

考马斯亮蓝凝胶染色联合近红外成像用于双向电泳前的蛋白质定量

曹嵩^{1,2} 邓文文² 朱欣婷² 胡姗姗² 喻田¹ 刘云^{1,2*}

(¹遵义医学院贵州省麻醉与器官保护基础研究重点实验室, 遵义 563099;

²遵义医学院医学与生物学研究中心, 遵义 563099)

摘要 双向电泳的蛋白质定量由于存在试剂兼容性的问题, 常常需要使用GE或Bio-Rad公司专用的蛋白质定量试剂盒。这类试剂盒价格昂贵且实验操作繁琐, 亟待建立一种准确、快速且廉价的双向电泳蛋白质样品的定量方法。不同浓度的蛋白质样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)产生的蛋白质条带, 经考马斯亮蓝(CBB)染色后能被近红外光激发出不同强度的荧光。利用这一性质, 以牛血清白蛋白(BSA)作为蛋白质量的标准品, 使用Odyssey近红外荧光扫描成像系统绘制标准曲线用于双向电泳蛋白质样品的定量。实验结果表明, 使用“700 channel”, 在1~10 μg的范围内, 蛋白量与荧光强度表现出良好的线性和可重复性。因此, 基于Odyssey近红外成像的考染凝胶定量的方法是一种精确快速可用于双向电泳蛋白质定量的方法。

关键词 蛋白定量; 考马斯亮蓝染色; SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳; 近红外成像; 双向电泳

Protein Quantitation in Pre Two-dimensional Electrophoresis by Near Infrared Imaging of Coomassie Brilliant Blue on Gels

Cao Song^{1,2}, Deng Wenwen², Zhu Xinting², Hu Shanshan², Yu Tian¹, Liu Yun^{1,2*}

(¹Guizhou Key Laboratory of Fundamental Research on Anesthesiology and Organ Protection, Zunyi Medical College, Zunyi 563099, China; ²Research Center for Medicine & Biology, Zunyi Medical College, Zunyi 563099, China)

Abstract Because of the incompatibility of different protein quantitation reagents, special protein quantitation kits produced by GE or Bio-Rad with traditional methods are widely used in protein quantitation for two-dimensional electrophoresis (2-D). However, such kinds of kits are not only expensive but also time-consuming in operation. Hence an efficient but economical method for 2-D protein quantitation is badly needed. As a response to such need, the present research works on the theory that protein bands of diverse densities, first processed by SDS-PAGE and then stained by Coomassie brilliant blue (CBB) G-250, can emit fluorescence with different intensities when scanned by near infrared. Specifically, Bovine serum albumin (BSA) was used as standard protein samples and Odyssey near infrared imaging system (Odyssey) was employed to draw curves to calculate the amount of protein for 2-D experiment. The results showed that within the range of 1~10 μg, the density of BSA protein was linear with the intensity of fluorescence when Odyssey was set at “700 channel”. Moreover, the linear relationship is re-

收稿日期: 2013-01-19 接受日期: 2013-02-26

卫生部卫生公益性行业科研专项(批准号: 200802173)和贵州省社会发展公关项目(批准号: 黔科合SY字[2011]3031)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0852-8609007, E-mail: liyunzy@126.com

Received: January 19, 2013 Accepted: February 26, 2013

This work was supported by the Special Scientific Research Fund for Public Welfare, Ministry of Health (Grant No.200802173) and the Science and Technology Department of Guizhou Province (Grant No.SY[2011]3031)

*Corresponding author. Tel: +86-852-8609007, E-mail: liyunzy@126.com

网络出版时间: 2013-05-14 15:25 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130514.1525.003.html>

producible when retested. This suggests that our method, which is based on the near infrared imaging and CBB G-250 staining, is accurate, efficient and easily operating in protein quantitation.

