

# 介绍一种在蛋白质的聚丙烯酰胺凝胶电泳及双向电泳中应用的氨银染色法\*

林斯骏 何全品 宋秋宝

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

1979年 Switzer<sup>[1]</sup>、Merrill<sup>[2]</sup>等人相继发表了硝酸银染色蛋白质比较马斯蓝染色或放射自显影的效果更佳之后,入江伸吉<sup>[3]</sup>、上林みあき<sup>[4]</sup>、Oakley<sup>[5]</sup>等人又进一步证实并加以改良或简化。

硝酸银染色蛋白质的作用机理目前尚未搞清,一般认为是以银离子( $\text{Ag}^+$ )或氨银络离子( $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ )的状态,渗入凝胶之中与蛋白质(或十二烷基硫酸钠的复合物)结合<sup>[3]</sup>或附于蛋白质分子表面,然后用甲醛作为还原剂使金属银析出,现出黑色条带或点子。

我们近年来在做染色质非组蛋白蛋白质的提取及其鉴定工作中应用了双向电泳,感到考马斯蓝染色非组蛋白蛋白质不够灵敏,由于同位素标记(放射自显影)的条件尚未具备,所以对硝酸银染色法进行了摸索并作了一些改进,现将对比染色的结果介绍如下。

## 材 料 和 方 法

### 一、材料

1. 低分子量的标准蛋白质(Pharmacia 产品)。
2. 正常 Wistar 大鼠肝染色质非组蛋白蛋白质,系按 MacGillivray 方法<sup>[6]</sup>制备和提纯。

### 二、方法

#### (一)、电泳

1. 十二烷基硫酸钠(SDS)一聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE),使用10%和15%丙烯酰胺的线型梯度凝胶,电泳缓冲液是 SDS-三羟甲基氨基甲烷-甘氨酸缓冲液,每块凝胶板电流20毫安,电泳时间为270—300分钟;标准蛋白质分为500、50、5和0.5毫克等四种浓度。

2. 双向电泳基本上按照 O'Farrell 方法<sup>[7]</sup>进行,非组蛋白蛋白质为50—100微克。

### 二、染色

1. 银染法:上述电泳结束后,取下凝胶板按下列步骤进行染色

(1) 固定于50%三氯醋酸溶液中过夜。

(2) 次日用水充分洗掉三氯醋酸,待洗涤水近中性时换为50%甲醇—12%乙酸溶液,振荡120分钟。接着用10%乙醇—5%乙酸溶液洗2次(30分钟/次)。10%乙醇洗3次(5分钟/次)。

(3) 4%多聚甲醛—1.43%磷酸钠溶液,PH7.3,振荡30分钟。用10%乙醇溶液进行充分洗涤,大约换5次溶液(20分钟/次)。

(4) 在吡啶硝酸银溶液(a.3.5%硝酸银溶液100毫升加0.5%硝酸铜溶液1.5毫升混匀; b.吡啶4毫升加无水乙醇8毫升;混合a、b,两液搅匀即可)中,振荡30分钟。

(5) 在氨银溶液(a.9.7%硝酸银溶液30毫升; b.0.36%苛性钠溶液100毫升加浓氨水45毫升混匀后,取出22.2毫升; c.把a、b两液混和后加入20%乙醇55毫升)中振荡10—20分钟。

(6) 移入第一还原液(10%甲醛液1.25毫升加1%柠檬酸3毫升加乙醇50毫升再加重蒸馏水至500毫升)中,换2—3次(溶液混浊了换新鲜的溶液),每次约10分钟。

(7) 移入第二还原液(10%甲醛溶液2.5毫升加1%柠檬酸2.5毫升加乙醇50毫升再加重蒸馏水至500毫升)中,换2—3次,每次10分钟左右,然后以蒸馏水漂洗3—4次,终止反应。

(8) 在漂白溶液(a.37克氯化钠加37克硫酸铜加重蒸馏水850毫升滴入浓氨水,不断搅拌,使溶液呈现深蓝色为止,再加蒸馏水至1000毫升; b.218克硫代硫酸钠加重蒸馏水至1000毫升;使用时a、b.两液等量混合)中退色,此液一般稀释3—5倍使用。蒸馏水充分漂洗以终止脱色反应。然后保存于水中(临时保存)或干片保存。

