

一种改进的双色 SDS-PAGE 凝胶和可视化上样电泳方法

盖颖 王文祺 蒋湘宁

(北京林业大学生物科学与技术学院)

摘要: SDS-PAGE 电泳是蛋白质分析和研究中的重要高效手段。由于分离胶、浓缩胶与电泳缓冲液以及空气都是无色透明的物质,在胶的制作和点样过程中仅仅通过浓缩胶相与缓冲液水相或空气相对光的折射来准确判断点样孔的位置并进行点样操作,因而比较困难。该文介绍1种在浓缩胶中添加颜色染料,使浓缩胶显现颜色,以此可视化区分浓缩胶中点样孔(井)位置的方法,可以准确而高效完成点样操作,使传统的 SDS-PAGE 点样过程通过折光性来判断变为可视化准确判断,提高点样效率和电泳质量。

关键词: 蛋白质分析, 双色可视化上样, SDS-PAGE 电泳

中图分类号: Q503 文献标识码: A 文章编号: 1000-1522(2006)01-0103-04

GAI Ying; WANG Wen-qi; JIANG Xiang-ning. **An improved dual-color SDS-PAGE gel and visible-sample-loading electrophoresis method.** *Journal of Beijing Forestry University* (2006)28(1):103-106 [Ch, 9 ref.] College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, 100083, P. R. China.

SDS-PAGE is a very powerful and effective method in protein analysis. Sometimes it is difficult to locate the sample wells and spaces between them, because the isolation gel, concentration gel and electrophoresis buffer are transparent and colorless and they could only be identified and distinguished by light refraction in the process of sample loading. This paper introduces a new method in which dye is added into the concentration gel to make it different by resulting in a dual-color phases of SDS-PAGE gel. With this method, it is very easy to see the loading wells by eyes. The process of sample loading can be finished in an accurate and efficient way and electrophoresis quality can also be improved by visible color border among phases between wells and gel.

Key words protein analysis, dual-color visible loading, SDS-PAGE electrophoresis

SDS-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳^[1]方法

自1964年诞生以来,由于其简便易行、分辨率高、适用性广而广为生物化学与分子生物学研究与教学使用,并得到不断改进和完善^[2-5]。通常情况下 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳使用一种不连续的缓冲液系统。在这一系统中,凝胶分为低浓度的浓缩胶和高浓度的分离胶,蛋白质分子在电泳过程进行的分离中既有凝胶的分子筛效应又有电泳分离的电荷迁移效应^[3]。电泳时凝胶中的样品里的 SDS 多肽复合物在电场的作用下沿移动的界面迁移。浓缩胶的作用是使样品在分离胶界面迅速富集形成一个极薄的层面,极大地浓缩样品的体积。当样品浓缩到分离胶界面后

开始真正的电泳分离。

传统 SDS-PAGE 方法首先是在蛋白质 SDS-PAGE 胶灌制好以后通过浓缩胶与电极液或空气对光的折射来判断点样孔的位置用于点样,根据浓缩胶与分离胶的浓度差对光的折射来判断浓缩胶与分离胶的界面^[4]。通过对光的折射来分辨点样孔和胶的界面,常常由于经验和环境有时比较困难。因此,准确分辨出点样孔的位置来提高上样的准确性和效率,是获得完美 SDS-PAGE 电泳结果的关键之一。

无论是湿法上样还是干法上样都会遇到估计和判断点样孔位置和点样孔通顺状况的问题。湿法上样往往在电极液中拔梳子,看不到梳子是否

收稿日期: 2004-11-20

http://journal.bjfu.edu.cn

基金项目:“973”国家重大基础研究计划项目(G1999016005)。

第一作者: 盖颖, 硕士。主要研究方向: 分子生物学。电话: 010-62338063 Email: gaiying1981@yahoo.com.cn 地址: 100083 北京林业大学 736 信箱。

责任作者: 蒋湘宁, 教授, 博士生导师。主要研究方向: 树木分子生物学。电话: 010-62338063 Email: jiangxn@bjfu.edu.cn 地址: 100083 北京林业大学生物科学与技术学院。

被垂直拔出、点样时准确定位上样孔困难等问题,主要是因为浓缩胶、分离胶、电极缓冲液及空气等都是无色透明物质,仅仅只能依靠它们之间对光的折射产生的界面来估计和判断。而干法上样还需用水冲洗梳子孔,用滤纸吸干孔内的液体,比湿法上样还要麻烦。虽然电泳技术在不断改进和完善,并在生命科学的研究中得到广泛普及应用^[6-9],但双色可视制胶电泳的方法仍未见报道。

