

聚丙烯酰胺凝胶电泳的快速脱色方法

周国权 巫光宏* 黄翠颜 蔡毅 詹福建 黄卓烈

华南农业大学生命科学学院, 广州 510642

A Rapid Destaining Method of Polyacrylamide Gel Electrophoresis

ZHOU Guo-Quan, WU Guang-Hong*, HUANG Cui-Yan, CAI Yi, ZHAN Fu-Jian, HUANG Zhuo-Lie

College of Life Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

提要 以牛血清白蛋白为材料进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)和十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 凝胶固定后, 用考马斯亮蓝 R-250 染色后比较传统脱色液(冰乙酸-甲醇溶液)和不同盐溶液(NaCl、KCl、CuCl₂)的脱色效果的结果表明: PAGE 和 SDS-PAGE 胶, 0.25 和 0.5 mol·L⁻¹ NaCl, 在 70℃ (PAGE)、50℃ (SDS-PAGE)下脱色, 约 2~4 h, 效果好, 灵敏度高, 背景低。

关键词 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE); SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE); 考马斯亮蓝 R-250; 脱色

聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)是蛋白质分离纯化和分子量分析最常用的方法。电泳后的凝胶可以通过多种染料染色检测, 最常用的是考马斯亮蓝(Coomassie brilliant blue, CBB)染色法。此法具有特异性强、操作简单及干扰因素少等优点, 但也有灵敏度不高、染色和脱色时间过长等不足之处。后来, 有人创建了 NaCl (郭尧君 2001)、KCl (Higgins 和 Dahmus 1979)、CuCl₂ (Lee 等 1987) 等金属盐类染色法, 但迄今这些盐在染色和脱色中所起的作用却鲜有报道。为此, 本文对 PAGE 和十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶染色后的脱色方法进行了系统的研究, 建立了一种快速、有效的脱色法——盐脱色法。此法可以提高考马斯亮蓝染色后常规脱色法的灵敏度、分辨率和脱染效率。现报道如下。

材料与方 法

1 材料

牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)。

2 方法

2.1 PAGE 和 SDS-PAGE PAGE 用连续垂直平板电泳系统; SDS-PAGE 用不连续垂直平板电泳系统(郭尧君 2001)。

2.2 染色和盐脱色 PAGE 和 SDS-PAGE 电泳后的凝胶用蒸馏水漂洗 2 次, 再用固定液(50% 甲醇, 10% 冰醋酸)在常温下固定 30 min, 后用蒸馏水漂

洗 2 次, 再用考马斯亮蓝 R-250 于 50℃ 下染色 30 min (PAGE) 和 45 min (SDS-PAGE) (郭尧君 1991), 最后分别转入不同浓度盐溶液和常规脱色液(冰乙酸-甲醇溶液)中脱色 2~4 h, 观察结果。

2.3 温度实验 脱色在不同温度下进行, 每隔一定时间观察脱色效果。

2.4 电泳灵敏度的测定 同一块凝胶上, 依次加入不同蛋白含量的 BSA 样品, 观察电泳灵敏度情况。

实验结果

1 不同浓度 NaCl、KCl 和 CuCl₂ 对脱色的影响

不同浓度 NaCl、KCl 和 CuCl₂ 于室温下对染色后的凝胶进行脱色的结果表明: 盐浓度越高, 越有利于脱色; 但盐浓度过高(大于 1.0 mol·L⁻¹), 分辨率会降低, 脱色效果也会下降, 特别是 PAGE, 只能在低浓度(小于 0.5 mol·L⁻¹)条件下才能获得较好的脱色效果; 由于铜离子带有颜色, 所以高浓度(大于 1.5 mol·L⁻¹) CuCl₂ 的凝胶会染上蓝绿色, 背景较深(图 1-1), 不利于观察。经过重复试验和分析统计, 要获得较好的脱色效果(背景较浅, 蛋白带较深), 在 PAGE 中 NaCl、KCl 和 CuCl₂ 的最佳脱色浓度均为 0.25 mol·L⁻¹, 而在 SDS-PAGE 中均为 0.5 mol·L⁻¹ (图 1、2)。

