

银染 SDS-PAGE 微量肽图法的改进

饶春明 赵燕平 张向明 丁锡申

(中国药品生物制品检定所, 北京)

近年来, 很多学者^[1-4]对微量蛋白质的肽图分析进行了颇为深入的研究, 建立了分析灵敏度较高的方法。但对小分子多肽的检测尚存在不少困难。因为小分子多肽在电泳过程中易于扩散, 常规 SDS-PAGE 难于检测。本文采用改进的 10~25% SDS-PAGE 梯度胶进行检测, 并在胶上直接用 CNBr 裂解, 可以分析微量蛋白质, 这样改进之后提高了灵敏度和分辨率, 使小分子多肽亦能呈现清晰的图谱。

1. 两种电泳系统检测肽图的比较

15% 均一胶 SDS-PAGE 按 Laemmli^[5] 方法进行; 10~25% SDS-PAGE 采用 Fling 方法^[6], 但分离胶的胶浓度为 10~25%, 相应的胶联度为 2.6~3.8%。应用这两种电泳系统分别测定了 BSA 和 Cyt c 的 CNBr 裂解产物, 同时用多肽分子量标准 (Pharmacia 公司) 作对照, 结果大分子多肽在两种系统中无明显差别, 而小分子多肽 Cyt c 裂解物在梯度胶上呈现 4 至 5 条很窄的区带, 在均一胶上仅有 3 条区带。由此可见, 梯度胶系统的分辨力显著优于均一胶系统。

2. 裂解微量蛋白质 CNBr 最佳浓度的选择

CNBr 的浓度对蛋白质的裂解程度有直接的影响, 为了得到结果稳定的多肽图谱, 应该选择 CNBr 的最适浓度。本文用 INS、Cyt c、CTA、OV、BSA 等五种蛋白质, 每种 10 μ g, 分别于 70% 甲酸溶液配制的不同浓度 CNBr 溶液中裂解, 结果表明, 在 70% 甲酸溶液中, CNBr 浓度在 5—100 mg/ml 范围内对蛋白质的裂解基本一致(图 1)。经比较以 10 mg/ml 的浓度最适宜, 此时反应速度适中, 且重复性好。

3. 直接在胶上裂解微量蛋白质方法的改进

取 BSA 和 MYO 各 5 μ g 混合进行等电聚焦电泳, 考马斯亮蓝 G 250 显色后切下含蛋白质区带胶条, 装入小试管中, 加入 0.1 mol/L HCl 平衡 30 分钟, 倾去平衡液, 加入 10 mg/ml CNBr 溶液, 室温反应 16 小时, 倒出 CNBr 液, 将胶条冷冻干燥。冻干胶条电泳前用样品缓冲液浸泡使之恢复至冻干前大小, 沸水浴 4 分钟, 用 1% 琼脂糖(浓缩胶缓冲液配制)连接于梯度胶, 进行第二向电泳, 结果 BSA 和 MYO 在胶上裂解与在 70% 甲酸中裂解的电泳图谱完全一致。因为

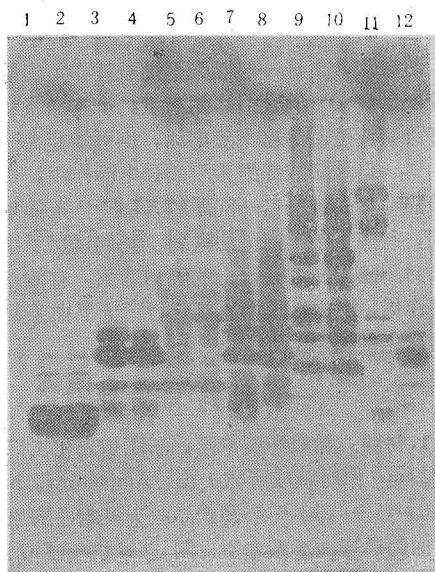


图 1 五种蛋白质的 CNBr 裂解肽图

图中标号: 1、2. INS, 3、4. Cyt c, 5、6. CTA, 7、8. OV, 9、10. BSA, 11. 五种蛋白质, 12. 2 μ g Cyt c CNBr 裂解物

冷冻干燥可将胶内的残余 CNBr 抽去, 所以该法是安全可行的。另外, 还对电泳后的染色方法进行了试验比较, 铬银染色比银染色易于着色, 底色比较清晰, 其灵敏度能达到 10 ng/肽片断。

总之, 经改进后的银染 SDS-PAGE 微量肽图法, 简便、快速、灵敏度高、重复性好, 一次可做多个样品, 适于常规分析, 具有广泛的实用意义。

参 考 文 献

- [1] Cleveland, D. W. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1977, **252**, 1102.
- [2] Nikodem, V. et al.: *Anal. Biochem.*, 1979, **79**, 382.
- [3] Lischwe, M. A. et al.: *Anal. Biochem.*, 1982, **127**, 453.
- [4] Zingde, S. M. et al.: *Anal. Biochem.* 1986, **155**, 10.
- [5] Laemmli, U. K.: *Nature*, 1970, **227**, 680.
- [6] Fling, S. P. et al.: *Anal. Biochem.*, 1986, **155**, 83.

[本文于 1988 年 2 月 2 日收到]