

蛋白质电泳中考马斯亮蓝 R-250 染色方法的优化与改进

田孟祥, 余本勋, 张时龙*, 何友勋, 叶永印, 李雪松

(毕节市农业科学研究所, 贵州 毕节 551700)

摘要: 为了优化与改进蛋白质电泳中传统考马斯亮蓝(Coomassie brilliant blue, CBB) R-250 染色法凝胶背景深、脱色时间长、试剂消耗多等弊端, 通过优化试验, 建立了一种简单经济的 CBB R-250 染色方法。与传统方法相比, 该方法在染色液配制中降低了甲醇、冰醋酸的比例, 增加了硫酸铵成分, 从而有效改善了染色效果, 改进后的方法, 染色几乎无背景, 不需专用脱色液, 只需用清水洗涤即可观察效果, 大大缩短了试验时间, 节约了成本, 值得推广应用。

关键词: 电泳; 蛋白质染色; 考马斯亮蓝 R-250; 染色方法; 优化

中图分类号: Q51 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2014)09-0035-03

Optimization and Improvement of Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Method in Protein Electrophoresis

TIAN Meng-xiang, YU Ben-xun, ZHANG Shi-long*, HE You-xun, YE Yong-yin, LI Xue-song

(Bijie Institute of Agricultural Science, Bijie 551700, China)

Abstract: In order to optimize and improve the defects of deep gel background, long decoloration time, more reagent consumeing, etc. in traditional Coomassie blue(Coomassie brilliant blue, CBB) R-250 staining of protein electrophoresis, a simple and economical CBB R-250 staining method was established through the optimization test. Compared with traditional methods, the new dyeing solution reduced the ratio of methanol and glacial acetic acid, and increased the ammonium sulfate components, thus effectively improving the dyeing effect. The new staining method almost had no background-color of gel, did not need the special decoloring solution, and could observe the result after water washing. Obviously, the new staining method greatly reduced the test time and the final costs, so it was worthy to be applied widely.

Key words: electrophoresis; protein staining; Coomassie brilliant blue R-250; staining method; optimization

蛋白质条带染色是十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyAcrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)中不可或缺的步骤, 也是关键的技术环节, 其染色方法有多种^[1], 其中, 以考马斯亮蓝(Coomassie brilliant blue, CBB)染色最受欢迎。CBB 包括 CBB R-250 和 CBB

G-250 两类, 以前者最为常用也极为经典。然而, 传统的 CBB R-250 染色背景深, 导致脱色时间长, 一般需要 1~2 d, 完全脱色清晰则需时更多, 且此过程需多次更换脱色液方能完成脱色工作, 脱色液成本高, 不经济, 操作繁琐, 耗时费力, 不利于批量试验。针对 SDS-PAGE 凝胶常用的 CBB R-250 染色剂, 笔

收稿日期: 2014-07-03

基金项目: 贵州省重大科技专项([2012]6005, [2013]6023-3); 贵州省毕节市科技计划项目([2012]34-3)

作者简介: 田孟祥(1983-), 男, 畲族, 贵州麻江人, 助理研究员, 硕士, 主要从事水稻分子育种研究。

E-mail: tmengxiang@126.com

* 通讯作者: 张时龙(1965-), 男, 穿青族, 贵州织金人, 研究员, 本科, 主要从事作物遗传育种研究。E-mail: bjrice@163.com

者经过不断地探索实践,建立了一种简单经济的蛋白质电泳 CBB R-250 染色新方法,其染色背景浅,几乎无背景,不必专用脱色液,只需用水清洗即可,弥补了传统方法存在耗时多、高成本等的不足,报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 蛋白样品 供试样品为水稻品种毕粳 43、W3660 种子胚乳总蛋白及天根生化科技有限公司生产的低分子量蛋白质 Marker(14.3~97.2 kD)。

1.1.2 染色液配制 称取硫酸铵 15 g,加入约 30 mL 去离子水溶解;0.1 g CBB R-250 溶于 35 mL 甲醇,加入 5 mL 冰乙酸;将以上组分混合,然后加去离子水定容至 100 mL。

1.1.3 主要仪器 DYY-11 型电脑三恒多用电泳仪电源、DYCZ-30B 型单板夹芯式垂直槽、WD-9405B 型脱色摇床,以上仪器均为北京六一仪器厂生产。