Key words protein quantitation; Coomassie brilliant blue staining; SDS-PAGE; near infrared imaging; two-dimensional electrophoresis

双向电泳(two-dimensional electrophoresis, 以下简称2-D)技术是蛋白组学研究过程中的核心技术,而上样前的总蛋白定量是该项技术的关键环节之一。常用的蛋白定量方法有BCA(bicinchoninic acid)法和Bradford法(又名考马斯亮蓝法、CBB法),两者都是基于吸光度值的定量方法。由于双向电泳蛋白样品处理过程中所使用的尿素、硫脲、Triton X-100、SDS、NP-40等试剂易与BCA、CBB反应显色,从而影响吸光度值进而影响定量准确性,因此这两种方法都不能用于2-D实验。鉴于以上原因, Bio-Rad公司和GE公司各自研发出专门针对2-D的蛋白质定量试剂盒,但这些试剂盒操作繁琐,对实验者操作要求较高,且试剂盒价格不菲。鉴于此,课题组拟开发一种能用于双向电泳蛋白质样品定量的新方法。有研究报道, SDS-PAGE的蛋白质条带经CBB染色后可被近红外光源激发出荧光^[1]。利用该性质,课题组采用SDS-PAGE与Odyssey红外荧光扫描成像系统(以下简称Odyssey)联用的方法,在准确定量的同时也兼顾了双向电泳蛋白质样品的试剂兼容性。该法稳定可靠,能用于双向电泳蛋白质样品的定量。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人胃腺癌SGC-7901细胞株购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

1.1.2 试剂 牛血清白蛋白(Bio-Rad公司); CBB G-250、CHAPS(Amresco公司); 溴酚蓝、DTT、聚丙烯酰胺(Bio-Rad公司); 尿素、硫脲(Sigma公司)。

1.1.3 仪器 Mini-PROTEAN™ Tetra System(Bio-Rad公司); Odyssey红外荧光扫描成像系统(Li-Cor公司)。

1.2 双向电泳蛋白质样品的制备

以人胃腺癌SGC-7901细胞为实验对象,待细胞长至80%后,用PBS冲洗3次,胰酶消化,培养液(含10%血清)终止消化。充分吹打后,800 r/min离心,弃上清。用PBS重悬后离心弃上清,重复2次。加3 mL双向电泳裂解液(7 mol/L尿素、2 mol/L硫脲、4% CHAPS、65 mmol/L DTT、0.001%溴酚蓝),重悬后于

冰上超声,每次超声10 s,暂停10 s,共计5个循环。4 °C、14 000×g离心30 min。将上清转移至新离心管,分装后于-80 °C保存,待测。

1.3 SDS-PAGE、凝胶染色及脱色

配制5% SDS-PAGE凝胶4块。待其充分聚合后上样: 10 μL蛋白质样品溶液+2.5 μL 5×上样缓冲液。上样后80 V恒压电泳30 min。取5倍于凝胶体积的CBB G-250染液(0.1% CBB G-250、10%乙醇、5%乙酸)于洁净容器中,从玻璃板上轻剥凝胶至染液中浸泡。将容器放入微波炉中加热3 min。倒掉染液,用超纯水冲洗未结合的CBB G-250。取20倍于凝胶体积的脱色液(5%乙酸、10%乙醇)浸泡凝胶,微波辅助脱色10 min后倒掉脱色液。去离子水继续浸泡凝胶,微波辅助脱色直至蓝色蛋白条带清楚而凝胶背景色淡为止。微波炉辅助染色和脱色步骤中,微波炉“火力”均设置为“中低火”档,以防溶液剧烈沸腾造成凝胶碎裂。

1.4 扫描

脱色完全的凝胶用Odyssey扫描。扫描条件设置: 选择“protein gel”,勾选双通道(“700 channel”、“800 channel”,两个通道对应的近红外波长分别为680 nm和780 nm),图片质量“medium”,曝光强度选择3.5。

