

一种改良的蛋白质双向电泳银染色法

蔡晓丹 王理开 徐晓利

(中山医科大学生化教研室,广州)

Switzer 等人于 1979 年发展了蛋白质的银染色法^[1]。由于其灵敏度远远高于传统的考马斯亮蓝染色法,结合蛋白质的双向电泳技术,可获得分辨率极高的分析系统,已日益成为生化分析的重要工具。许多生化工作者对银染色法作了改良^[2-5]。但是,其中某些方法我们难以重复,或底色过深,假象多,或操作步骤过于繁琐。我们结合前人经验,建立了一个在本实验室条件下易行、价廉、重复性好的改良方法。

一、材料和方法

1. 试剂

丙烯酰胺、双丙烯酰胺(南中塑料厂出品),重结晶后使用;戊二醛(Fluka);硝酸银 GR 级(成都化学试剂厂产品);氨水 AR 级(广州化学试剂厂产品);尿素 GR 级(北京化学试剂厂产品);Ampholine(LKB 产品);牛血清白蛋白(BSA,上海生化所产品),经凯氏法测定蛋白质含量;其余试剂 AR 或 CP 级。实验过程用水均为去离子水经全玻璃蒸馏器重蒸馏后使用。

2. 电泳方法:

单向 SDS 平板凝胶电泳采用 Laemmli 系统^[6],凝胶浓度 10%,厚度 1mm,以 BSA 作样

品,上样量如图 1 所示。电泳完毕,将凝胶切成两半,分别作考马斯亮蓝染色^[7]及银染色,以比较两种方法的灵敏度。

双向电泳依据 O'Farrell 等的方法^[8],有较大改动。等电聚焦凝胶直径 1.2mm,高 80mm,胶浓度为 5%,Ampholine 为 2.5% (pH3.5—10 占 1/4, pH5—8 占 3/4),尿素浓度为 9M,样品混和于凝胶中。聚焦时电压和时间依次为 200V 15 分钟,300V 30 分钟,400V 10 小时,800V 1 小时。取出凝胶条,于平衡液中平衡 40 分钟,室温中进行。第二向电泳采用 10—15% 线性梯度平板凝胶,胶厚度 1mm,长 120mm,高 150mm,电流强度及电泳时间依次为 7.5mA/板 40 分钟,15mA/板 4 小时。

3. 银染色法:

(1) 电泳后,凝胶浸泡于 20% 三氯乙酸中,振摇 4 小时以上或过夜。

(2) 吸去三氯乙酸溶液(可重复使用数次),用水冲洗凝胶表面,弃去洗涤液,再加水冲洗,每次约用 250ml,充分振摇 20 分钟,共三次。

(3) 弃去洗涤液,加入 1% 戊二醛 200ml,振摇 4 小时以上。

(4) 弃去戊二醛溶液,用水冲洗凝胶表面

参 考 文 献

[1] 李成文等:《生物化学与生物物理进展》6,71—73,1983.

[2] 王世中:《免疫化学技术》. 科学出版社,202,1980.

[3] Andrews A. T.: *Electrophoresis: theory, techniques, and biochemical and clinical applications*. Clarendon Press, Oxford, 32, 1981.

[4] 华家桢等:《实用蛋白质化学技术》,上海科学技术出版社,52—53,1979.

[5] Clausen, J.: *Immunochemical techniques for the*

identification and estimation of macromolecules (2nd Fully Revised Edition), Elsevier/North-Holland, Biochemical Press, Amsterdam, New York. Oxford, 249, 1981.

[6] Sodeman, W. A.: *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **16**, 591—594, 1967.

[7] 莽克强等:《聚丙烯酰胺凝胶电泳》科学出版社,26,1975.

[8] C. F. A. 卡林著(孔庆雷译):《组织病理学与组织化学技术手册》365—367,1982.

