

## 技术与方法

## 戊二醛诱发红外荧光用于凝胶中蛋白质的检测与定量

何刚 李京宝 王亮 商澎 蹇爱荣\*

(西北工业大学生命科学院, 西北工业大学特殊环境生物物理研究所,  
空间生物实验模拟技术国防重点学科实验室, 西安 710072)

**摘要** 蛋白质检测与定量分析在生物化学分析中非常重要, 基于戊二醛与蛋白质相互作用后在近红外光谱区域产生非特异性荧光的性质, 且荧光信号强度与蛋白质含量存在线性关系, 建立一种凝胶中蛋白质检测与定量分析的方法。该方法在室温下凝胶染色需要 1 h, 但凝胶经过微波炉加热处理, 整个染色过程可在 3~5 min 内完成, 且无需脱色, 操作简便, 所检测的蛋白质含量低至 7.8 ng, 不失为一种简便、快速有效的蛋白质电泳分析方法。

**关键词** 凝胶电泳; 戊二醛; 红外荧光; 蛋白质定量

十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)可用于检测蛋白质的相对分子质量和纯度, 广泛应用于生命科学研究<sup>[1]</sup>, 目前大多数实验室电泳后主要采用考马斯亮蓝染色和银染色等方法对其蛋白质进行检测与定量分析。1963年, Fazekas等<sup>[2]</sup>就筛选了大量染料用于电泳后的凝胶中蛋白质的定量分析, 结果发现, 在一定浓度范围内, 凝胶中蛋白质与考马斯亮蓝R-250(Coomassie Brilliant Blue R-250, CBB R-250)形成的络合物含量遵循比尔朗伯定律。由于红外荧光具有较高的信噪比, 较强的穿透力而被广泛应用于成像, 临床诊断等<sup>[3-5]</sup>。Shen等<sup>[6]</sup>利用考马斯亮蓝R-250产生的红外荧光成功进行了凝胶中蛋白质的定量分析, 所检测的蛋白质含量低至 10 ng。

戊二醛(Glutaraldehyde)在细胞生物学中常用作电镜制样时样品固定剂, 它是一种双官能团交联剂, 对生物样品固定效果好<sup>[7,8]</sup>。在 1963 年即有研究发现, 戊二醛作为固定剂能够诱发生物样品产生自发荧光<sup>[9-11]</sup>, 该荧光能被硼氢化钠所淬灭<sup>[8]</sup>。1981年, Collins等<sup>[10]</sup>研究了戊二醛固定生物样品时诱发生成的荧光光谱特性, 荧光在所选激发波长 420 nm~560 nm 范围内均有吸收, 在所选发射波长 520 nm~600 nm 范围内均有发射。在前期研究中, 我们利用戊二醛诱发的红外荧光信号强度与细胞数量之间的线性关系建立出一种细胞计数方法<sup>[7]</sup>。在此基础上, 我们还建立出一种凝胶中蛋白质检测与定量分析的方法, 用于实验室电泳后凝胶中蛋白质的检测与定量分析, 报告如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与仪器

牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA, 西安宝信生物公司), 戊二醛(美国 Sigma 公司), 格兰仕 WD800G 型微波炉(广东格兰仕公司), Odyssey 双红外荧光扫描成像系统(美国 LI-COR Biosciences 公司), Biorad GelDoc XR 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 戊二醛凝胶染色** SDS-PAGE 电泳(5%的浓缩胶, 10%的分离胶, 电泳电压 120 V, 电泳时间约 60 min)完毕后, 取出凝胶置于培养皿用蒸馏水洗涤去除残留缓冲液, 然后浸泡于用 1×PBS 配制的浓度为 0.5% 或 1% 戊二醛溶液中, 放入微波炉小火档位(功率约 320 W)加热 3~5 min, 用蒸馏水洗涤凝胶 3~5 次, 最后用 Odyssey 双红外荧光扫描成像系统进行扫描成像(扫描参数设置: 图像分辨率为 169 μm, 图像质量为中等, 扫描焦距为 0.5 mm, 扫描通道为 700 nm, 扫描强度为 5.0)。