1.5 收集数据

框选荧光所在区域。如果蛋白条带有拖尾,则将拖尾一并框上。分别记录“700 channel”和“800 channel”的荧光强度。

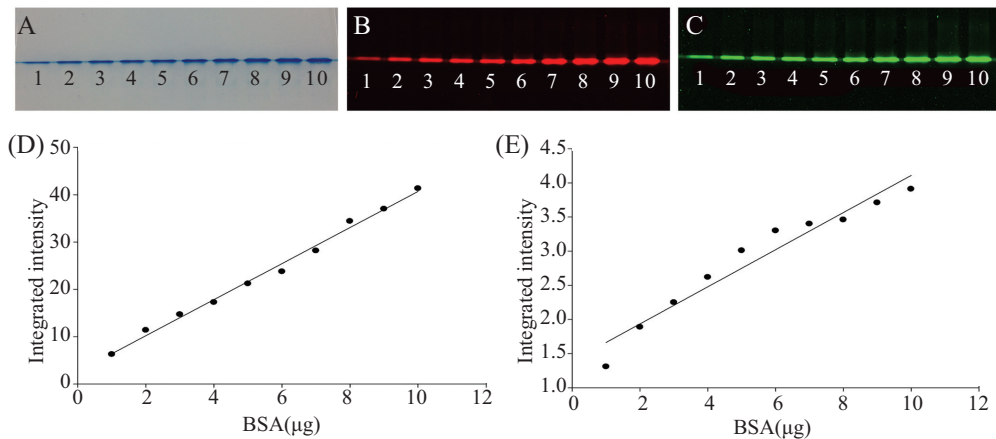
2 结果

2.1 微波辅助染色、脱色

微波炉中低火辅助加热下,考马斯亮蓝能在3 min内将凝胶充分染色,染色效果等同于室温染色2 h以上。微波辅助脱色同样能大幅度缩短脱色时间,脱色10 min效果等同于室温脱色2 h以上。脱色后BSA和SGC-7901蛋白条带均清楚可见、凝胶背景色浅(图1A)。

2.2 近红外波长下扫描凝胶

美国LI-COR公司的Odyssey双色红外荧光成像系统具有680 nm和780 nm激发波长的两个独立的



A: 脱色后的SDS-PAGE凝胶。1-10泳道分别为1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 μg的BSA; B: 凝胶在“700通道”下的曝光图像; C: 凝胶在“800通道”下的曝光图像; D: “700通道”下荧光强度和蛋白量的相关曲线; E: “800通道”下荧光强度和蛋白量的相关曲线。

A: photograph of fully destained gel. BSA amount from lane 1 to lane 10 is 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 μg, respectively; B: fluorescent image induced at “700 channel”; C: fluorescent image induced at “800 channel”; D: correlation curve of BSA amount and fluorescent intensity induced at “700 channel”; E: correlation curve of BSA amount and fluorescent intensity induced at “800 channel”.

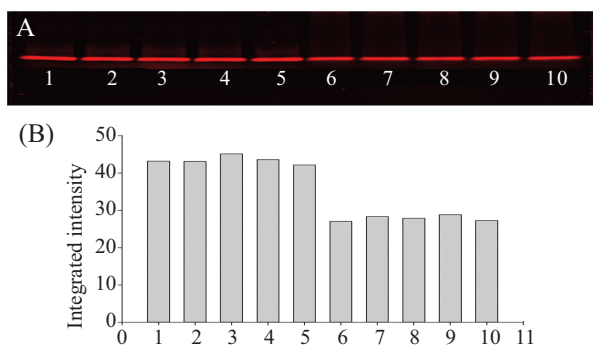
图1 同一块凝胶在“700通道”和“800通道”下的曝光情况及其荧光值与蛋白量的相关情况

Fig.1 The near infrared fluorescent images of the same SDS-PAGE gel induced at “700 channel” and “800 channel”

红外激光器, 能产生720 nm和820 nm的发射光, 然后由两个高灵敏度雪崩式光电二极管检测器同时检测荧光信号。一般的荧光染料不能有效地用于检测膜上的蛋白或者塑料培养皿中的蛋白, 因为它们的激发和检测波长位于可见光谱区, 易形成膜(NC膜、PVDF膜、尼龙膜)的高背景荧光干扰。而在红外波长区检测荧光信号, 具有背景低, 信噪比高的特点。