[本文于 1985 年 7 月 15 日收到]

后,再加水荡洗三次,每次 10 分钟。

(5) 弃去所有液体,加入临用前配制的氨银溶液 200ml (可染两片胶),振摇半小时。

氨银溶液: 0.1N NaOH 20ml, 浓氨水 1.4 ml, 慢慢滴加 19.4% 硝酸银 4 ml, 边加边搅拌,定容至 200 ml。

(6) 弃去氨银溶液,加水 250ml 荡洗凝胶表面 3—5 分钟。

(7) 弃去水溶液,加入临用前配制的显色液 (40% 甲醛 50 μ l, 1% 柠檬酸 0.5ml, 加水至 250ml), 不断摇动,密切观察显色情况,至显色满意 (约需 5—8 分钟), 迅速将凝胶转移至另一盛有水的容器中,充分洗涤并换水两次以终止显色。

(8) 如显色过深,可用脱色液适当褪色^[9]。脱色液配制:

A: NaCl 37 克, CuSO₄ · 5H₂O 37 克, H₂O 850ml, 滴加浓氨水至溶液呈澄清的深蓝色,定容至 1000ml;

B: 硫代硫酸钠 21.8 克加水至 100ml, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。用前, A 和 B 等量混合, 稀释 30 倍使用。

脱色过程中应不断振摇,密切观察,至脱色满意,即吸去脱色液,加水冲洗以终止脱色。

二、结果和讨论

牛血清白蛋白的单向 SDS 平板凝胶电泳,作两种染色法的灵敏度比较,结果如图 1。由图 1 可见,用氨银染色法,1ng BSA 可见明确染色带,用考马斯亮蓝染色法,100ng 的 BSA 才依稀可见染色带,说明银染色法灵敏度比考马斯亮蓝染色法高 100 倍以上。

从双向电泳的结果看,本法分辨率高,银染色使蛋白质显色清楚,底色浅,基本无假象。图 2 是正常大鼠肝细胞核(按 C. S. Teng 等人方法提取^[9])的 0.14M NaCl 可溶蛋白的双向电泳图谱,上样量为 50 μ g 蛋白质,显示出 540 个点。图 3 为细菌 (*E. coli* HB101) 蛋白质的双向电泳图谱。细菌经溶菌酶处理,再用 DNase I 及

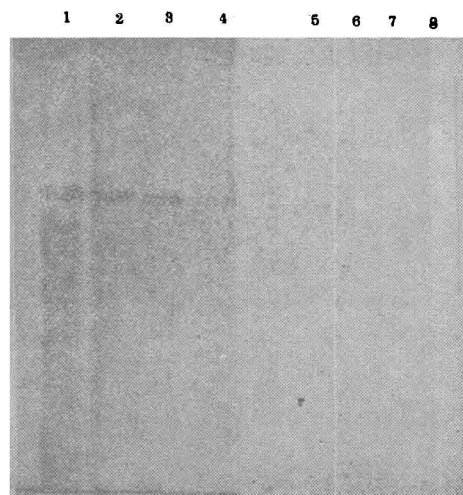


图 1 两种染色法灵敏度的比较

上样量 1,5 为 1000ng, 2,6 为 100ng, 3,7 为 10ng, 4,8 为 1ng,

1—4 为银染色, 5—8 为考马斯亮蓝染色

RNase 消化 DNA 及 RNA, 然后提取的蛋白质, 上样量 80 μ g, 在图 3 中显示出 514 个点。

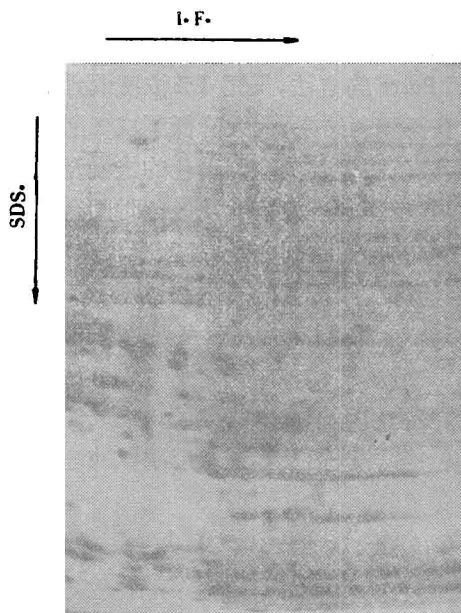


图 2 大鼠肝细胞核可溶性蛋白的双向电泳图

Wray 等报道: 氨银染色法的灵敏度与硝酸银的质量有关, 不同厂家、不同批号的产品可给出不同的灵敏度, 其中以 Accurate Chemical 公司的产品为最佳^[9]。我们的经验表明, 用国产的 GR 级硝酸银亦能获得同样的灵敏度。