2. 考马斯蓝染色:电泳结束后将凝胶片

(1) 固定于甲醇—醋酸—水(5:1:5的体积之比)溶液中过夜。

(2) 在0.025%考马斯蓝溶液(0.025克 Cooma-

\* 王少玲同志参加部分工作。

ssie brilliant blue R 250 加 100 毫升上述固定液) 中浸泡 3 天。

(3) 保存于 7% 醋酸溶液中。

## 实 验 结 果

### 一、SDS—PAGE

低分子量的标准蛋白质由磷酸化酶 b (分子量 94000)、白蛋白(分子量 67000)、卵清蛋白(分子量 43000)、碳酸酐酶(分子量 30000)、胰蛋白酶抑制剂(分子量 20000)和乳白蛋白(分子量 14400)等六种蛋白质混合而成的, 这

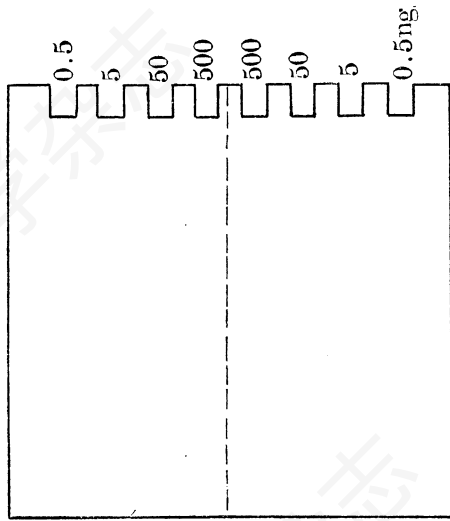


图 1 电泳结束后将凝胶片按虚线所示切成两个半片

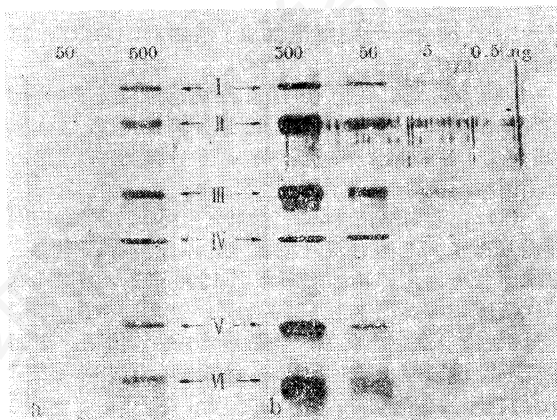


图 2 标准蛋白质电泳凝胶片用

a. 考马斯蓝染色法和 b. 银染法染色结果的比较

- |                             |                            |
|-----------------------------|----------------------------|
| I 磷酸化酶 b $9.4 \times 10^4$  | II 白蛋白 $6.7 \times 10^4$   |
| III 卵清蛋白 $4.3 \times 10^4$  | IV 碳酸酐酶 $3.0 \times 10^4$  |
| V 胰蛋白酶抑制剂 $2.0 \times 10^4$ | VI 乳白蛋白 $1.44 \times 10^4$ |

种混合标准蛋白质 通过 SDS—PAGE(10%和 15%浓度的线型梯度凝胶), 电泳结束后, 取凝胶片, 切成两个半片(图 1), 分别做硝酸银染色和考马斯蓝染色。结果(如图 2); 考马斯蓝染色法, 在每种蛋白质量为 500 毫微克时均能染上, 在 50 毫微克仅部分种类蛋白质染上, 显示不同蛋白质有不同的灵敏度, 如清蛋白染色的灵敏度为 30 毫微克, 血清蛋白 20 毫微克<sup>[8]</sup>。银染法可以染色 5 毫微克以上的六种蛋白质分子, 甚至 0.5 毫微克的碳酸酐酶也能染上。以上说明银染法比考马斯蓝染色法灵敏 50—100 倍。

### 二、双向电泳

正常 Wistar 大鼠肝染色质非组蛋白蛋白质, 首先作第一向等电点聚丙烯酰胺凝胶电泳, 把各种不同的蛋白质按其所带电荷不同分开, 即按不同的等电点( $P^I$ ) 分开, 经过 SDS 样品缓冲液处理后, 再作第二向 SDS—PAGE, 按蛋白质分子大小不同分开, 结果如图 3 所示, 考马斯蓝染色法有 150 多蛋白质点子, 这些点子一般含蛋白质量较多, 点子大, 颜色也浓,