收稿 2005-05-27 修定 2005-10-28

资助 华南农业大学大学生科技创新活动项目(L04104)。

*通讯作者(E-mail: guanghongw@sohu.com, Tel: 020-85280191)。

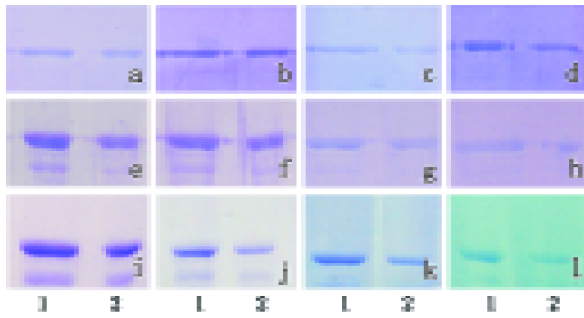


图1 SDS-PAGE后不同浓度盐溶液脱色效果的比较

a、b、c、d分别为0.25、0.5、1.0、1.5 mol·L⁻¹的NaCl；e、f、g、h分别为0.25、0.5、1.0、1.5 mol·L⁻¹的KCl；i、j、k、l分别为0.25、0.5、1.0、1.5 mol·L⁻¹的CuCl₂；1、2分别为1.0和0.5 μg BSA (25℃脱色4 h)。

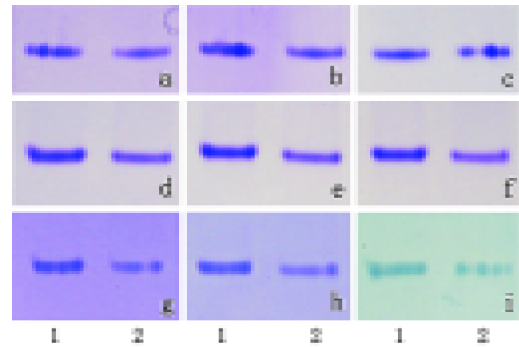


图4 PAGE后不同温度下0.25 mol·L⁻¹盐溶液脱色效果的比较

a、b、c分别为25、50、70℃的NaCl；d、e、f分别为25、50、70℃的KCl；g、h、i分别为25、50、70℃的CuCl₂；1、2分别为1.0和0.5 μg BSA (脱色2.5 h)。

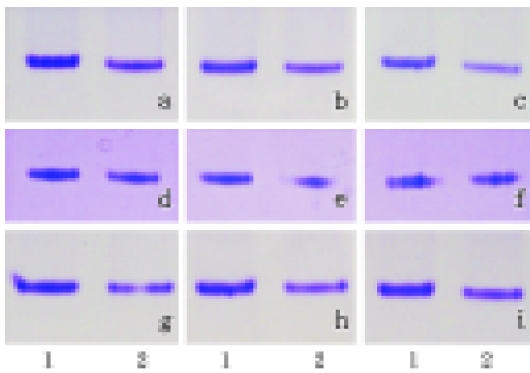


图2 PAGE后不同浓度盐溶液脱色效果的比较

a、b、c分别为0.125、0.25、0.5 mol·L⁻¹的NaCl；d、e、f分别为0.125、0.25、0.5 mol·L⁻¹的KCl；g、h、i分别为0.125、0.25、0.5 mol·L⁻¹的CuCl₂；1、2分别为1.0和0.5 μg BSA (25℃脱色2.5 h)。