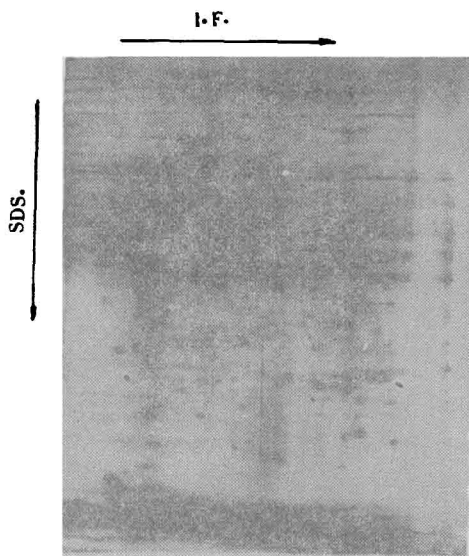


图3 细菌蛋白的双向电泳图

Porro 等人的方法^[4], 凝胶用戊二醛处理后, 加入氨银溶液即可显色, 无须使用显色液。但我们的实验表明, 必需加入显色液才能使凝胶显色。这与 Oakley 等人的经验^[2]相同, Oakley 是使用 10% 戊二醛。但此试剂较昂贵, 我们参照 Porro 的方法, 只用 1% 浓度而延长浸泡时间, 获得满意结果, 大大降低了戊二醛用量。

银染色法极其灵敏, 着色的快慢及染色的深浅与各步骤中溶液浓度及显色时间有关。各步骤操作的合适时间亦受温度、凝胶浓度、厚度及是否为梯度胶所影响。本法适用于 1mm 厚, 10—15% 梯度凝胶的染色, 室温 (25—30°C) 操作。

许多物质可干扰本法染色, 造成底色过深或假象。各种试剂及蒸馏水应确保纯净。使用

的器皿应充分洗净, 电泳用玻璃板应于铬酸洗液中浸泡 4 小时以上, 自来水充分冲洗, 蒸馏水再冲洗两次。染色过程中, 应避免用手接触凝胶。转移凝胶应使用塑料板或戴手套操作。

双向电泳凝胶中的 Ampholine、尿素等物质, 对染色亦有干扰。用 20% 三氯乙酸振荡洗涤 4 小时以上, 再如上法用水洗涤, 可除去干扰物质, 使底色清静, 否则底色过深, 假象出现, 凝胶前端出现深色干扰带。

用三氯乙酸及戊二醛处理凝胶所需的时间不应少于 4 小时。然而, 延长这两步骤的时间, 对染色效果无不良影响, 且无需相应延长洗涤时间或增加洗涤次数。

氨银溶液处理后, 洗涤时间不宜过长, 5 分钟已足够, 过长会降低灵敏度。

林斯骏等人^[5]将 Merrill 介绍的脱色液中的硫代硫酸钠含量减半, 然后稀释 3—5 倍使用。我们发现如此仍然脱色力过强, 难以控制脱色程度, 若稀释 30 倍再使用, 脱色程度就较易控制

参 考 文 献

- [1] Switzer, R. C. et al.: *Anal. Biochem.*, 98, 231, 1979.
- [2] Oakley, B. R. et al.: *ibid.*, 105, 361, 1980.
- [3] Wray, W. et al.: *ibid.*, 118, 197, 1981.
- [4] Porro, M. et al.: *ibid.*, 127, 316, 1982.
- [5] 林斯骏等: 《细胞生物学杂志》, 3(2), 35, 1981.
- [6] Laemmli, U. K.: *Nature*, 227, 680, 1970.
- [7] 徐晓利主译: 《生物化学工具》, 第 200 页, 人民卫生出版社, 1980.
- [8] O'Farrell, P. H.: *J. Biol. Chem.*, 250, 4007, 1975.
- [9] Teng, C. S. et al.: *ibid.*, 246, 3597, 1971.

[本文于 1985 年 9 月 3 日收到]