



银染色法——检测聚丙烯酰胺凝胶中蛋白质和核酸的一种快速方法

严家新 林 乔

(湖北省医学科学院病毒研究室)

聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 是分析蛋白质和核酸样品的有力工具, 在分子生物学及有关学科的基础和应用研究中都获得了越来越广泛的应用。1979 年以来, Switzer^[1] 及其他作者^[2-10] 陆续报道了检测 PAGE 中蛋白质和核酸区带的新方法——银染色法, 使检测的灵敏度提高到 ng 或亚 ng 水平, 可与放射自显影相媲美, 从而进一步扩大了其应用范围。现根据文献和笔者的实践, 对该方法作一综合介绍。

(一) 银染色法的主要优点

1. 快速: 通常可在 2 小时内得到染色结果^[2,5,6]。
2. 灵敏度高: 用于蛋白质染色, 通常比考马斯蓝染色要敏感 100 倍^[2], 可达到 0.01ng/mm²^[5]。用于 RNA 染色, 比亚甲蓝敏感 100—1,000 倍^[7]。用于 DNA 染色, 比溴化乙锭 (EB) 敏感 10—30 倍^[7,8,10]。
3. 简单、经济, 不需特殊试剂和设备。
4. 通用性: 既可用于蛋白质染色, 也可用于核酸 (包括 RNA 和 DNA) 染色, 还可对兼含蛋白质和核酸的样品同时进行染色^[7,8]。

(二) 染色方法

具体方法分铬银染色法和铵银染色法两类, 均可兼用于蛋白质和核酸的染色。

1. 铬银染色法^[5,6]:

- (1) 电泳毕, 将平板凝胶放在 50% 甲醇-12% 乙酸液中固定 30 分钟 (核酸染色可省去这一步)。
- (2) 用 10% 乙醇-5% 乙酸液洗三次, 每次用 200ml 洗 10 分钟, 以去除 SDS。
- (3) 在 200ml 0.0034M 重铬酸钾-0.0032N 硝酸液中浸泡 7 分钟, 不时振动 [省去第 (3) 步

并不影响灵敏度, Herring 等^[9] 也省去了这一步]。

(4) 用蒸馏水 (电阻 > 500, 000Ω) 洗二次, 每次用 200ml 洗 2 分钟。

(5) 将胶板浸在 200ml 0.012M 硝酸银溶液 [预热到 45°C], 在并排 2 根 20W 日光灯下曝光 10 分钟, 再放置 20 分钟, 中间振摇若干次。

(6) 重复第 (4) 步。

(7) 边振动胶板, 边加入 0.28M 碳酸钠溶液, 浸洗约 1 分钟, 倒出, 然后加入 0.28M 碳酸钠-0.2% 甲醛液 (预热到约 45°C), 让区带显色至所需深度 (约 2 分钟)

(8) 立刻用 5% 乙酸定影 10 分钟, 重复第 (4) 步, 再保存于 0.1M 碳酸钠溶液中。

2. 铵银染色法^[2] (每一步骤中都要以 40rpm 或 75rpm 振摇盛凝胶的容器):

(1) 将凝胶放在非缓冲的 10% 戊二醛溶液中固定 30 分钟。

(2) 蒸馏水轻洗 1 小时 (换水 5—6 次)。如时间允许, 最好浸泡过夜。

(3) 将水抽出, 然后加入新鲜配制的氨银络离子溶液; 浸泡时间不要超过 15 分钟, 以避免银颗粒沉积在凝胶表面。100ml 氨银络离子溶液的配制: 加 1.4ml 新鲜的氢氧化铵溶液到 21ml 0.36% 氢氧化钠溶液中, 然后在剧烈振摇下缓缓加入 4ml 19.4% 硝酸银溶液 (加 20g 硝酸银到 100ml 蒸馏水中配成), 有棕色沉淀生成, 待片刻后溶液即澄清, 再加蒸馏水至 100ml; 用后须立即弃去或加盐酸沉淀回收氯化银。为确保染色均匀一致, 并避免凝胶粘附在容器上, 溶液的量要充足, 使凝胶能自由漂浮。

(4) 将凝胶转入新的容器中,用蒸馏水洗2分钟。

(5) 将凝胶转入新的容器中,用新配制的0.005% 柠檬酸和0.019% 甲醛溶液显色。暗的背景开始出现时即将凝胶移出。很淡的区带须待背景略深时才能显现。如染色过度,可用普通的照象用还原剂脱色。