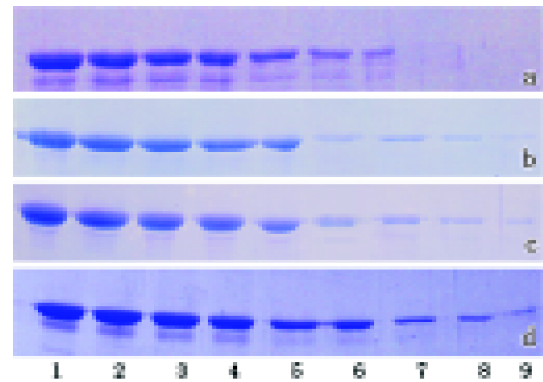


图5 SDS-PAGE后盐溶液脱色与常规脱色灵敏度比较

a、b、c、d分别是冰乙酸-甲醇、0.5 mol·L⁻¹NaCl、0.5 mol·L⁻¹KCl、0.5 mol·L⁻¹CuCl₂脱色；1~9分别是6.0、5.0、4.0、3.0、2.0、1.0、0.5、0.25、0.1 μg BSA。a是25℃脱色3 h；b、c、d是25℃脱色4 h。

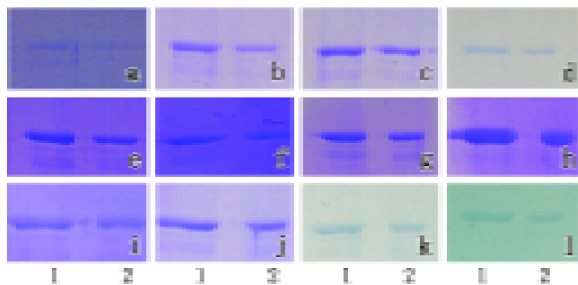


图3 SDS-PAGE后不同温度下0.5 mol·L⁻¹盐溶液脱色效果的比较

a、b、c、d分别为25、50、60、70℃的NaCl；e、f、g、h分别为25、50、60、70℃的KCl；i、j、k、l分别为25、50、60、70℃的CuCl₂；1、2分别为1.0和0.5 μg BSA (脱色2 h)。

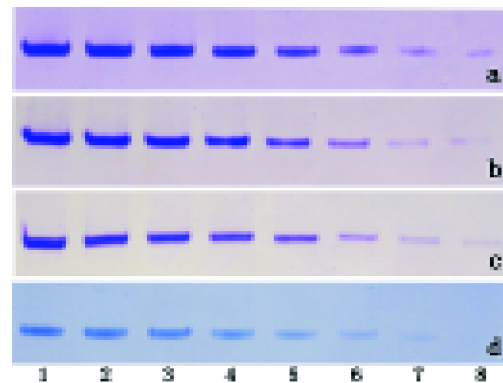


图6 PAGE后盐溶液脱色与常规脱色灵敏度比较

a、b、c、d分别是冰乙酸-甲醇、0.25 mol·L⁻¹NaCl、0.25 mol·L⁻¹KCl、0.25 mol·L⁻¹CuCl₂脱色；1~8分别是5.0、4.0、3.0、2.0、1.0、0.5、0.2、0.1 μg BSA (25℃脱色2.5 h)。

2 不同温度对盐脱色的影响

在脱色最佳盐浓度下, 温度越高, 脱色时间越短。但当温度高于 70℃ 时, 会出现两种情况: 一是脱色过度, 导致蛋白带颜色较浅(图3-d); 二是高温下凝胶皱缩, 影响脱色, 背景较高(图3-h)。高于 70℃ 的 CuCl_2 有漂白凝胶的作用(图3-l、图4-i)。相比而言, PAGE 中, $0.25 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl、KCl 和 CuCl_2 的最佳脱色温度分别是 70、50、50℃; SDS-PAGE 中, $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl、KCl 和 CuCl_2 的最佳脱色温度分别是 50、60、50℃ (图3、4)。

3 脱色时间对电泳灵敏度影响

在 SDS-PAGE 中, 用盐脱色能大大减少脱色时间, 原来的脱色需几天才可以观察到蛋白带, 现在短短几十分钟内蛋白带就出现了, 且 3~4 h 后的脱色效果达到最佳。 $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl、KCl 和 CuCl_2 可检测到 $0.1 \mu\text{g}$ 的蛋白, 而常规脱色法一般只能检测到 $0.5 \mu\text{g}$ 的蛋白(表1、图5)。