1.2 方法

1.2.1 水稻种子胚乳总蛋白提取 水稻种子胚乳总蛋白提取参照田孟祥等^[2-3]的方法进行,单粒种子用碾钵碾成极细的粉末,全部转入 1.5 mL 的 eppendorf 管中,先加入 15 μ L 的 β -巯基乙醇浸润 20 min,然后加入 285 μ L 温浴(65 $^{\circ}$ C)的 SDS-urea 蛋白抽提液(5 mol/L 脲、4% SDS、5% β -巯基乙醇、20% 甘油、100

mmol/L Tris-HCl、pH 值 6.8,少量作为指示剂的溴酚蓝),充分涡旋后室温静置过夜。

1.2.2 SDS-PAGE 蛋白质电泳 SDS-PAGE 蛋白质电泳采用 15% 的分离胶,7.5% 的浓缩胶;上样 10 μ L;浓缩胶使用电压 80 V,分离胶 130 V;指示剂溴酚蓝跑出胶后 30 min 停止电泳。

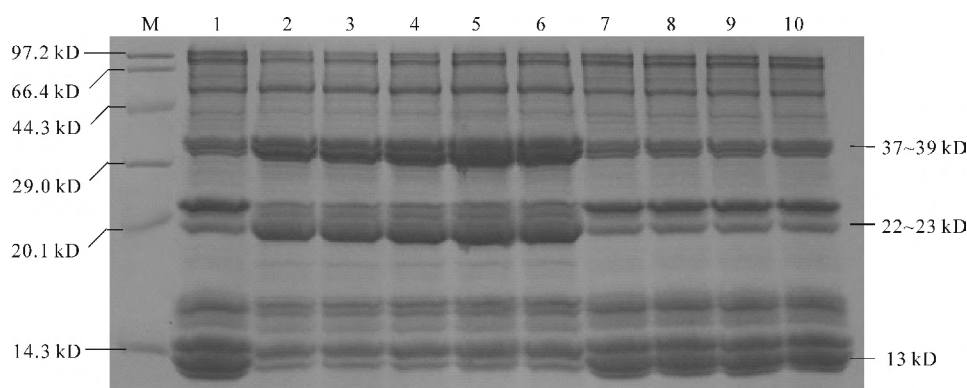
1.2.3 蛋白质条带染色 电泳结束后,取出凝胶,先用去离子水清洗一次,弃清洗液,将凝胶置于染色液中,在脱色摇床上振荡染色 2 h 或者过夜。

1.2.4 脱色 弃染色液,用水清洗数次即可。

2 结果与分析

2.1 染色效果

按照 1.1.2 设计的组分及比例配制出相应的染色液,对 SDS-PAGE 电泳后的蛋白质凝胶进行染色,弃染色液,清水洗涤数次后蛋白条带清晰可见,且几乎无背景,达到了理想的观察效果,能够很好地对蛋白条带进行辨认。图 1 为供试样品水稻胚乳总蛋白 SDS-PAGE 电泳染色后经清水洗涤后的效果图像,其中醇溶蛋白(13 kD)、谷蛋白(22~23 kD、37~39 kD)为水稻胚乳两大主要贮藏蛋白,含量较高,故染色较其他条带深。试验结果表明,该方法无需采用专用的脱色液对凝胶进行脱色,不仅减少了脱色环节,提高了试验效率,而且降低了试验成本,可作为一种较好的替代染色方法。经笔者多次试验验证,在染色时间控制上,染色 2 h 与 24 h 效果相当。



M 为蛋白分子量 Marker; 泳道 2—6 为毕粳 43; 1,7—10 为 W3660

图 1 水稻胚乳总蛋白凝胶电泳染色效果

2.2 优势分析

传统的 CBB R-250 染色液由 CBB R-250、甲醇、冰醋酸及水等按一定的比例组成,染色背景深,使得后续的脱色耗时较长,一般需要 1~2 d,甚至更多时间才能完成脱色环节,且此过程需要多次更换脱色液(冰醋酸、乙醇及水等组成的混合物),消耗染

色液多,试验成本较高。而本试验改良的 CBB R-250 染色液配制新方法,与传统方法相比,降低了甲醇及冰醋酸的比例,额外增加了一定比例的硫酸铵,从组成成分来看,虽然差异不大,但染色结果却大相径庭,改良后的染色液染色后凝胶背景浅,用清水洗涤数次即可进行观察分析。若需要非常干净的背

景,只需加入去离子水后置于微波炉中加热至沸腾,于脱色摇床上脱色几分钟,重复几次即可,由此可见,使用本研究改良的染色液对蛋白凝胶进行染色,大大方便了后续的脱色工作,不需脱色或者只需较短时间脱色,也不用专用脱色液,一方面节省了试验时间,另一方面,在很大程度上降低了试验成本。