(6) 蒸馏水洗一小时(换水三次),蒸馏水中保存。

笔者的比较实验证明:这两种方法的灵敏度相似,但铬银染色法成本低、方法简便、条件易于控制、重复性更好。

(三) 操作中的注意事项

1. 由于该方法的灵敏度高,所以对器具清洁的要求也相应提高。所用蒸馏水要用玻璃装置制取。操作时要戴手套^[2]。所用试剂、溶剂均要求分析纯。

2. 凝胶厚度不宜超过1mm,通常用0.8mm^[3]。更薄些灵敏度还可提高。为便于操作,可自行设计适当器具或采取适当措施,如专门制作一个有机玻璃夹供转移胶板用^[6]。Herring等^[9]预先用1%Silane 174A的乙醇溶液处理制胶的玻璃板之一,使凝胶能牢固地粘附在该玻璃板上,从而使随后的染色处理变得十分简单。

3. 铵银染色法中所用氯化银溶液变干后有爆炸性,所以使用后要及时处理。

(四) 银染色的原理

大分子银染色的确切机理尚不十分清楚。一般认为,蛋白质银染色法的基本原理是利用银离子与蛋白质以盐或配价络盐的形式结合,而后由甲醛将银离子还原成可见的银颗粒^[6]。曝光强度是影响灵敏度的重要因素^[4]。而核酸的银染色则是由于银离子能与核酸形成稳定的复合物^[9]。Somerville等^[7]猜测银或汞等重金属离子与G-C碱基对的优先结合可能部分解释核酸的染色。

(五) 银染色法的应用

1. 由于该方法的灵敏度高,因而在病毒学等难于获得大量样品的领域将会获得更广泛的

应用。对于某些难于在组织培养中增殖或其基因组不便于用放射性前体标记到很高比活性的病毒或其他微生物的生化 and 遗传学研究,该方法特别有价值^[8]。目前已有不少将该方法用于病毒学基础研究或用于分析临床病毒分离物的报告^[6,8-10]。

2. 银染色法的灵敏度随染色对象本身的特性而略有区别。例如Oakley等^[2]比较了该方法对不同蛋白质的灵敏度,结果如下:牛血清白蛋白,0.07ng/mm²;微管蛋白(tubulin),0.06ng/mm²;卵清蛋白0.1ng/mm²;调钙蛋白(calmodulin),0.25ng/mm²;细胞色素C,0.05ng/mm²。Whitton等^[10]比较了银染色法对来源于不同病毒的各种类型核酸的灵敏度,结果如下:单链RNA(来源于甲型或乙型流感病毒),2ng/区带;双链RNA(来源于人轮状病毒),0.3—0.4ng/区带;单链DNA(来源于 $\phi \times 174$ 病毒),2ng/区带;双链DNA(来源于 $\phi X 174$ 病毒RF,先经Hae III酶解),0.5ng/区带。

3. 由于该方法能同时对核酸和蛋白质进行染色,所以对研究病毒这类蛋白质和核酸的复合体以及其他核蛋白复合体的结构和功能都将是有用的工具^[8]。

4. 也正因为该染色法对核酸和蛋白质都是高度敏感的,所以银染色的蛋白质样品可能实际上含有核酸,反之亦然。这个问题在细胞或亚细胞的粗提物用于凝胶分析时特别严重。因此在解释银染色的结果时应持慎重态度。由于考马斯蓝、溴化乙锭和亚甲蓝分别优先(但也并非绝对特异地)对蛋白质、DNA和RNA染色,所以必要时应将银染色图谱与这三种染料的染色图谱进行认真的比较以确定染色区带的化学本质^[7]。不过在分析蛋白质样品的等电聚焦凝胶中不可能有核酸片段被染色,因为核酸片段的高负电荷远远超出了用于分析普通蛋白质的pH范围^[7]。

5. 银染色法不适用于核酸的制备,因为银染色的核酸不能从凝胶上洗脱出来^[10]。

参 考 文 献

- [1] Switzer, R. C. et al.: *Anal. Biochem.* **98**, 231, 1979.
- [2] Oakley, B. R. et al.: *Anal. Biochem.* **105**, 361, 1980.
- [3] 林斯骏等: 细胞生物学杂志, **3**(2): 33, 1981。
- [4] Merril, C. R. et al.: *Anal. Biochem.* **110**: 201, 1981.
- [5] Merril, C. R. et al.: *Science*, **211**, 1437, 1981.
- [6] 张向明: 生物化学与生物物理进展, 1983年,第3期,第63页。
- [7] Somerville, L. L. and K. Wang: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **102**: 53, 1981.
- [8] Berry, M. J. and C. E. Samuel: *Anal. Biochem.* **124**: 180, 1982.
- [9] Herring, A. J. et al.: *J. Clin. Microbiol.* **16**: 473, 1982.
- [10] Whitton, J. L. et al.: *J. Virol. Methods*, **7**: 185, 1983.