表1 SDS-PAGE 后不同盐脱色时间与灵敏度的比较

脱色方法	染色时间/ min	脱色时间/ min	蛋白质最低 检出量/ μg
常规脱色	30	>72	0.5
NaCl 脱色	30	4	0.1
KCl 脱色	30	4	0.1
CuCl_2 脱色	30	4	0.1

染色温度为 50℃, 常规脱色、KCl 脱色、 CuCl_2 脱色温度为 50℃, NaCl 的脱色温度为 70℃, NaCl、KCl、 CuCl_2 的浓度为 $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

在 PAGE 中, 用盐脱色能在较短时间(2.0~2.5 h)内得到良好效果, 而且 $0.25 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 和 KCl 与常规脱色有相同的灵敏度, 能检测出 $0.1 \mu\text{g}$ 的蛋白含量; $0.25 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CuCl_2 脱色的灵敏度略低于常规脱色, 只能检测 $0.2 \mu\text{g}$ 的蛋白含量(表2、图6)。

讨 论

经 PAGE 和 SDS-PAGE 后的凝胶, 一般先用考马斯亮蓝 R-250 染色, 再用常规脱色液(冰乙酸-甲醇溶液)脱色, 这样不仅费时低效, 而且甲醇有一定毒性, 操作时不够安全(肖亚中等 2002)。

PAGE 和 SDS-PAGE 后, 先将凝胶固定, 后

表2 PAGE 后不同盐脱色时间与灵敏度的比较

脱色方法	染色时间/ min	脱色时间/ min	蛋白质最低 检出量/ μg
常规脱色	45	2.5	0.1
NaCl 脱色	45	2.5	0.1
KCl 脱色	45	2.5	0.1
CuCl_2 脱色	45	2.5	0.2

染色温度为 50℃, 脱色温度为 25℃, NaCl、KCl、 CuCl_2 的浓度为 $0.25 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

用考马斯亮蓝 R-250 于 50℃ 下染色 30 min (SDS-PAGE) 或 45 min (PAGE), 再用不同的盐溶液 (NaCl、KCl、 CuCl_2) 脱色, 相对于常规脱色法而言有一定的优点, 不仅脱色时间大大缩短(由原来 2~5 d 缩短到 2~4 h), 而且灵敏度提高, 能够检测 $0.1 \mu\text{g}$ 的蛋白质, 背景也大大降低, 具有较好的分辨率, 稳定性也较好, 在盐脱色液中可以存放半年以上而蛋白带不褪色。

脱色的盐溶液浓度和温度不宜太高: 浓度太高, 凝胶会皱缩, 而且脱色效果会受到削弱; 温度太高, 凝胶也会皱缩和卷曲, 而且蛋白带和背景会一起脱色, 分辨率下降, CuCl_2 甚至在高温下对凝胶还有漂白作用。另外, 各种盐脱色之间有一定差别: SDS-PAGE 的 KCl 脱色背景带浅蓝色, 需要较长的时间才能完全脱干净; 而 CuCl_2 脱色在浓度高时, 由于铜离子本身带有颜色, 凝胶会染上蓝绿色, 且 CuCl_2 在 PAGE 中脱色的灵敏度不高; NaCl 价廉易得, 且不含毒性, 脱色所用时间短, 背景低、灵敏度高, 脱色效果显著。

总之, 本文方法的最佳效果是: PAGE 用 $0.25 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 于 70℃ 下脱色; SDS-PAGE 用 $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 于 50℃ 下脱色。

参考文献

- 郭尧君(1991). SDS电泳技术的实验考虑及最新进展. 生物化学与生物物理进展, 19 (1): 32~37
- 郭尧君(2001). 蛋白质电泳实验技术. 北京: 科学出版社, 54~156
- 肖亚中, 王军, 蒲春雷(2002). 一种简易的聚丙烯酰胺凝胶脱色方法. 生物学杂志, 19 (4): 34~35
- Higgins RC, Dahmus ME (1979). Rapid visualization of protein bands in preparative SDS-polyacrylamide gels. Anal Biochem, 93: 257~260
- Lee C, Levin A, Branton D (1987). Copper staining: a five-minute protein stain for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. Anal Biochem, 166: 308~312