。在考马斯亮蓝染色、银染、放射自显影及荧光谱四种方法中, 荧光谱是最为灵敏的方法之一, 且其结果显示时间较之放射自显影又大大缩短。

O'Farrell 电泳技术^[1], 即第一向为等电聚焦 (IEF)、第二向为十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 的双向电泳, 自问世以来已被公认为一种高分辨率的电泳技术, 在基因表达、遗传变异和癌变过程等研究中已有广泛的应用^[2]。

O'Farrell 电泳是目前所用的蛋白质电泳技术中一种操作最为繁杂的方法。我们在用其分析培养细胞的裂解物时, 曾比较仔细地观察过它的分辨能力及操作方法, 特别是两向之间的衔接, 所得结果堪称满意。本文进一步比较了它的几种显示方法, 尤其是荧光谱^[3]的应用, 根据我们的实践提出了其最佳的应用条件, 并在作操中尽可能多地使用了国产材料。

材 料 和 方 法

1. O'Farrell 电泳及细胞裂解物的制备 按照文献[1]的方法进行。所用的电泳电源为北京分析仪器配件厂生产的三恒电源。

2. 银染显色法及考马斯亮蓝显色法 按照文献[4]的方法进行。

3. 同位素掺入

试剂: (1) 1640 细胞培养液 按细胞培养常规方法配制。(2) DL-¹⁴C-亮氨酸 购自中国医学科学院放射医学研究所。

操作: 将 M12.4.1 小鼠 B 细胞用无亮氨酸的细胞培养液洗两遍, 分装入塑料离心管

(0.5ml 规格), 每管 0.2ml (含 1×10^5 个细胞), 然后加入 $10 \mu\text{l}$ ($2.5 \mu\text{Ci}$) ¹⁴C-亮氨酸, 将管口密封, 在 37℃ 温箱放置 22 小时。温育完毕, 即将细胞用生理盐水洗三次, 然后破碎。

4. 蛋白质定量 采用考马斯亮蓝结合法, 见文献[5]。

5. 液体闪烁测定

试剂: 闪烁液 称取 5.0 克 PPO (2, 5-二苯基噁唑, 上海试剂一厂), 0.5 克 POPOP [1, 4-双-2(5-苯基噁唑基) 苯, 上海试剂一厂], 80 克 萘, 385ml 二甲苯, 385ml 1, 4-二氧六环, 230ml 无水乙醇, 置磁力搅拌器上混匀。

操作: 取 5—10 μl 破碎细胞悬液放入含 6.0ml 闪烁液的瓶中, 在液体闪烁谱仪 (LKB 公司, 1215 Rackbeta II 型号) 上测定同位素掺入量。

6. 荧光谱

试剂: (1) 二甲基亚砜 (DMSO, 北京化工厂产品), (2) 17% PPO-DMSO 溶液 称取 17 克 PPO, 直接溶于 50ml DMSO 溶液中, 加温助溶直至澄清, 放暗处保存。(3) 显影液 称取米吐尔 2.2 克, 无水亚硫酸钠 72 克, 对苯二酚 8.8 克, 无水碳酸钠 48 克, 溴化钾 4 克, 按此顺序加入 800ml 蒸馏水 (35—45℃) 中, 待前一种试剂完全溶解后, 再加入下一种试剂, 避免出现沉淀。(4) 停影液 取 98% 冰醋酸 15ml, 加水至 1000ml。(5) 定影液 称取海波 240

克,无水亚硫酸钠 15 克, 98% 冰醋酸 15ml, 硼酸 7.5 克, 钾明矾 15 克, 按此顺序加入 650ml 蒸馏水(35—40℃)中, 配法同显影液。

操作: 第二向电泳完毕后, 用 50% 甲醇-12% 醋酸固定过夜(也可直接用 DMSO 溶液浸泡^[2]), 然后换 DMSO 溶液浸泡两次, 每次至少 30 分钟, 最后用 17% PPO-DMSO 溶液浸泡至少 3 小时, 注意此步应放暗处。浸泡完毕, 将胶迅速放入蒸馏水中浸泡 15 分钟, 此时 PPO 析出, 胶呈白色不透明, 换水再浸泡 15 分钟, 可用流动自来水^[2] 将白色析出物冲去。而后将胶干燥, 将干燥后的电泳胶与医用 X 光片一起放入暗盒, -70℃ 曝光 3—5 天。