**1.2.2 考马斯亮蓝 R-250 凝胶染色** SDS-PAGE 电泳(5%的浓缩胶, 10%的分离胶, 电泳电压 120 V, 电泳时间约 60 min)完毕后, 取出凝胶置于培养皿用蒸馏水洗涤去除残留缓冲液, 然后浸泡于用 50% 甲醇

收稿日期: 2010-08-15 接受日期: 2010-10-08

西北工业大学科技创新基金(No.2008KJ02039)资助项目

\* 通讯作者。Tel: 029-88491671, Fax: 029-88491671, E-mail:

qianair@nwpu.edu.cn

和10%乙酸配制的0.01%考马斯亮蓝R-250中,在摇床上摇动30 min进行染色,蒸馏水洗涤去除多余染色液,用40%甲醇和7%醋酸配制的脱色液进行脱色3~5 h,用蒸馏水洗涤凝胶3~5次,最后用凝胶成像系统进行扫描成像。

**1.2.3 数据分析** 通过Odyssey 2.1系统应用软件进行荧光信号强度值定量分析,实验重复3次,每次3个平行样品,全部数据使用均以GraphPad Prism 5.0软件进行统计分析处理并作图。

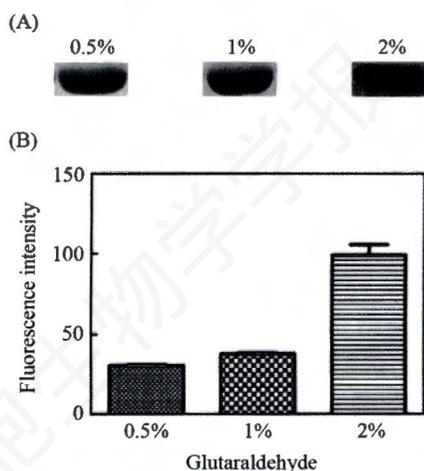
## 2 实验结果

### 2.1 戊二醛浓度对凝胶染色的影响

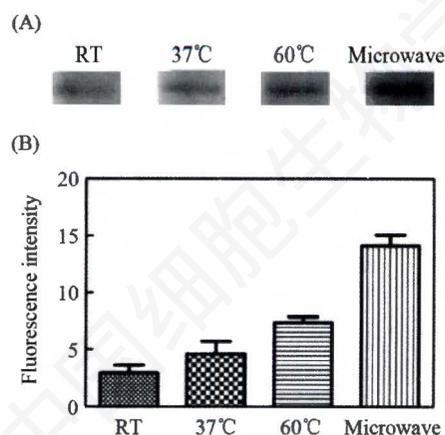
实验中,我们比较了浓度分别为0.5%、1%、2%戊二醛的凝胶染色结果,结果表明,浓度为1%的戊二醛染色荧光信号强度值略高于浓度为0.5%的(图1)。可根据凝胶中蛋白质含量选择适当的戊二醛浓度进行实验,对于凝胶中蛋白质含量较高时,选择0.5%戊二醛,凝胶中蛋白质含量较低时,选择1%戊二醛或者更高浓度。

### 2.2 温度对凝胶染色的影响

为证实温度对凝胶染色效果的影响,我们比较了室温(RT)、37℃、60℃,以及微波炉小火档位(320 W)条件下的凝胶染色结果,其中微波炉处理凝胶时间为3 min,其余条件处理凝胶时间均为10 min。结果表明,随着温度的升高,条带颜色深浅度逐渐增强,荧光信号强度值也逐渐增加,微波炉加热处理的凝胶条带颜色更深,荧光强度值更高(图2)。



**Fig.1 The effect of concentration of glutaraldehyde on staining** All gels were stained in a Petri dish with a glutaraldehyde staining solution. Gels staining were performed under 320 W microwave treatment for 3 min and were loaded 5  $\mu$ g BSA.



