

凝胶中痕量蛋白质和核酸的银染色法

林栖凤

(武汉大学病毒学系, 武汉)

SILVER STAINING FOR DETECTION OF NANOGRAM AMOUNTS OF PROTEINS AND NUCLEIC ACIDS IN GELS

Lin Qi-feng

(Department of Virology, Wuhan University, Wuhan)

高灵敏度的蛋白质银染色法最初是由 Switzer^[1]和 Merril^[2]于1979年建立的,其后 Oakley^[3]、入江伸吉等人^[4]加以改良和简化,使检测的灵敏度提高到 ng 水平,可与放射自显影媲美。后来 Somerville 和 Wang^[5]将该法扩大应用于聚丙烯酰胺凝胶中 DNA 和 RNA 的染色,山崎健一等^[6]又将该法推广到琼脂糖凝胶中 DNA 和 RNA 的染色。银染色法的突出优点是灵敏度高,用于蛋白质染色,比考马斯亮蓝染色敏感约 50—100 倍;用于 RNA 染色,比亚甲蓝染色敏感 100—1000 倍;用于 DNA 染色,比溴化乙锭染色敏感 10—20 倍。现将该法的要点和笔者的经验介绍如下。

方 法

电泳完毕后,聚丙烯酰胺凝胶和琼脂糖凝胶在染色前的处理略有不同。聚丙烯酰胺凝胶(厚度以不超过 1 mm 为宜)不需经过任何处理,便可直接染色。琼脂糖凝胶板由于较脆易破,在染色前须经过干燥处理。将凝胶板置鼓风烘箱内 85℃ 干燥约 1 小时,使其厚度减至约 1 mm,并增加其强度,然后在 10% 乙醇中浸泡 30 分钟,使凝胶稍稍润湿膨胀。

应用于聚丙烯酰胺凝胶和琼脂糖凝胶电泳中的蛋白质、DNA、RNA 的银染色法,现在已衍变出多种方法,但归结起来不外乎铵银法和铬银法两类,其中铵银法又可分为甲醇固定法和戊二醛固定法。

本文 1985 年 7 月 20 日收到

1. 铵银染色(甲醇固定)法^[4, 7]。

(1)将凝胶板放在50%甲醇-10%乙酸(或者25%异丙醇-10%乙酸)中固定30分钟以上,或放置过夜(核酸染色可省去这一步骤)。

(2)用10%乙醇-5%乙酸洗涤三次,每次约10分钟。

(3)用10%乙醇洗三次,每次5分钟。

(4)在4%多聚甲醛-1.43%砷酸钠(用HCl调pH7.2—7.4)溶液中振荡30分钟。用10%乙醇充分洗涤,大约5次,每次10分钟。

(5)在吡啶硝酸银溶液(AgNO₃ 3.5克溶于100毫升重蒸水中,加入0.5%Cu(NO₃)₂溶液1.5毫升,混匀,再加入吡啶4 ml和无水乙醇8 ml,混匀。该溶液若密封保存于冷暗处,可反复使用2—3次)中,振荡30分钟。

(6)在氨性硝酸银溶液(在0.36%氢氧化钠溶液100ml中加入浓氨水45ml,混匀后取22.2毫升加到30毫升9.0%硝酸银溶液中去,此时棕色沉淀应全部消失,然后加入20%乙醇55ml)中,振荡10—20分钟。

(7)将凝胶移入还原液I(0.025%甲醛-0.005%柠檬酸-10%乙醇)中,更换溶液2—3次,每次2分钟。

(8)移入还原液II(0.05%甲醛-0.005%柠檬酸-10%乙醇)中,更换溶液2—3次,每次5分钟,使区带显色至适当黑度。立即用蒸馏水漂洗,终止反应。胶片可短期保存于水中,或制成干片长期保存。

(9)如果凝胶表面生成银镜,或者区带染色太黑,可用漂白溶液适当脱色,再用水充分漂洗。漂白溶液的配制:(a)37克氯化钠和37克硫酸铜溶于850ml重蒸水中,在不断搅拌下滴加浓氨水至生成的沉淀完全溶解,溶液呈深蓝色为止,再加蒸馏水至1000ml。(b)218克硫代硫酸钠加蒸馏水溶解并用水稀释至1000ml。将a, b等体积混合即成漂白液。使用时一般稀释2—10倍。

2. 铵银染色(戊二醛固定)法^[3, 8]

(1)将凝胶在5%戊二醛溶液中固定1小时以上。用蒸馏水充分漂洗。

(2)在新鲜配制的氨银溶液(加1.4ml浓氨水于21ml 0.36% NaOH中,然后在搅拌下缓缓加入4 ml 19.4% AgNO₃溶液,待棕色沉淀消失后,加蒸馏水至100ml)中,浸泡约15分钟。用蒸馏水洗涤。

