

继续电泳 45 分钟,之后用 50% 三氯醋酸固定,换几次固定液洗净 SDS。染色和脱色步骤同上。结果见图 5,左图为 SDS 凝胶电泳,右图为亚基分子量对数对 R_f 作图,从图中可见眼镜王蛇 L-氨基酸氧化酶的亚基分子量为 73,000。

本工作承雷克健同志指导,谨表谢意。

参 考 文 献

- [1] 雷克健, 胡纫秋, 王锦兰:《动物学研究》, 1981 年, 2 卷, 第 4 期(增刊) 43。

[本文于 1982 年 10 月 8 日收到]

铬银染色法在 ng 量蛋白 PAGE 检测中的应用

张 向 明

(卫生部药品生物制品检定所, 北京)

聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 是分析蛋白样品的有力工具。但目前所用的蛋白染料不能显示 ng 量的蛋白电泳区带。1979 年以来, Switzer^[1]及其他作者^[2-6]陆续发表了 PAGE 中蛋白区带银染色方法, 其灵敏度可与同位素放射自显影相媲美, 能检测到 ng 水平。1981 年 Merril 等又报道了更灵敏的铬银染色法, 只需配几个普通溶液, 操作步骤也大为简化。该法较同位素法简便、快速, 又不需特殊的试剂和设备。因此, 可用它研究病毒的结构, 分析核蛋白、组织液等的蛋白组成, 尤其适合分析蛋白含量少的样品。

本文报道我们对 Merril 方法所做的某些改进, 摸索出复染退色胶及干燥保存电泳凝胶的方法, 并用此法做麻疹病毒蛋白的分析, 以及流脑 A 群多糖菌苗制品中的微量杂质蛋白的分析。

材 料 和 方 法

一、材料

1. 麻疹病毒 麻疹病毒 L₄ 株培养于 MERN 细胞上。按 Stallcup^[8] 的方法培养和纯化病毒。病毒在 FL 细胞上的滴度为 6TCD₅₀/ml。纯化麻疹病毒的蛋白含量约 0.5mg/ml。

2. 流脑 A 群多糖菌苗 本所菌种室提供。

3. 电泳槽 中国科学院动物研究所产品。

二、方法

1. SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳用 Laemmli 1970 年^[9] 的缓冲系统。分离胶浓度为 13%, 浓缩胶浓度为 4.5%。

2. 铬银染色方法

(1) 电泳毕, 将平板凝胶放在 50% 甲醇-12% 醋酸液中固定 20 分钟以上。

(2) 用 10% 乙醇-5% 醋酸液洗三次, 每次用 200ml 洗 10 分钟以上, 去除 SDS。

(3) 在 200ml 0.0034M 重铬酸钾-0.0032N 硝酸液中浸泡 7 分钟, 不时振动。

(4) 用无离子水 (电阻 > 500,000Ω) 洗二次, 每次用 200ml 洗 2 分钟。

(5) 将胶板浸在 200ml 0.012M 硝酸银溶液中, 在日光或灯光下 (并排 2 根 20W 日光灯) 曝光 10 分钟, 再放置 20 分钟, 中间振动若干次。

(6) 用无离子水洗二次, 每次用 200ml 洗 1 分钟。

(7) 边振动胶板, 边倒入 0.28M 碳酸钠-甲醛液, 共三次, 每次 300ml。三次甲醛的浓度分别为 0.01%, 0.03%, 0.05%。第一、二次各作用 2 分钟左右, 第三次作用时间依蛋白区带显色至所需深度而定。

(8) 立刻用 1% 醋酸定影 10 分钟, 再保存于蒸馏水中。

3. 胶板的干燥

将胶板在 20% 甲醇-3% 甘油液中浸泡过夜,然后放在铺有玻璃纸的玻璃板上,再在上面包上玻璃纸,赶去气泡,于 37℃ 或室温下干燥。此方法较抽气加热法^[10]更方便,节水,省电,而且干燥后的胶板透明清晰。

4. 复染退色胶

如遇染色胶着色区带退色,可先用无离子水洗涤胶板的表面,再从上述的第三步开始重复各染色步骤。但复染的胶应尽快干燥保存。

为了便于操作,在银染过程中,需要制作一个有机玻璃夹供转移胶板用。

结 果

一、铬银染色蛋白的灵敏度

图 1 (见封 2) 是 2mg/ml 的牛清白蛋白倍比稀释系列。每个稀释浓度取 2 μ l,在 1.5mm 厚的聚丙烯酰胺胶板上电泳。经铬银染色后,电泳区带可测出含 2.5ng 蛋白/mm²。若胶板更薄些还可提高染色灵敏度。