**Fig.2 The effect of temperature on staining**

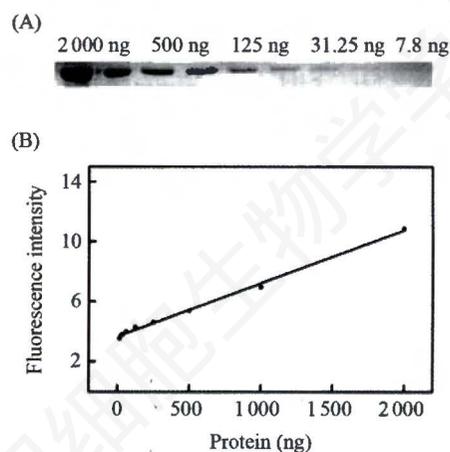
All gels were stained in a Petri dish with a 0.5% glutaraldehyde staining solution. Gels were loaded 1  $\mu$ g BSA.

### 2.3 凝胶中蛋白质含量的定量分析

为证实荧光信号强度与凝胶中蛋白质含量存在线性关系,对牛血清白蛋白标准品梯度稀释(200 ng/ $\mu$ l ~ 0.78 ng/ $\mu$ l),并对结果进行线性回归分析。结果表明,在所检测范围内,其红外荧光信号强度与凝胶中蛋白质含量存在良好一次线性关系( $r^2 > 0.99$ ),能较为准确反映凝胶中蛋白质含量(图3)。

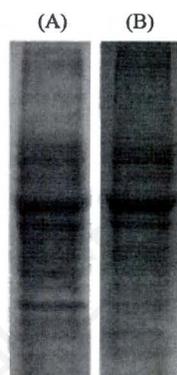
### 2.4 考马斯亮蓝R-250染色与戊二醛染色的比较

我们通过SDS-PAGE电泳从人骨肉瘤MG-63细胞提取的蛋白质,比较了考马斯亮蓝R-250(图4A)染



**Fig.3 Quantitation of BSA in SDS-PAGE gels stained with 1% glutaraldehyde staining solution under 320 W microwave treatment for 5 min**

Gels were loaded with 2 000 ng ~7.8 ng protein. A: imaging by fluorescence is shown. B: the fluorescence response is liner over the range shown. The regression equation is  $y=0.0035x+3.6601$ ,  $r^2=0.9964$ .



**Fig.4 Comparison between CBB R-250 stain (A) and 0.5% glutaraldehyde stain (B)**

Protein extracts from MG-63 cells. The 5  $\mu$ g proteins were loaded; staining and destaining were done as described in the text.

色与戊二醛(图 4B)染色结果, 结果表明: 两种染色方法的蛋白质条带基本一致(图 4)。

### 3 讨论

本文基于戊二醛诱发产生的红外荧光, 建立了一种凝胶中蛋白质检测与定量分析的方法。该方法在室温条件下凝胶染色需要 1 h, 通过微波炉小火档位加热仅需 3~5 min。倘若火力过大或加热时间过长, 则会导致凝胶背景加深, 易变形等缺陷。与常规的考马斯亮蓝 R-250 染色相比, 该方法仅需一步染色过程, 不需要脱色步骤, 大大缩短了实验时间, 可有效地提高工作效率, 染色结果一致。实验所检测凝胶中蛋白质含量为 7.8 ng/带 ~2 000 ng/带, 具有良好的线性关系。该方法染色的凝胶可保存在水中 1~2 d, 荧光信号强度几乎没损失。

随着温度的升高, 条带的颜色逐渐变深。我们推测: 温度的升高, 蛋白质被快速固定, 微波炉加热有利于戊二醛的渗入, 增强并加速了与蛋白质结合, 大大缩短了二者反应时间。