(3)在0.005%柠檬酸-0.019%甲醛溶液中显色至适当深度。用蒸馏水漂洗并保存于水中。

3. 铬银染色法^[9, 11]

(1)凝胶按方法1之(1), (2)处理后,在0.0034 M重铬酸钾-0.0032 N硝酸中漂泡约7分钟。用蒸馏水洗涤。

(2)在0.012 M硝酸银溶液中,用20W日光灯照射15—20分钟。

(3)加入0.28 M碳酸钠-0.01%甲醛溶液浸泡1分钟,然后换0.28 M碳酸钠-0.05%甲醛溶液,使区带显色至适当深度(约2分钟)。

(4)立即用5%醋酸定影10分钟,再用水洗。

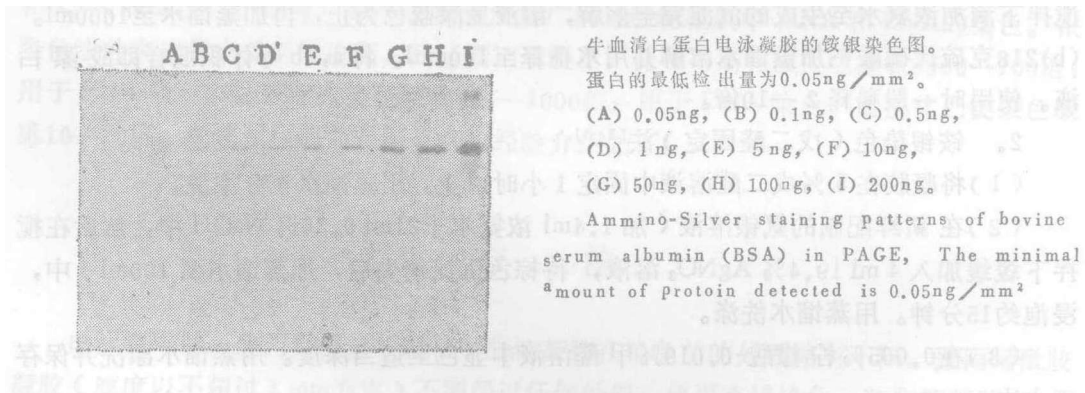
二、结果与讨论

蛋白质、核酸银染色法的确切机理尚不十分清楚,一般认为,蛋白质银染色的基本原理是利用浸入凝胶内的 Ag^+ 或 $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ 与蛋白质形成盐或络盐,而后被甲醛还原析出黑色的金属银粒^[4]。重铬酸钾为媒染剂,可使着色加深。铬银法中的曝光强度是影响灵敏度的重要因素^[10]。核酸的银染色机制与蛋白质的银染色机制相同,可能是由于核酸碱基中的氨基与银离子结合形成稳定化合物而引起的^[6]。

由于该法能同时对核酸和蛋白质进行染色,因此当蛋白质样品中可能含有核酸,或核酸样品中可能含有蛋白质时,对银染色结果的解释应持慎重态度,必要时应将银染色图谱与考马斯亮蓝、溴化乙锭或亚甲蓝的染色图谱进行认真地分析比较。

上述三种方法的灵敏度和重现性相似。以小牛血清蛋白质为例,每条区带的检出量能达到0.5—1 ng(图1)。蛋白质的银染色比通常采用的考马斯亮蓝染色要敏感数十倍至100倍(图2),但后者具有操作简便,价格低廉、重现性好等优点。用甲醇固定的铵银法操作手续较麻烦,但染色后凝胶背景较浅,谱带较清晰(图3)。

银染色法的缺点是硝酸银的耗费较大,经多次试验将文献[3,4]中的19.4% AgNO_3 改为9%,仍能达到同样的染色效果,甚至降为1%仍有一定的着色效果。另外将文献[3]的戊二醛10%改为5%或1%,并将固定时间延长为1小时以上,取得了同样效果,而且降低戊二醛浓度还有利于其后的水洗操作。



操作中的注意事项:

(1)由于银染色法的灵敏度高,所有器具最好先用50%硝酸洗净。使用的蒸馏水应由玻璃蒸馏器蒸馏。操作时勿使手接触凝胶,否则指纹将被染色造成污染。为了防止凝胶粘附在容器上,溶液的量必须充足,而且每一步骤均须缓缓振摇。

(2)各洗涤步骤必须充分。在加入铵银溶液之前,必须将甲醛、戊二醛及 Cl^- 离子完全除去,否则加入硝酸银之后,顷刻产生棕色沉淀,将影响银染色效果,甚至导致失败。