二、铬银染色蛋白方法检测微量蛋白

结果见图 2 (封 2)。

讨 论

蛋白银染法的基本原理是利用银离子与蛋白质以盐或配价络盐的形式结合^[11],而后由甲醛将银离子还原成可见的银颗粒。重铬酸钾为媒染剂,其作用类似照像底片的加厚,可使着色

加深。但目前对于银染蛋白的确切机理不清楚,曝光强度是影响灵敏度的重要因素^[12]。

为了减少银颗粒对胶面的污染,本文在步骤 6 增加了水洗。又在步骤 7 采用甲醛浓度递增的方法。冬季,若室温过低,银染过程可采取适当的保温措施,使 SDS 易于除去,并要防止重铬酸钾析出。

除步骤 4—6 外,其余各步用普通蒸馏水配制溶液即可,染色可于 20cm 直径的玻璃皿中进行。

参 考 文 献

- [1] Switzer, R. C. et al.: *Anal. Biochem.*, **98**, 231, 1979.
- [2] Merrill, C. R. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, **76**, 4335, 1979.
- [3] Oakly, B. R. et al.: *Anal. Biochem.*, **105**, 361, 1980.
- [4] 入江伸吉: 生化学, **52**, 411, 1980.
- [5] 上林力专, 堀米垣好, 菅野浩: 生化学, **52**, 600, 1980.
- [6] 林斯骏等,《细胞生物学杂志》,1981 年,3 卷,第 2 期,第 33 页。
- [7] Merrill, C. R. et al.: *Science*, **211**, 1437, 1981.
- [8] Stallecup, K. C. et al.: *J. Virol.*, **30**, 166, 1979.
- [9] Laemmli, U. K.: *Nature*, **227**, 680, 1970.
- [10] 张向明,《生物化学与生物物理进展》,1982 年,第 3 期,第 73 页。
- [11] 南开大学生化教研室等译:《生物化学原理》(上册),1978,86 页。
- [12] Merrill, C. R. et al.: *Anal. Biochem.*, **110**, 201, 1981.

[本文于 1982 年 7 月 26 日收到]

更 正

《辅酶 I 的简易提纯法》(1982 年,6 期,53 页)的图 1 应改正如下:

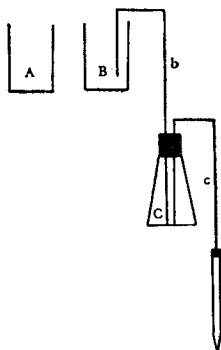


图 1 浓度梯度洗脱装置示意图

《铬银染色法在 ng 量蛋白 PAGE 检测中的应用》的图

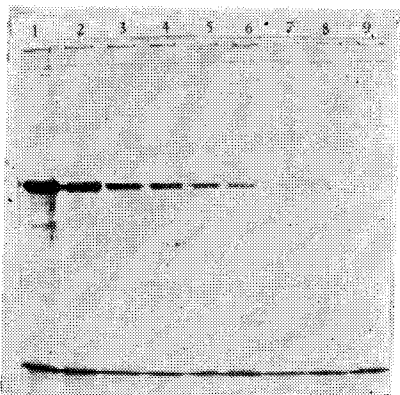


图 1 不同浓度牛血清白蛋白的 PAGE-银染图谱

1-9 号是 2mg/ml 牛血清白蛋白的信比稀释系列,每个稀释浓度取 2 μ l 进行电泳

《一种改进的 RNA 序列双向测定直读技术》的图



图 3 聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

5'-³²P 标记的番茄 5 SRNA 水解产物在 12% 聚丙烯酰胺凝胶上电泳,0,3,6 时点样。电泳总计 8 小时,电压 2000 伏,电流 16 mA。放射自显影 2 小时。图右侧 XC 代表二甲苯兰 XC,XC₂,XC₃ 分别表示第 1,2,3 次点样的样品中其泳动位置。PBP 代表溴酚兰、PBP₂,PBP₃ 分别表示第 2,3 次点样的样品中其泳动的位置

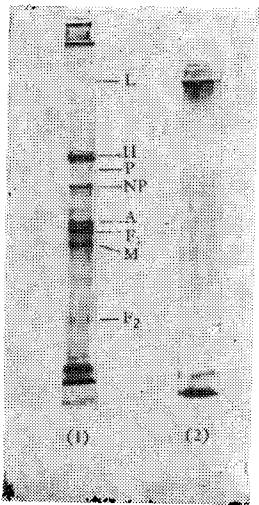


图 2 SDS-PAGE 银染图谱

- (1) 麻疹病毒蛋白(约 2 μ g 蛋白总量)
- (2) A 群流脑疫苗 (200 μ g 固体总量, 蛋白量 <1%)