

一种利于蛋白质回收的快速 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳染色-脱色方法

康彬童¹⁾

(中国科学院植物研究所, 北京 100093)

摘要 在实践基础上摸索出一种快速并有利于蛋白质回收的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳染色-脱色方法: 经常用的考马斯亮蓝 R-250 染色液短暂染色后直接用 250 mmol/L KCl 溶液脱色. 这种方法染色-脱色的清晰程度与常规的染色-脱色方法接近, 而且能使蛋白质回收率提高三倍多.

关键词 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 染色-脱色, 蛋白质, 回收

学科分类号 Q942.7; Q946.912

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 和由等电聚焦 (IEF)、SDS-PAGE 组成的双向电泳不仅是分离、分析蛋白质的常用方法, 而且也逐渐成为制备蛋白质的有效手段: 从凝胶中获得的蛋白质可以用于蛋白质的测序或制备抗体等^[1]. 但是现在常用的染色-脱色方法不仅耗时长, 而且由于冰醋酸的作用而不利于蛋白质从凝胶中洗脱回收. 能否发展一种快速并能有效提高蛋白质回收率的实验室常用方法成为从事蛋白质分离、纯化的研究者们感兴趣的问题. 本文通过对比实验对这个问题进行了探讨.

1 试剂与方法

1.1 化学试剂

电泳药品 Tris、甘氨酸、Acr、Bis 为 Serva 产品; 牛血清白蛋白 (BSA) (分析纯) 为上海生物化学研究所产品.

1.2 方法

1.2.1 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳: 按 Laemmli^[2] 的方法进行, 用 SDS-样品溶解液溶解 BSA, 分离胶浓度 12.5%, 浓缩胶浓度为 4%.

1.2.2 染色-脱色方法: 比较下述 3 种染色-脱色方法: a. 染色液 (0.1% 考马斯亮蓝 R-250、50% 乙醇、10% 冰醋酸) 振荡染色 2 h 后, 用脱色液 (5% 甲醇、7% 冰醋酸) 脱色直到背景清晰为止; b. 按 Hon^[3] 的方法, 将电泳后的凝胶先用蒸馏水淋洗, 然后浸入 250 mmol/L KCl 溶液中 10 min, 最后用蒸馏水淋洗; c. 凝胶先用 a 中的染色液振荡染色 20 min, 然后用蒸馏水反复冲洗后, 浸入 250 mmol/L KCl 溶液中, 直到背景清晰为止.

1.2.3 蛋白质电洗脱回收: 用锋利刀片切取含目的蛋白的凝胶后, 将它们放入透析袋中, 加入适量

洗脱液 (25 mmol/L Tris, 192 mmol/L 甘氨酸, 0.5% SDS, pH8.3) 后, 在水平电泳槽中恒流 80 mA 进行电洗脱, 直到凝胶无色为止, 约需 2.5 h. 在洗脱液中按 1:20 (体积比) 加入冷丙酮, 在 -20℃ 静置 30 min 后于 4℃、12 000 g 离心 20 min, 沉淀在室温下放置挥发掉丙酮后加入适量的 SDS-样品溶解液, 用分离胶为 12.5% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检查洗脱效果.

2 结果与讨论

方法 a 是现在常用的 SDS-PAGE 染色-脱色方法, 一般耗时 3~4 h 左右, 凝胶清晰、透明, 如图 1 中 1 所示, 所用蛋白质为牛血清白蛋白. Hon^[3] 曾使用 250 mmol/L KCl 溶液直接染色, 本文引用此法并用图 1 中 1 中相同量的 BSA 做实验, 发现 10 min 250 mmol/L KCl 溶液能使蛋白质染成乳白色, 但与背景的反差较小, 蛋白质难以辨认, 而且显色后, 凝胶放置时间一旦超过 10 min 后, 蛋白质褪色, 更难以辨认 (图 1 中 3). 因此虽然

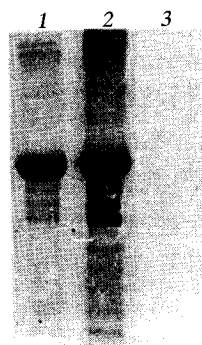


图 1 三种染色-脱色方法的比较

¹⁾ 通讯联系人.