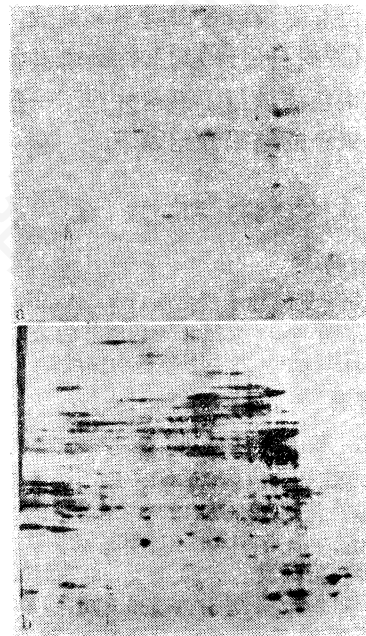


图 3 双向电泳的凝胶片用

a. 考马斯蓝染色法和 b. 银染法染色结果的比较

但是蛋白质量少的点子, 难显示出颜色; 银染法有400—500点以上, 比考马斯蓝染色法的灵敏度高达4—5倍, 以上结果同1976年Peterson和McConkey用同位素标记HeLa细胞后, 非组蛋白蛋白质双向电泳获得450点子的结果相仿<sup>[9]</sup>。比入江伸吉1980年作大鼠肝染色质蛋白质的双向电泳的银染法的200—300点子的结果更为灵敏。

## 讨 论

### 一、固定液

根据Merril方法, 固定凝胶片的固定剂是50%甲醇—12%醋酸溶液, 经过银染色后, 发现凝胶片中电泳的前沿有一条较宽的区带, 着色较深, 影响凝胶片的清晰度。后来我们改用了50%三氯醋酸溶液固定, 凝胶片电泳的前沿的黑色区带消失了, 但凝胶片还有些“云雾”状的阴影, 如果把两者结合起来, 先用50%三氯醋酸溶液固定, 再浸泡于50%甲醇—12%醋酸溶液之中, 结果凝胶片背景透明, 黑点清晰; 这种现象可能由于三氯醋酸能溶解去两性离子载体(Ampholine), 十二烷基硫酸钠等与某些蛋白质形成的复合体, 其中有的络合物是较难溶解的<sup>[8]</sup>。

### 二、氨银溶液

在使用氨银溶液之前, 凝胶片需经多聚甲醛处理, 使甲醛能与(蛋白质分子的)许多不同的功能基团相结合<sup>[10]</sup>或遮蔽某些基团, 暴露某些基团, 以利于银的着色, 但此步骤必须洗净甲醛, 否则加入硝酸银之后, 顷刻产生棕褐色的沉淀物, 即银离子被甲醛还原为金属银, 影响硝酸银染色的效果。

氨银溶液是银染法的重要环节, 硝酸银加浓氨水后, 使溶液含有氢氧化氨络银 $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]\text{OH}$ 、硝酸氨络银 $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]\text{NO}_3$ 和硝酸银等, 以银离子 $\text{Ag}^+$ 、氨银络离子 $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ , 状态与蛋白质分子结合或银附在染色体上, 附着于蛋白质表面。为此, 先用低浓度硝酸银, 然后用高浓度硝酸银处理, 使蛋

白质点充分接触银离子, 在还原剂作用下变为金属银, 由棕褐色变为黑色的点子。

在配制氨银溶液时, 要掌握加氨的份量, 氨加多了, 着色浓, 氨加少了, 不能把硝酸银和氢氧化钠反应形成棕色沉淀物转变为氨银络合物, 影响染色的效果。

此步骤耗硝酸银较多, 费用稍大, 现改用9.7%硝酸银(原法含19.4%硝酸银)也能达到同样染色的效果。如果上述银染法的步骤再简化, 硝酸银浓度降至0.8—1%, 也有一定着色效果。但是用过的氨银溶液不能再利用, 否则就染不好片子。