对于凝胶中含量较低的蛋白质, 可适当增加戊二醛浓度, 延长微波炉处理凝胶时间来进行凝胶中蛋白

质的检测与定量分析, 通常使用的戊二醛浓度为 0.5% (用时新鲜配制), 微波炉加热处理凝胶时间为 3 min。

由于微波加热处理凝胶时会有刺激性气味的戊二醛气体逸出, 对眼睛、皮肤和粘膜有强烈的刺激作用, 实验室应有较好的通风条件。

总之, 该方法是一种简便、快速有效的蛋白质电泳分析方法, 能够运用于电泳后凝胶中蛋白质的检测与定量分析。

### 参考文献(References)

- 1 Pal JK, Sarkar A, Katoch B. Detergent-mediated destaining of coomassie brilliant blue-stained SDS polyacrylamide gels. *Indian J Exp Biol* 2001; 39(1): 95.
- 2 Fazekas S, Groth DS, Webster RG, Dwyer A. Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. *Biochim Biophys Acta* 1963; 71: 377-91.
- 3 Kiyose K, Kojima H, Nagano T. Functional near-infrared fluorescent probes. *Chem Asian J* 2008; 3(3): 506-15.
- 4 Frangioni JV. *In vivo* near-infrared fluorescence imaging. *Curr Opin Chem Biol* 2003; 7(5): 626-34.
- 5 Rudin M, Weissleder R. Molecular imaging in drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2(2): 123-31.
- 6 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.
- 7 Li JB, Wang Z, He G, Qian AR, Shang P. Application of glutaraldehyde to in-cell western assay for normalization. *Anal Biochem* 2010; 398(2): 254-6.
- 8 Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, Zeller R. Fixation and permeabilization of cells and tissues. *Cold Spring Harb Protoc* 2008; No.6: pdb.top36.
- 9 Sabatini DD, Bensch K, Barnett RJ. Cytochemistry and electron microscopy: the preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. *J Cell Biol* 1963; 17(1): 19-58.
- 10 Collins JS, Goldsmith TH. Spectral properties of fluorescence induced by glutaraldehyde fixation. *J Histochem Cytochem* 1981; 29(3): 411-4.
- 11 Frank RD, Dresbach H, Thelen H, Sieberth HG. Glutaraldehyde induced fluorescence technique (GIFT): A new method for the imaging of platelet adhesion on biomaterials. *J Biomed Mater Res* 2000; 52(2): 374-81.

## Glutaraldehyde Induced Infrared Fluorescence for Detection and Quantitation of Protein in Polyacrylamide Gels

Gang He, Jing-Bao Li, Liang Wang, Peng Shang, Ai-Rong Qian\*

(Key Laboratory for Space Biosciences and Biotechnology, Institute of Special Environmental Biophysics, Faculty of Life Sciences, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, China)

**Abstract** Protein detection and quantitation is very important in biochemical analysis. Reaction of glutaraldehyde with proteins results in nonspecific infrared fluorescence at some excitation wavelengths, and the intensity of fluorescence was directly proportional to protein content over the range of 7.8 ng to 2 000 ng for our test protein, BSA. We took advantage of this property to develop a new method for detection and quantitation of proteins in polyacrylamide gels. The staining can be performed at room temperature, but is faster when gels exposure to microwave. Staining requires only 3~5 min, don't need destaining process. The method can be used for routine analytical purposes due to its sensitivity, speed and simplicity.

**Key words** SDS-PAGE; glutaraldehyde; infrared fluorescence; protein quantitation

---

Received: August 15, 2010      Accepted: October 8, 2010

This work was supported by the Science and Technology Innovation Fundation of Northwestern Polytechnical University(No. 2008KJ02039)

\*Corresponding author. Tel: 86-29-88491671, Fax: 86-29-88491671, E-mail: qianair@nwpu.edu.cn