(3)氨银溶液若长期放置可能形成有爆炸性的 AgNH_2 , 因此必须在使用前配制,

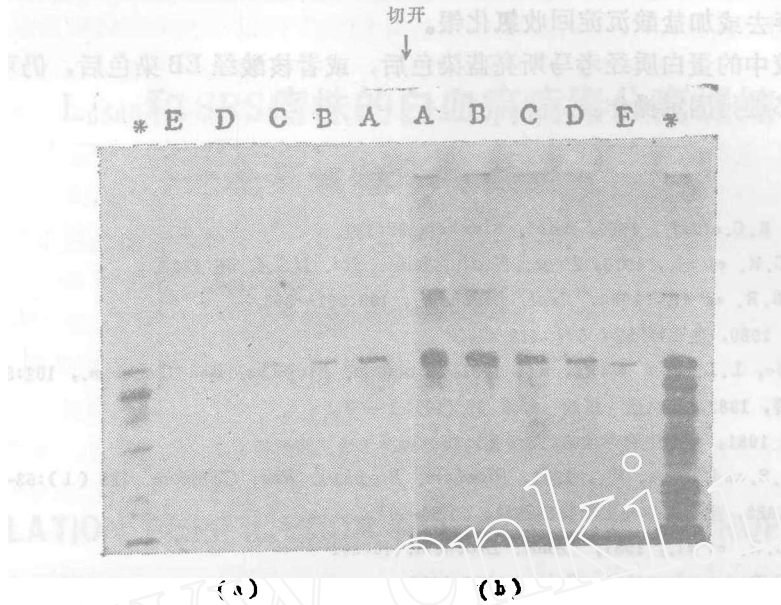


图2 染色方法的比较。电泳后将凝胶切成两半，凝胶a用考马斯亮蓝染色，凝胶b用铬银法染色。
“*”号表示几种标准蛋白，其他的为牛血清白蛋白。

(A) 250ng, (B) 100ng, (C) 50ng, (D) 25ng, (E) 1ng.

Comparison of staining techniques. The gel was cut into half, after electrophoresis, Gel a was stained with coomassie brilliant blue, gel b was stained with the chrome-Silver staining technique, “*” symbol represent the standard proteins, the others are BSA.

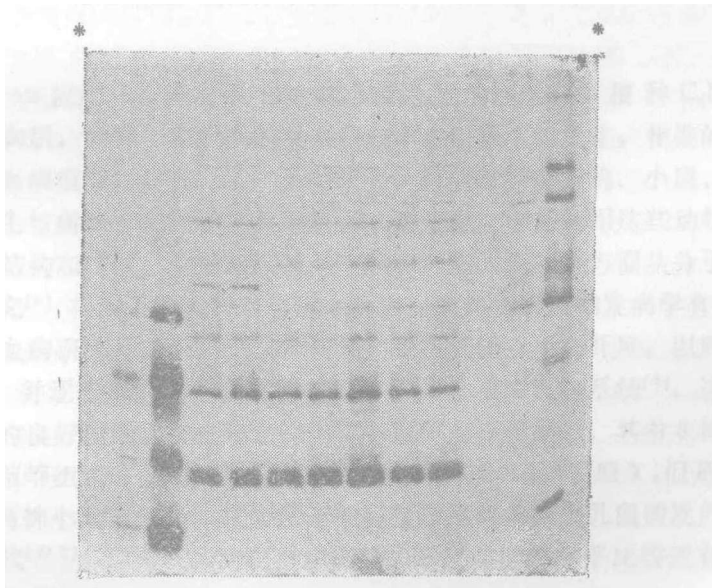


图3 大肠杆菌蛋白质凝胶电泳的铬银染色图。(“*”号表示标准蛋白)
Ammino-Silver staining patterns of E.coli proteins in PAGE (“*” symbol represent the standard proteins).

使用后立即弃去或加盐酸沉淀回收氯化银。

(4)凝胶中的蛋白质经考马斯亮蓝染色后,或者核酸经EB染色后,仍可再进行银染色,但不必进行固定操作。

参 考 文 献

- [1] Switzer, R.C. et al., 1979, *Anal. Biochem.* 98:231.
- [2] Merril, C.R. et al., 1979, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76:4335.
- [3] Oakley, B.R. et al., 1980, *Anal. Biochem.*, 105:361-363.
- [4] 入江伸吉, 1980, *生化学* 52(6):411-413.
- [5] Somerville, L.L. and Wang, K., 1981, *Biochem. Biophys. Res Commun.*, 102:53-58.
- [6] 山崎健一等, 1982, *蛋白质 核酸 酵素* 27(10):1-3.
- [7] 林斯骏等, 1981, *细胞生物学杂志*, 3(2):33-35.
- [8] Laura, L.S. and Kuan, W., 1981, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120(1):53-58.
- [9] 张向明, 1983, *生物化学与生物物理进展*, 3: 63-64.
- [10] Merril, C.R. et al., 1981, *Anal. Biochem.* 110:201.
- [11] Merril, C.R. et al., 1981, *Science* 211:1437.