结果与讨论

1. ¹⁴C-亮氨酸的掺入

荧光谱方法的成功与否, 决定于同位素的掺入量, 若想得到掺入率高的样品, 首先要从培养细胞入手, 细胞的质量、数量直接与掺入率有关, 此外掺入时间、掺入剂量均可影响掺入效果。为此, 我们分别摸了如下条件。

(1) 合理的细胞数

确定细胞数的前提是测出细胞中蛋白含量。如能用较少细胞达到高掺入的效果, 就可提高方法的灵敏度。银染方法使用 30 μg 蛋白可得到满意结果, 荧光谱法如能用少于 30 μg 的蛋白样品得到更多的蛋白谱带, 则说明其有更高的灵敏度。为此我们测定了细胞数与蛋白含量之间的大致关系(见表 1), 确定使用 1×10^5 个细胞。

表 1 细胞数与蛋白含量的关系

	1×10^5 个细胞	1×10^6 个细胞	1×10^7 个细胞
蛋白含量 (μg)	6—7	85—130	~1000

(2) 合理的 ¹⁴C-亮氨酸用量

同位素用量与掺入体积有关, 各家报道差别较大。O'Farrell^[1] 用混合 ¹⁴C-氨基酸 5—20 μCi/ml 标记 5'—30', Bravo^[6,7] 等采用 ³⁵S-蛋氨酸 100 μCi—500 μCi/0.1—1.0ml 标记 3 小时。

我们根据本实验室条件, 比较了几种 ¹⁴C-亮氨酸用量(见表 2), 最后确定 1×10^5 个细胞/0.2ml 加入 10 μl (2.5 μCi) ¹⁴C-亮氨酸。

表 2 比较不同剂量 ¹⁴C-亮氨酸掺入 M12.4.1 细胞的结果

掺入时间 (22h)	5 μl (1.25 μCi)	10 μl (2.5 μCi)	20 μl (3.75 μCi)	40 μl (5.0 μCi)
脉冲数	267, 175	529, 927	523, 208	447, 580

(3) 合适的掺入时间

根据实验要求不同, 同位素掺入细胞时间长短不一。O'Farrell^[8] 曾观察 ³⁵S-蛋氨酸 (50 μCi/0.2ml) 标记 SV-40 感染的 CV-1 细胞的外壳蛋白合成情况, 此过程仅需掺入数分钟。我们希望得到高掺入的细胞样品, 因此测试了不同掺入时间的脉冲数(见图 1), 确定本实验掺入时间为 22 小时左右。

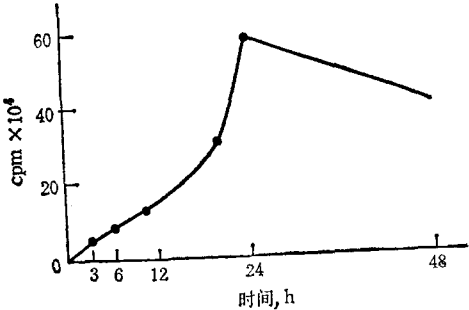


图 1 ¹⁴C-亮氨酸掺入 M12.4.1 细胞的时间曲线

2. 荧光谱的条件

为了增加同位素放射自显影的灵敏度, Bonner 和 Laskey 发展了一种更为敏感的闪烁放射自显影方法, 称为“荧光谱”(Fluorography)^[3]。荧光谱的原理是, 将凝胶放入 PPO 溶液中浸泡, 使不易从胶基质中逸出的低能量 β 粒子先与 PPO 反应。PPO 是一种常用的有机闪烁体, 可将 β 粒子的能量转换为可见光, 其最大优点是接受电离辐射激发产生光的效率较高, 可增加 X 光胶片感光速度和灵敏度, 因而有增敏作用。

我们在操作中感到: (1) PPO 的溶解度非常重要, 可是 PPO 在水中溶解度有限, 因而首先要找一种试剂既能溶解 PPO, 又能取代凝胶中的水而不引起胶变形。DMSO 是具有