### 三、漂白溶液

正常大鼠肝染色质非组蛋白蛋白质的分子量绝大部分在 $9.4 \times 10^4$ 以下(另文介绍), 分子种类多, 每种分子含量有多有少, 因而所形成的点子也有大小。为了使蛋白质分子含量少的点子也可以显色, 需要在还原溶液中增加浸泡时间。这样虽然会使整块凝胶片着色过深, 但如果掌握了退色的条件, 则既能保住已染色的点子不致于退掉, 又可使凝胶片背景清晰。按照Merril方法进行漂白退色, 由于硫代硫酸钠的浓度高, 硫代硫酸根多, 与银反应的机会也多, 形成了 $[\text{Ag}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_3]^{-4}$ , 退色快, 即使迅速用水漂洗, 退色反应依然继续进行, 比较难控制。根据我们的经验应把硫代硫酸钠减半使用, 使退色减缓, 以利控制退色的程度。

## 小 结

硝酸银染色蛋白质比考马斯蓝染色蛋白质的灵敏度要高, 染标准蛋白质提高50—100倍; 染非组蛋白蛋白质则提高为4—5倍即有400—500点。银染法还具有样品用量微, 分辨率高, 见效快, 工作时不需防护, 不需专用仪器设备等优点, 是一种染蛋白质的好方法。

## 参 考 文 献

- [1] Switzer, R. C. III, et al. 1979, *Anal. Biochem.* 98: 231—237.
- [2] Merril, C. R., et al. 1979, *P. N. A. S.* 76:

- 4335—4339.
- [3] 入江伸吉, 1980, 生化学, 52: 411—413.
- [4] 上林みゆき, 堀米垣好, 菅野 浩, 1980, 生化学, 52: 600.
- [5] Oakley, B. R. et al, 1980, *Anal. Biochem.*, 105: 361—363.
- [6] MacGillivray, A. J., et al., 1972, *Biochem. Biophys. Acta*, 277: 384—402.
- [7] O'Farrell, P. H. 1975, *J. Biol. Chem.*, 250: 4007—4021.
- [8] 刘培南等, 仪器分析及其在分子生物学中的应用, 第三册, pp. 297—348.
- [9] Peterson, J. L., E. H. McConKey, 1976, *J. Biol. Chem.*, 251: 548—554.
- [10] 马仲魁, 郑仁凤译, 1959, 组织化学, pp 11—14.

## 聚丙烯酰胺凝胶电泳胶板干燥保存法

顾 琪

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离鉴定核酸及蛋白质等生物高分子, 甚多优点, 可惜胶板不易保存, 稍为干燥, 即成粉末。文献报道用多孔硅橡胶夹于板两侧, 负压吸干。也有人用纤维素薄膜覆盖后, 置室温自然干燥, 但费事费时。

我们引用生物组织块或组织切片逐级脱水, 以避免破裂变形的原理, 将电泳后的凝胶板染色后泡入50%、70%、80%、90%、95%、100%各级浓度的酒精中, 获得干燥后的凝胶板, 不发生碎裂现象, 但有线性收缩(35—38%), 而各区带间距比例不变。浸泡时间视凝胶厚度大小而定。13.8厘米×6.7厘米, 1—2毫米厚度的胶板, 于各级酒精中浸泡时间约30—45分钟, 如振摇可缩短需要的时间。这样总共脱水时间只需半天。在更换各级酒精时, 胶板逐渐由透明转变为乳白色, 在一种浓度酒精中浸泡时, 变色先从边缘开始, 逐渐向中心延展。故判断浸泡时间是否足够, 可视凝胶板上的透明度是否达到里外均一, 胶板的弹性也随之消失, 最后变成坚硬, 表面光亮, 类似于白色磁

砖。此时将它从酒精中取出, 置于玻璃板上, 四角用白纸垫衬后, 以胶布固定于玻璃板上, 置于干燥器内保存, 使在酒精逐渐挥发过程中, 空气中水蒸汽不被胶板吸入。如将此板置于潮湿空气中, 由于不均匀地吸水, 将出现局限性透明区域, 此时如再放入干燥器, 仍能回复乳白色, 不透明, 非但图谱变形且严重失真。附图是脱水后干板的照相, 是小牛胸腺总组蛋白的电泳图谱, Commasce 蓝染色, 背景为白色, 条纹清晰, 色泽鲜明。这一方法可为同位素标记样品的电泳胶板作放射自显影提供方便。是否适用于梯度凝胶板的干燥, 尚待验证。