3 结论与讨论

蛋白质的 SDS-PAGE 电泳是蛋白质组研究的重要内容,随着分子生物学的不断发展,该技术的应用也在不断地拓展,涉及基础研究及应用研究等诸多方面。笔者利用蛋白质的 SDS-PAGE 电泳进行蛋白组分及浓度分析,可筛选特异种质资源或进行种子纯度鉴定等。鉴于该技术应用的广泛性,如何缩短试验时间、降低成本成为研究者普遍关心的问题,染色及脱色是以上问题的关键,而染色又关系到后续的脱色程序。CBB 染色是蛋白质 SDS-PAGE 电泳染色较为常用的方法。对 CBB 染色的改良,为不少研究者所关注,但目前已报道的研究成果仅在 CBB G-250 染色上取得进展,一些研究者^[4-7]利用改良的 CBB G-250 染色方法,在一定程度上节约了试验时间、成本,而作为 CBB 中最经典、最受欢迎的 CBB R-250 染色,并未见相关的报道。笔者通过不断地实践,探索出了简单经济的蛋白质电泳 CBB R-250 染色方法,其蛋白凝胶染色快,背景浅,几乎无

背景,使后续的脱色变得简单,缩短了试验时间,也节约了成本,是一种节本增效的新方法,推广应用前景较好,可为使用 CBB R-250 进行蛋白染色提供重要参考。

参考文献:

- [1] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 2 版. 北京:科学出版社,2005:63-69.
- [2] 田孟祥,陈涛,张亚东,等. 水稻 57H 突变体 *glup-t* 的遗传分析与基因定位[J]. 作物学报,2011,37(4):717-722.
- [3] 田孟祥,陈涛,张亚东,等. 两个低谷蛋白基因插入缺失标记的设计与验证[J]. 分子植物育种,2010,8(2):340-344.
- [4] 江南,吴开力,黄强,等. 一种简便的考马斯亮蓝 G250 蛋白质染色方法[J]. 生物化学与生物物理进展,2000,27(5):560-561.
- [5] 张瑶,刘芳,张页. 一种改良的蛋白质电泳考马斯亮蓝 G-250 染色方法[J]. 基础医学与临床,2012,32(8):953-955.
- [6] 汪静,袁琳,陈晓明. 蛋白质电泳考马斯亮蓝 G250 染色方法改良[J]. 医学分子生物学杂志,2006,3(6):423-425.
- [7] 胡晓倩,陈来同,赵健. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳染色方法[J]. 中国生化药物杂志,2011,32(2):128-130.

(上接第 27 页)

3 结论与讨论

本研究结果表明,晚播处理小麦的花培组合、常规组合、复交组合的绿苗诱导率均有大幅提高,分别较 CK 提高 1.8、1.0、0.6 个百分点。晚播措施对不同基因型小麦花药培养绿苗诱导率的提高作用主要表现在绿苗分化阶段。晚播处理的花培组合、常规组合和复交组合小麦平均绿苗分化率分别为 24.0%、16.4%、15.0%,分别比 CK 提高了 13.2、12.1、10.2 个百分点。晚播处理 3 种小麦基因型组合的愈伤组织诱导率差异很大,与 CK 相比花培组合的平均愈伤组织诱导率提高了 3.8 个百分点,而常规组合、复交组合分别比 CK 下降 2.8、5.4 个百分点。

由于小麦花药培养中的绿苗诱导是一个非常严格而复杂的过程,影响因素非常多^[6],本研究结果与结论仅限于晚播对花培组合、常规组合和复交组合

3 种不同基因型组合小麦花药培养中绿苗诱导率的影响,影响机制尚需进一步研究和探讨。

参考文献:

- [1] 海燕,康明辉,赵永英,等. 河南省农科院小麦花药培养技术及其应用研究概况[J]. 河南农业科学,2009(9):31-33.
- [2] 海燕,和现昌,黄冰艳,等. 癸培养基的研制及在小麦花药培养中的应用研究[J]. 植物学报,1997,39(8):742-747.
- [3] 海燕,康明辉. 花药培养在小麦育种中的应用[M]//王绍中. 河南小麦育种栽培研究进展. 北京:中国农业出版社,2007:142-155.
- [4] 罗鹏,海燕,刘文轩,等. 播期对小麦花药愈伤组织诱导率的影响[J]. 河南农业科学,1997(9):3-4.
- [5] 海燕,康明辉,郭景战,等. 稀土和基因型对小麦花培绿苗分化率的影响[J]. 华北农学报,2006,21(2):34-36.
- [6] 李景琦,王成社,邹淑芳. 小麦花药培养中白苗的发生和调控措施[J]. 西安联合大学学报,2002(2):19-21.