因此, Odyssey可以用于检测膜上和微孔板上的蛋白或核酸, 并对其进行精确的定量分析。

当CBB G-250未与蛋白质结合时, 在Odyssey下只能发出微弱的荧光, 但当其与蛋白质结合后, 荧光强度会明显增强。利用该原理, 在Odyssey的“700 channel”和“800 channel”下, BSA条带和按2-D蛋白样品制备流程提取的SGC-7901总蛋白条带均能激

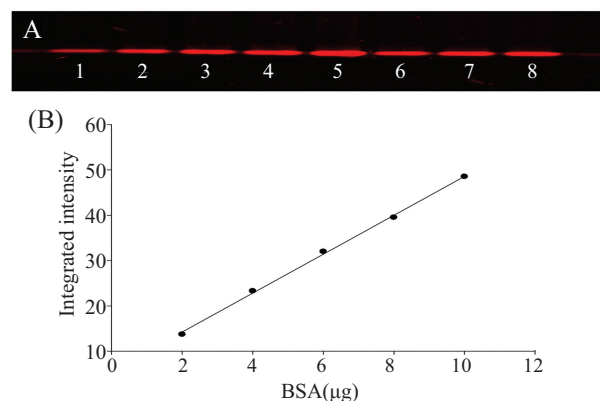


A: 5 μg/条带的BSA和相同量上样体积的SGC-7901蛋白在Odyssey“700通道”扫描后的数字照片。1-5泳道为5 μg BSA蛋白; 6-10泳道为SGC-7901总蛋白; B: 1-5泳道的荧光强度和6-10泳道的荧光强度。

A: digital image of BSA(5 μg) bands and SGC-7901 protein(loaded at the same amount) bands induced at “700 channel” with Odyssey. Lanes 1-5 are loaded with 5 μg BSA. Lanes 6-10 are loaded with whole-cell protein extracted from SGC-7901; B: fluorescence intensity of lanes 1-5 and lanes 6-10.

图2 相同上样量的蛋白质荧光值一致性比较

Fig.2 Fluorescence intensity comparison of the same amount of protein



A: 1-7泳道为BSA, 上样量分别为: 2, 4, 6, 8, 10, 5, 7 μg, 8泳道为SGC-7901总蛋白; B: 1-5泳道的BSA蛋白量和荧光强度建立的标准曲线。回归方程为: $y=4.287x+5.704$, $r^2=0.9984$ 。

A: BSA amount from lane 1-lane 7 is 2, 4, 6, 8, 10, 5, 7 μg. Lane 8 is loaded with whole-cell protein of SGC-7901; B: standard curve from lane 1-lane 5. The regression equation of B is $y=4.287x+5.704$, $r^2=0.9984$.

图3 用BSA建立标准曲线定量SGC-7901蛋白

Fig.3 Quantitation of SGC-7901 protein with the BSA standard curve

发出强烈荧光(图1B和1C)。

2.3 荧光值分析

2.3.1 荧光值的线性考察 在“700通道”下,1-10泳道的BSA量及其荧光值线性关系良好(图1D),回归方程为 $y=3.8105x+2.5813$, $r^2=0.9929$ 。而在“800通道”下,线性关系较“700通道”略差(图1E),回归方程为 $y=0.2716x+1.392$, $r^2=0.9425$ 。

2.3.2 荧光值的重复性考察 如图2所示,同一块凝胶上相同上样量的同种蛋白(BSA和SGC-7901蛋白)荧光值无差异。

2.3.3 相对误差分析及SGC-7901总蛋白的定量 如图3所示,采用5点法作标准曲线,得回归方程 $y=4.287x+5.704$, $r^2=0.9984$ 。同时,另取5 μg 、7 μg 的BSA上样电泳(图3A的6、7泳道),作相对误差分析。经计算,6、7泳道对应的蛋白量分别为5.30 μg 、7.22 μg 。检测值与真实值之间的 Δm 分别为0.30 μg 和0.22 μg ,相对误差分别为6.0%和3.1%。