这两种作用的理想试剂,大多数实验室都使用它,其缺点是毒性较大。Pulleyblank^[9]等报道也可用冰醋酸代替 DMSO 溶解 PPO。(2)要保持 PPO 浓度,每浸泡 14cm × 15cm × 1.5mm 的凝胶,大约有 6 克 PPO 浸入胶内^[3],所以当 PPO-DMSO 溶液反复使用时,每次应补充加入固体 PPO。(3)浸泡要适当。为防止凝胶中的水污染 PPO 溶液,因而凝胶先用 DMSO 溶液浸泡,此步骤有无蛋白丢失还不能确定^[10],所以浸泡时间不宜过长。DMSO 沸点为 189—193℃,在真空状态难以去除,有时在胶膜出现较深背景,因此在干胶前需用水浸泡将其去除。此外,X 光片质量及曝光温度对灵敏度均有影响,-70℃ 曝光比 -20℃ 曝光,灵敏度约提高十倍以上^[9]。

表 3 O'Farrell 电泳显示方法的比较

方法	所需蛋白量	显示结果时间	灵敏度
考马斯亮蓝	>30μg	0.5天	不灵敏
银染	30μg	0.5天	较灵敏
放射自显影	7μg	12天	灵敏
荧光谱	7μg	3天	灵敏

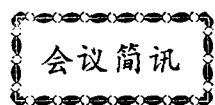
3. O'Farrell 电泳几种显示方法的比较

图 2(见图版 IV)比较了几种电泳显示方法,结果相差较大,其中图 2d 为荧光光谱图,效果最佳。现将四种显示方法的优缺点比较如下(见表 3)。

参 考 文 献

- [1] O'Farrell, P. H.: *J. Biol. Chem.*, 1975, 250(10), 4007.
- [2] Celis, J. E. and Bravo, R.: *Two-Dimensional Gel Electrophoresis of proteins*, Academic Press, INC. London, 1984.
- [3] Bonner, W. M. and Laskey, R. A.: *Eur. J. Biochem.*, 1974, 46, 83.
- [4] 姚志建、张明伟:《军事医学科学院院刊》, 1986, 10(5), 341.
- [5] 郭燕捷、姚志建:《生物化学与生物物理进展》, 1986, (4), 67.
- [6] Bravo, R. and Celis, J. E.: *J. Cell. Biol.*, 1980, 84, 795.
- [7] Bravo, R. and Celis, J. E.: *Exp. Cell. Res.*, 1980, 127, 249.
- [8] O'Farrell, P. Z. and Goodman, H. M.: *Cell*, 1976, 9(2), 289.
- [9] Pulleyblank, D. E. et al.: *J. Biochem. Biophys. Methods.*, 1981, 4, 339.
- [10] Dunn, M. J. and Burghes, A. H. M.: *Electrophoresis*, 1983, 4, 173.

[本文于 1987 年 8 月 11 日收到]



会议简讯

第二届中日双边生物物理学学术会议在日本京都召开

中国生物物理学会与日本生物物理学会于 1988 年 5 月 17 日至 20 日在日本京都联合召开了“第二届中日双边生物物理学学术会议”。日方以京都大学为主的 45 个单位 136 人到了会。中方一行 56 人参加了会议。

大会共接纳了 164 篇论文,中方为 53 篇。共有三个大会报告:

一、江桥薊郎(国立生理科学所教授):“钙离子与肌肉收缩,一个生物调节模型”;

二、梁栋材:“以胰岛素及其类似物的高分辨率晶体结构为基础的胰岛素分子与受体结合的可能机制”;

三、王书荣:“调节顶盖活动的胆碱能视觉中枢”。

会议分为六个专题进行了交流:

一、分子生物物理学(包括分子遗传学), 39 篇论文;

二、细胞与膜生物物理学, 45 篇;

三、感觉与神经生物物理学, 28 篇;

四、理论生物物理学, 28 篇;

五、细胞流动与细胞骨架, 17 篇;

六、生物技术, 4 篇。

以上各专题共宣读了 29 篇论文,未宣读的论文分别按专题安排了科学墙报展讲活动。

会后组织到京都大学生物物理系访问。该系是日本高等学校中唯一的生物物理系,已有 21 年历史。经参观得知该系有七个研究室:

一、理论生物物理室。进行生态(数学生态学、生态系统学)、进化论(性的进化等)、神经科学(自动机网络及细胞自动机理论)、发育生物学与细胞生物学(模

(下转第 320 页)

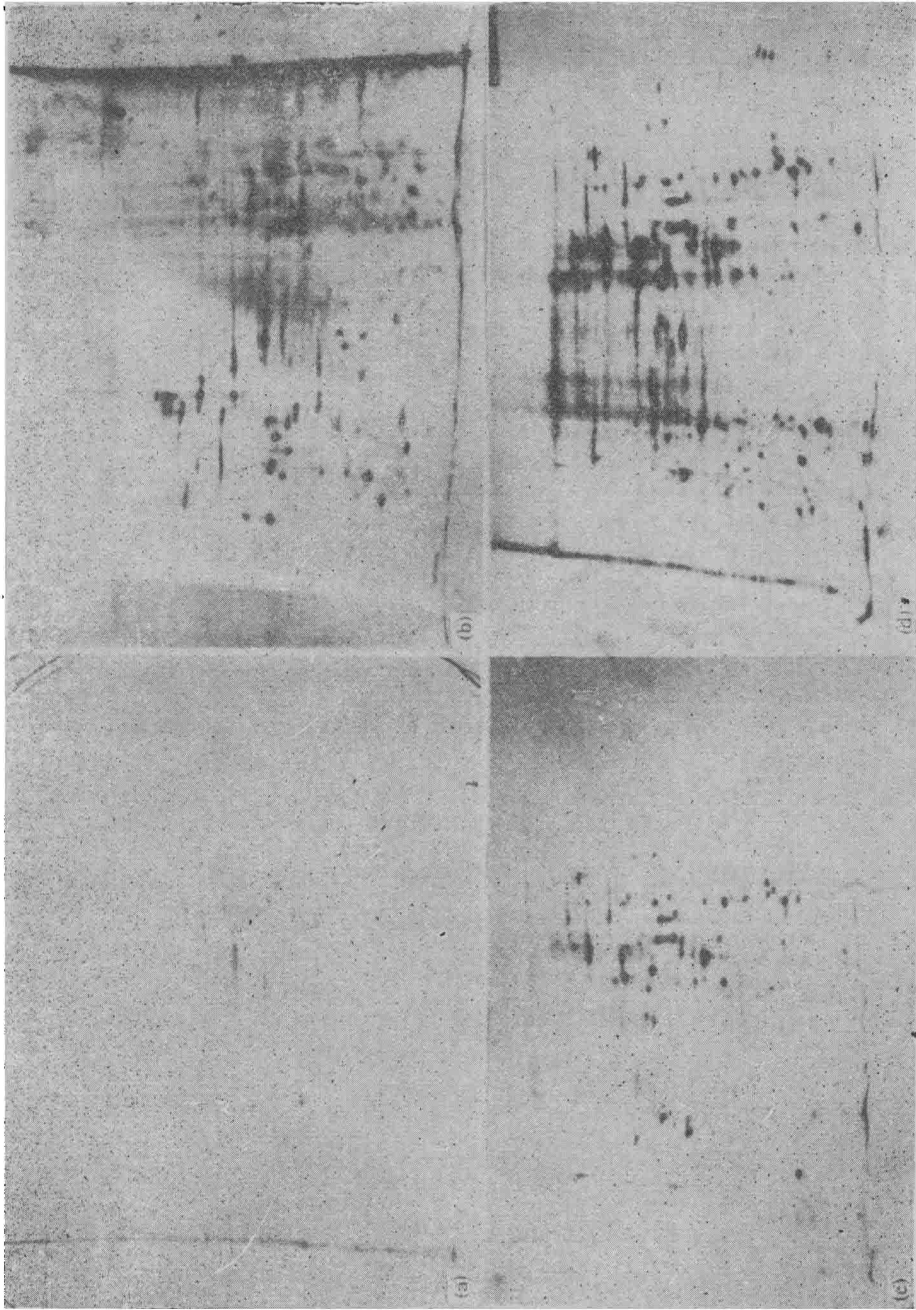


图 2 O'Farrell 电泳四种显示方法的图谱

a: 考马斯亮蓝 b: 银染 c: 放射自显影 d: 荧光谱