

经验交流

一种简便的考马斯亮蓝 G250 蛋白质染色方法*

江 南¹⁾ 吴开力 黄 强 潘苏华

(中山大学中山眼科中心, 广州 510060)

摘要 介绍一种快速、简便、几乎无背景的考马斯亮蓝 G250 (CBB G250) 染色方法。该方法所用试剂仅为稀盐酸和 CBB G250, CBB G250 的工作浓度为 0.0015%, 灵敏度达 0.02 μg /带, 染色 2 h 达 70%, 4 h 以上或染色过夜即可充分染色。与以往的考马斯亮蓝染色方法相比, 该方法有经济方便、灵敏度高、几乎无背景等优点, 便于推广应用。

关键词 电泳, 染色方法, 考马斯亮蓝 G250

学科分类号 Q5-33

蛋白质电泳后染色方法有多种: 氨基黑染色、考马斯亮蓝染色和银染色等。其中考马斯亮蓝染色克服了氨基黑染色灵敏度较低, 和银染法操作复杂、假阳性率高的缺点, 是最常用的染色方法。但它仍然存在一些问题, 如考马斯亮蓝 R250 (CBB R250) 背景深、耗时长; CBB G250 灵敏度不高; 二者所耗试剂均较多。近几年, 人们对考马斯亮蓝染色法作了许多改进, 不同程度地改善了某些方面的问题, 但仍未尽善。本文介绍一种经济快速, 灵敏度高, 几乎无背景的 CBB G250 染色方法。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 蛋白质样品: 牛血清白蛋白 (BSA) 购自 Bio-Rad 公司; 小牛晶状体的 α 晶体蛋白由 Sephadex G200 sf 两次柱层析 (100 cm $\times$ 1.6 cm 和 40 cm $\times$ 1.6 cm) 分离获得。

1.1.2 染色液配制: 1 mol/L 盐酸溶液 (A), 1 g/L CBB G250 溶液 (B); 应用时用 1 ml A 液和 15 ml B 液混合加水至 1 L, 搅拌混匀。

1.1.3 仪器: Bio-Rad Model 1000/500 电泳仪; Bio-Rad (Mini-Protean II) 电泳槽。DY-1500A 型高压电泳仪; Pharmacia Biotech (Multiphor II) 电泳槽。

1.2 方法

1.2.1 电泳: SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-

PAGE)、常规聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE)、等电聚焦 (IEF) 参照郭尧君等^[1]方法操作。

1.2.2 染色程序: a. 电泳完毕, 取出凝胶浸于 5 mmol/L 盐酸溶液中, 振荡 1 h; b. 弃去盐酸溶液, 重复步骤 a; c. 将胶置于染色液中, 染色 2~16 h, 连续振荡; d. 弃去染色液, 将胶置于 1 mmol/L 盐酸溶液中脱色数小时 (换液 3~5 次)。最后对凝胶进行观察和照相, 并将凝胶保存于 1 mmol/L 盐酸溶液中。

1.2.3 凝胶染色图象分析: 在染色和漂洗过程中应用 Alphaimage 2000 Documentation & Analysis System 对凝胶照相 (同一照相条件及参数) 并作蛋白质条带染色强度分析; 观察染色的强度变化时, 以同一参照点分别测定蛋白质条带和凝胶背景的染色强度; 测定漂洗时染色强度变化则以蛋白质条带的强度减去背景强度后作为该蛋白质条带的染色强度; 染色强度和加样量的相关性分析采用 Video Densitometer II System (USA Biomed Instrument, Inc), 扫描每条蛋白质条带的染色强度并计算其与加样量的依存关系; 染色的灵敏度通过加样不同浓度 (≥ 10 ng) 的 BSA, 染色后以肉眼能观察到的最低浓度的条带为标准。

* 广东省自然科学基金项目 (970084) 部分工作。

¹⁾ 通讯联系人。

Tel: (020) 87330395, E-mail: yunjuyan@263.net

收稿日期: 1999-08-15, 修回日期: 2000-01-04

2 结果与讨论

2.1 染色与漂洗随时间的变化规律

2.1.1 染色: BSA 和小牛 alpha 晶体蛋白的变化规律相同. 5~10 min 即显现蛋白质条带而可进行初步观察, 2 h 染色达 70%, 4 h 后染色基本达到饱和, 与 24 h 染色的强度相近.