第8泳道为未知浓度的SGC-7901总蛋白,如图3A所示蛋白条带轮廓清晰,胶上位置与标准蛋白条带相一致,将其荧光值代入回归方程,计算其蛋白量为6.14 μg 。

3 讨论

由于双向电泳蛋白上样量要求较大,故本实验选用1~10 μg 的上样量进行考察,此范围内的BSA,荧光值和蛋白量的相关性良好。实验者发现,当上样量较少时,需要加大曝光来弥补条带荧光强度较弱的不足,否则在框选荧光区域时不好判断界线。CBB是凝胶染色方法中最常用到的染料^[2-3]。对于近十年才兴起的一种非变性凝胶电泳技术——Blue Native PAGE(BN-PAGE)来说,CBB更是不可或缺的原料^[4-5]。但是,聚丙烯酰胺凝胶的CBB染色脱色方法种类繁多,从脱色液的配方到脱色时间,每个实验室各有偏好^[1,6]。微波辅助脱色可以加快染色脱色进程^[7-8]。前期实验结果显示,使用微波炉加热能大幅缩短染色和脱色时间,尤其能缩短染色时间。微波炉加热3~5min的染色效果相当于室温染色2 h。且对蛋白定量准确性无影响,所以本实验染色和脱色步骤皆采用了微波辅助加热。

Bradford^[9]在1976年报道,CBB G-250在与蛋白结合后其最大吸收波长从465 nm转移到595 nm。正是这个发现促成了Bradford蛋白定量试剂盒投入市

场。本实验使用了双通道曝光凝胶来对比两个波长激发后蛋白量和荧光强度的相关性。结果显示,同在680 nm波长下,CBB G-250的荧光强度高于780 nm(5~15倍不等),此结果和Bradford的报道相一致。680 nm波长下的相关曲线的线性好于780 nm处,用680 nm波长激发的荧光强度建立的回归方程定量准确性高于780 nm的。

本实验通过检测与蛋白结合的CBB的荧光强度,间接反映待测蛋白量的多少,可应用于蛋白定量。加之检测值与真实值之间相对误差较小,且不用考虑提取样品试剂与蛋白定量方法的试剂兼容性问题,因此能用于双向电泳上样前的蛋白质定量。该方法定量准确、省时省力,能让研究者不再依赖昂贵且费时耗力的进口2-D蛋白定量试剂盒,可作为2-D实验人员的另一个选择。

参考文献 (References)

- 1 Luo S, Wehr NB, Levine RL. Quantitation of protein on gels and blots by infrared fluorescence of Coomassie blue and Fast Green. *Anal Biochem* 2006; 350(2): 233-8.
- 2 Yasumitsu H, Ozeki Y, Kawasar SM, Fujii Y, Sakagami M. RAMA stain: A fast, sensitive and less protein-modifying CBB R250 stain. *Electrophoresis* 2010; 31(12): 1913-7.
- 3 Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri M, Carnemolla B, *et al.* Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 2004; 25(9): 1327-33.
- 4 Kalivarathan D, Vijayan S, Sridhar B, Krishnamurthy S, Penathur G. In-gel staining of proteins in native poly acryl amide gel electrophoresis using tetrakis(4-sulfonato phenyl) porphyrin. *Anal Sci* 2011; 27(1): 101-3.
- 5 Pink M, Verma N, Rettenmeier AW, Schmitz-Spanke S. CBB staining protocol with higher sensitivity and mass spectrometric compatibility. *Electrophoresis* 2010; 31(4): 593-8.
- 6 Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie brilliant blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 1988; 9(6): 255-62.
- 7 Lill JR, Nesatyy VJ. Microwave-assisted protein staining, destaining, and in-gel/in-solution digestion of proteins. *Methods Mol Biol* 2012; 869: 521-32.
- 8 Marchetti-Deschmann M, Kemptner J, Reichel C, Allmaier G. Comparing standard and microwave assisted staining protocols for SDS-PAGE of glycoproteins followed by subsequent PMF with MALDI MS. *J Proteomics* 2009; 72(4): 628-39.
- 9 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.