本方法通过在浓缩胶中加入适当量的染料使浓缩胶带上颜色,使之形成双色可视SDS-PAGE胶,通过有颜色的浓缩胶与无颜色的电泳液来准确定位点样孔的位置并进行准确高效的点样操作,改进与完善SDS-PAGE电泳方法并实现方法可视化,希望对从事SDS-PAGE电泳工作的研究人员有所参考。

1 试验材料

1.1 仪器和材料

Bio-Rad Mini Protein II电泳仪,HE-Taq蛋白。

1.2 试 剂

丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、SDS、过硫酸铵、溴酚蓝、冰醋酸、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、盐酸、甘油、巯基乙醇、甘氨酸、考马斯亮蓝R-250、乙醇、四甲基乙二胺(简称TEMED)、分子量标准物质。

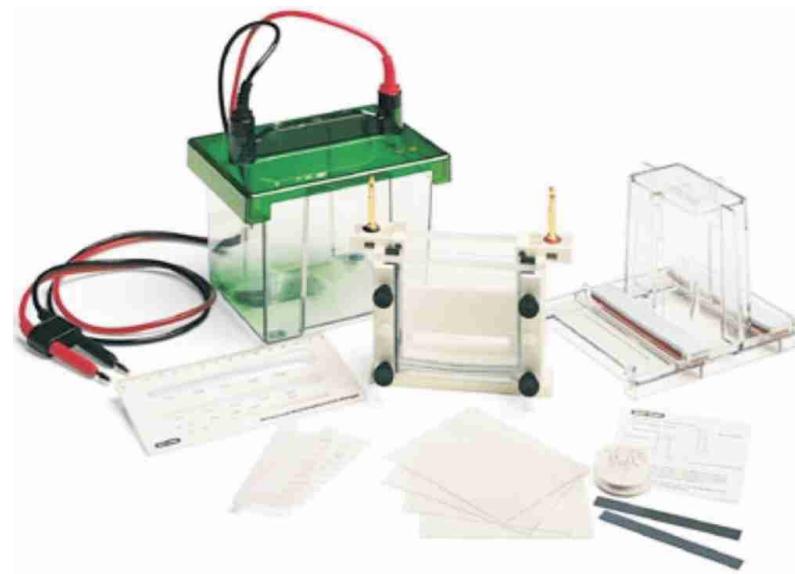


图1 Bio-Rad Mini Protean II电泳仪的电泳槽部件

FIGURE 1 Apparatus of Bio-Rad Mini Protean II electrophoresis

1)制胶时,可以实现可视化拔梳子操作,保证梳子正确垂直拔出。由于有染料颜色引导可视化操作,即使出现了偏差也可以得到及时纠正。

2)上样时,可以很方便地辨别出点样孔道的位置,明显提高点样效率与点样质量。

2 试验方法

1)8%分离胶的制备:30%丙烯酰胺胶液2.7mL;分离胶缓冲液2.5mL;10%SDS0.1mL;水4.6mL;10%过硫酸铵溶液100μL;TEMED6μL。

2)4%样品浓缩胶的制备:30%丙烯酰胺胶液0.65mL;浓缩胶缓冲液1.25mL;10%SDS0.1mL;水3mL;10%过硫酸铵溶液50μL;TEMED5μL;少许溴酚兰染料。

3)将分离胶灌入两块玻璃板之间,放置约30min,待凝聚后将上层水去尽吸干,然后在分离胶上倒入浓缩胶,灌满,稍后插入样品梳(如图2)。待浓缩胶凝聚后,在上下贮槽中倒入电泳缓冲液,取出样品梳,用微量注射器吸取10μL样品至凹形凝胶样品槽。从图3中可以看到呈蓝色的浓缩胶与无色的分离胶形成鲜明的对比。电泳上样时,由于浓缩胶有明显的蓝色背景,而梳齿所在的点样孔无色,因此每个孔道清晰可见。

上样、电泳、染色和脱色过程均按Frederick^[5]方法进行。

3 结果与讨论

本方法在向浓缩胶中加入少许溴酚蓝使浓缩胶带上颜色,有效地解决了以下问题:

3)经试验,向浓缩胶中加入丫啶橙、苏木色精、甲苯胺蓝、红四氮唑及中性红,也能使浓缩胶带上不同颜色,同样起到双色可视效果。从电泳过程中对界面的迁移和电泳后染色对胶的分析可知,双色胶除了在浓缩胶中增加了颜色外,对制胶、电泳、染色和