2.1.2 漂洗: 本法染色背景色不深, 漂洗 1.5~2 h 达到完全脱去背景色, 即可进行照相或图象分析.

2.2 本染色方法的优点

2.2.1 灵敏度高: 一般 CBB G250 染色的灵敏度为 $2.0 \mu\text{g}/\text{带}^{[2]}$, Westermeier^[3] 介绍了一种高灵敏度的 CBB G250 染色法, 其灵敏度为 $0.03 \mu\text{g}/\text{带}$. 本方法则为 $0.02 \mu\text{g}/\text{带}$, 灵敏度较一般 CBB G250 染色法明显提高, 与 Neuhoff 等的方法接近, 但远较其经济、简便和快速.

表 1 三种 CBB G250 染色法的比较

	一般 CBB G250	Westermeier 介绍的 CBB G250	本文介绍的 CBB G250
灵敏度($\mu\text{g}/\text{带}$)	2.0	0.03	0.02
总时间/h	8~10	8~10	≥ 6
CBBG250 浓度 / %	0.25	0.1	0.0015
背景	浅	几无背景	几无背景
所用试剂	较多	多	少

2.2.2 相关性好: 本文使用凝胶厚度为 1 mm, 通过测定 alpha A (A)、alpha B (B) 加样量 1~14 $\mu\text{g}/\text{带}$ 的染色强度与加样量的关系可见, 染色强度与蛋白质加样量的相关性非常好 ($R^2 > 0.99$), 能较为准确地反映蛋白质量的变化.

2.2.3 近于无背景染色: CBB G250 是一种生物染料, 能选择性地与蛋白质和多肽结合. 传统的 CBB G250 染色法中 CBB G250 浓度为 0.25%, 具有背景色低的特点, 但仍有部分染料滞留于丙烯酰胺凝胶中, 需一定时间脱色才能得到更清晰的背景. 该方法所用 CBB G250 浓度仅为 0.0015%, 滞留于凝胶中的染料进一步减少, 背景色浅, 经 2 h

左右的漂洗脱色, 几乎无背景残留.

2.2.4 简便经济: 除 CBB G250 外, 一般 CBB G250 染色法所需试剂为甲醇、乙酸、三氯乙酸等, Westermeier 介绍的高灵敏度染色法所用试剂有磷酸、过硫酸铵、Tris、三氯乙酸、甲醇和乙醇, 操作步骤复杂. 本文所介绍的方法仅需稀盐酸和 CBB G250 两种试剂, 便宜易得, 经济方便, 不仅节省经费, 也大大简化了配液和染色的步骤.

2.3 应用范围

初步观察本法用于 SDS-PAGE 和常规 PAGE 的效果较好, 而用于 IEF 凝胶染色效果较差. 可能因为 IEF 凝胶的 pH 值不均一, 影响染色效果; 另外, IEF 凝胶中含有尿素和两性载体, 对染色效果可能也有影响, 但要找出真正原因, 需进一步研究.

参 考 文 献

- 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术. 北京: 科学出版社, 1999. 57~140
Guo Y J. Experiment Technology of Protein Electrophoresis. Beijing: Science Publishing House, 1999. 57~140
- 王太重, 李 栋, 樊秀华, 等. PAGE 一步性低背景 CBB R250 染色方法的探讨. 湖北医科大学学报, 1995, 16 (1): 84~85
Wang T Z, Li D, Fan X H, et al. Acta Academiae Medicine Hubei, 1995, 16 (1): 84~85
- Westermeier R. Electrophoresis in Practice. New York: VCH Publishers Inc. 1993: 181

A Simple Method of Protein Staining with CBB G250. JIANG Nan, WU Kai-Li, HUANG Qiang, PAN Su-Hua (Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510060, China).

Abstract A simple method of protein staining with Coomassie Brilliant Blue G250 is introduced, which had almost no background, needed less time and only two reagents. The working concentration of Coomassie Brilliant Blue G250 in the staining system with diluted hydrochloric acid was 0.0015%, and the sensitivity was $0.02 \mu\text{g}$ protein per electrophoresis zone.

Key words electrophoresis, staining method, coomassie brilliant blue G250