Tel: (010) 62591431-6210, E-mail: zhetong@hotmail.com

收稿日期: 1999-03-18, 修回日期: 1999-09-29

这种方法快速,但因难以辨别蛋白质的轮廓,特别是当分离蛋白质混合物时,就更难以准确切取目的蛋白,显然这对获得高纯度、能用于蛋白质测序的蛋白质制品是不适宜的。

在这两种方法基础上能否找到一种既节省时间,显示蛋白清晰度高、稳定性又强的染色-脱色方法呢?经过对比和重复实验发现:若凝胶先用常规考马斯亮蓝 R-250 进行短暂染色 (20 min),然后经蒸馏水反复冲洗后,用 250 mmol/L KCl 溶液脱色,整个过程仅约 1 h 左右,而显示蛋白质的清晰程度与常规方法相当,只是染色更深一些。图 1 中 2 就是用这种方法对等量的 BSA 染色-脱色后的效果。对双向电泳用这种方法染色-脱色也获得较好的效果 (照片略)。

这种染色-脱色方法不仅快速、清晰度较好,而且还利于蛋白质的回收。我们对方法 a 和方法 c 的染色-脱色方法对蛋白质回收的影响进行了比较。相同量的 BSA 经方法 a 或方法 c 染色-脱色后,主带被切取,在同一洗脱条件下,对这两份蛋白质同时进行电洗脱回收。回收后的蛋白质经电泳分离后用方法 a 进行染色-脱色,所获凝胶如图 2 所示,其中 1、2、3 分别为原蛋白和经方法 c、a 染色-脱色获得的蛋白质。我们对它们进行了定量分析,首先对凝胶进行了扫描,获得了它们的吸收峰 (图 3),然后利用 Gel-pro Analyzer V.3.0 软件对三个吸收峰进行积分面积 (IOD) 计算,所获结果如图 4。从图 4 可以看到,方法 c 比方法 a 多回收蛋白质三倍多。

从以上实验结果可以看到,这种染色-脱色方法快速、有利于蛋白质从凝胶中回收,而且不仅适用于单 SDS-PAGE,也适用于双向电泳,特别适用于快速分离、纯化不知道其他生化特性而只能用电泳方法辨别的蛋白质。我们曾用这种方法大量获得了仅存在于光敏核不育水稻中的特异蛋白 P60,并对它进行了序列分析 (另文发表)。

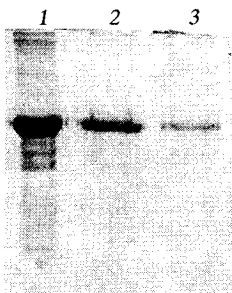


图 2 二种染色-脱色方法对蛋白质回收的影响

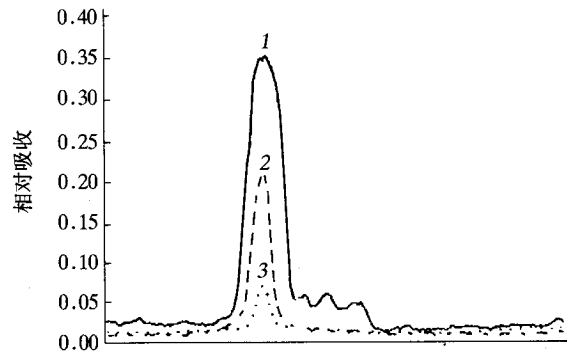


图 3 1、2、3 主带的吸收曲线

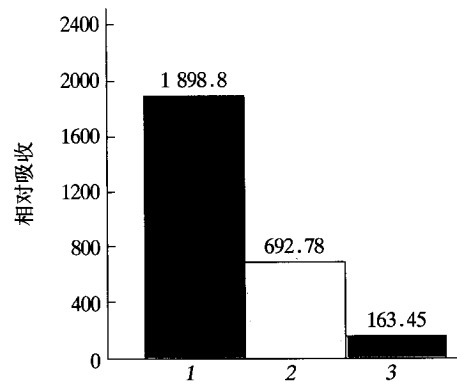


图 4 图 3 中三个蛋白质主峰的积分面积

参 考 文 献

- 1 Ausubel F, Brent R, Kingston R E, 等. 颜子颖, 王海林译. 精编分子生物学试验指南. 北京: 科学出版社, 1998. 329~409
Ausubel F, Brent R, Kingston R E, *et al.* Short Protocols in Molecular Biology. 3rd. New York: John Wiley & Sons, Inc. 1995. 329~409
- 2 Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, **227** (7): 680~685
- 3 Hon W C, Griffith M, Chong P, *et al.* Extraction and isolation of antifreeze proteins from winter rye (*Xecale creata* L.) leaves. *Plant physiol*, 1994, **104** (3): 971~980

A Fast Staining-destaining Method for SDS-PAGE Which Favours the Recovery of Protein. KANG Bin, TONG Zhe (*Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China*).

Abstract A fast staining-destaining method for SDS-PAGE which favours the recovery of proteins was developed: brief staining by Coomassie Brilliant Blue R-250 followed by destaining with 250 mmol/L KCl. The SDS-PAGE stained-destained by this method has almost the same clearance compared with the one stained-destained by the usual method, and the recovery of protein can be enhanced more than three times by this method.

Key words SDS-PAGE, staining-destaining, protein, recovery