电泳结果均无不良影响,由于有色和无色相间可以清晰地分辨出点样孔的位置,而极大地提高了点样

效率和点样质量,从而提高了电泳质量,获得完美的电泳结果。

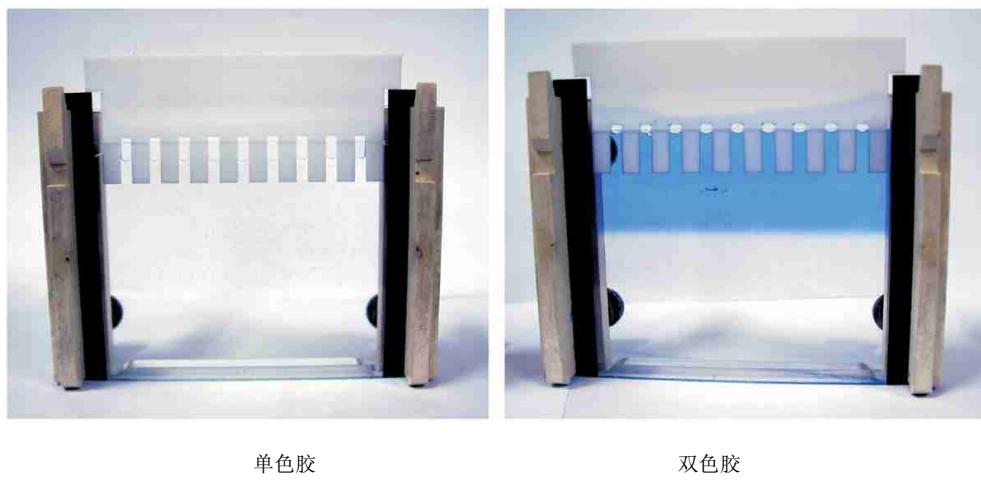
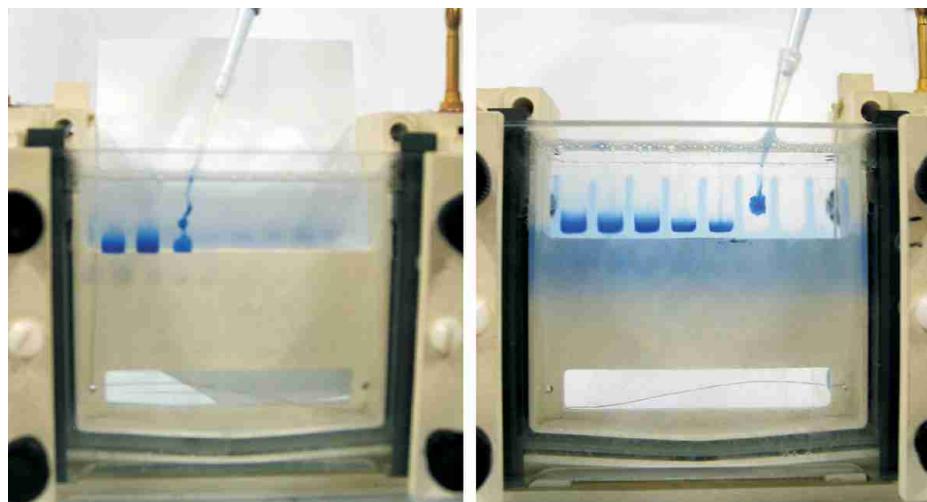


图 2 单色胶与双色可视化胶比较

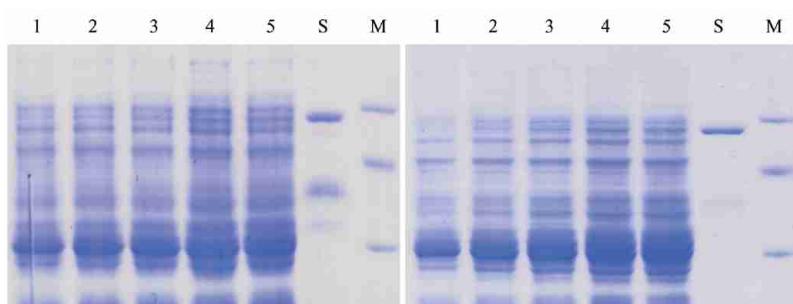
FIGURE 2 The comparison between single-color gel and dual-color gel



左图:单色胶,很难分辨出浓缩胶与分离胶的界面及上样孔
右图:双色可视化胶,清楚地分辨出浓缩胶与分离胶及上样孔的位置

图 3 单色胶与双色可视化胶在点样过程中比较

FIGURE 3 The comparison between single-color SDS-PAGE and dual-color SDS-PAGE during the process of loading samples



左图:单色胶(S 为未经透析的样品 M 为分子量标记) 右图:双色可视化胶(S 为经透析的样品 M 为分子量标记)

图 4 单色胶与双色可视化胶电泳结果

FIGURE 4 The electrophoresis results of single-color SDS-PAGE and dual-color SDS-PAGE

致谢 该研究得到北京林业大学研究生培养基金资助,特致谢忱。

参考文献

- [1] ORNSTEIN L. Disc electrophoresis I: background and theory [J]. *Ann NY Acad Sci*, 1964, 121: 321-349.
- [2] DAVIS B J. Disc electrophoresis II: method and application to human serum protein [J]. *Ann NY Acad Sci*, 1964, 121: 404-427.
- [3] WILSON C M. Staining of proteins on gels: comparison of dyes and procedures [J]. *Methods Enzymol*, 1983, 91: 236-247.
- [4] LAEMMLI U K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. *Nature*, 1970, 227: 680-685.
- [5] AUSUBEL F M, BRENT R, KINGSTON R K. *Short protocols in molecular biology* [M]. New York: John Wiley & Sons Inc Press, 1995, 10: 11-26.
- [6] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. *Molecular cloning: A laboratory manual* [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 18: 47-53.
- [7] 陆海, 吴薇, 曾庆银, 等. 大肠杆菌 BL21(DE3) 中表达重组蛋白的研究 [J]. 北京林业大学学报, 2001, 23(6): 1-4.
LU H, WU W, ZENG Q Y, et al. The expression analysis of recombinant protein in *Escherichia coli* BL21(DE3) [J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2001, 23(6): 1-4.
- [8] 朱青松, 刘中华, 陈雪梅, 等. 植物 ACC 合成酶在大肠杆菌中高效表达及表达产物活性测定 [J]. 北京林业大学学报, 2001, 23(1): 15-17.
ZHU Q S, LIU Z H, CHEN X M, et al. Over expression of high plant ACC synthase in *Escherichia coli* and activity assay of expressed protein [J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2001, 23(1): 15-17.
- [9] 谷瑞升, 刘群录, 陈雪梅, 等. 木本植物蛋白提取和 SDS-PAGE 分析方法的比较和优化 [J]. 植物学通报, 1999, 16(2): 171-177.
GU R S, LIU Q L, CHEN X M, et al. Comparison and optimization of the methods on protein extraction and SDS-PAGE in woody plants [J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 1999, 16(2): 171-177.

(责任编辑 赵 勃)

北京林业大学承办全英文刊物《中国高等学校学术文摘·林学卷》

为了全面、及时地反映中国高校的科研水平,促进中国高校的科研工作,为国际权威检索系统提供来自中国高校的学术内容,由教育部发起并由高等教育出版社和德国 Springer 出版社联合主办了英文系列刊物《中国高等学校学术文摘》. 该系列刊物涵盖自然科学和人文社会科学的主要学科,按学科成册,内容主要选自国内优秀大学学报和专业期刊最新发表的论文,经编委会再次遴选后翻译成英文出版,并由 Springer 出版社在海外发行.

鉴于北京林业大学在林学领域科研的重要地位和其所代表的期刊编辑部的丰富经验,《中国高等学校学术文摘·林学卷》(Frontiers of Forestry in China: Selected Publications from Chinese Universities)由北京林业大学承办. 该刊为季刊,第一期将于 2006 年 1 月出版.

中国工程院副院长、著名林学家、林业教育学家沈国舫院士担任该刊主编,编委会由国内外林学及相关领域的知名学者专家组成.《中国高等学校学术文摘·林学卷》将主要刊登以下学科的学术论文:森林生态学、森林培育学、森林经理、林木遗传育种、自然保护区学、森林植物学、森林病虫害防治、森林资源信息管理、水土保持科学、木材科学、林产化工、林业经济与政策等.

该刊将致力于提供一个林业科学前沿动态的学术论坛,以此来促进中外林业研究者的全面交流,并突出中国高校在林业领域的巨大贡献. 同时为中国文献数据库提供重要数据来源,为国际著名检索机构 SCI、SSCI、EI 等提供高水平的学术内容. 希望各兄弟院校、与林业相关的期刊编辑部、专家能鼎力支持并积极推荐优秀的中文稿件,一段时间后可以推荐未发表的英文稿件.

联系人: 颜帅、程朋军

电 话: 010-62337605, 010-62337915