

DOI: 10.3724/SP.J.1096.2010.01423

聚丙烯酰胺凝胶电泳前活性染料与蛋白质共价染色的条件探索

戴彬¹ 吉坤美² 张同艳¹ 彭孝军^{* 1}

¹(大连理工大学精细化工国家重点实验室,大连 116012) ²(深圳大学医学院,深圳 518960)

摘 要 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳前染色法,考察了多种类型活性染料与牛血清白蛋白共价染色的条件。实验发现,活性蓝 KN-R 型标记效果最佳,其优化标记条件为: pH 10.0, 60 ℃, 50 min, 蛋白检出限达 200 ng, 重复性和测试范围内的定量性较好,可在电泳时直接实时观测,作为蛋白标示剂有一定的应用前景。

关键词 聚丙烯酰胺凝胶电泳; 蛋白染色; 活性染料

1 引 言

采用聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)法对蛋白质等样品进行分离^[1],一般需要对分离样品进行染色,以检验分离效果,这主要是利用染料和生物大分子(如蛋白质等)结合生成有色的复合物来实现检测的目的。目前,比较常见的染色方法有后染色法和前染色法。后染色法是在电泳之后进行蛋白质染色的方法,考马斯亮蓝染色和银染法就是最为常见的两种蛋白电泳后染色法^[2]。人们尝试用荧光染料对凝胶中的蛋白质条带进行染色^[3,4],但这种方法需要在 UV 瞬变显示器或紫外灯下观测,不能实时观察分离过程。后染色法需要在电泳之后再进一步染色操作,耗时。前染色法,即预染色法,是在电泳前对蛋白质染色的一种方法。前染色法操作简单方便,而且可在电泳时实时观察蛋白质的电泳分离带。本研究比较了几组商品化活性染料的蛋白质染色条件,可用肉眼直接观测分离过程。活性染料廉价易得,对用作蛋白标示剂^[5]具有一定的意义。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

DYY-8C 型电泳仪(北京市六一仪器厂);TGL-46 高速台式冷冻离心机(湘仪离心机);GTS-2010 型全自动数码凝胶图像处理系统。

X 型活性染料: 艳蓝 X-BR、嫩黄 X-6G、橙 X-GN、艳红 X-3B; KN 型活性染料: 艳蓝 KN-R、翠蓝 KN-G、艳紫 KN-B; M 型活性染料: 深蓝 M-2GE、艳红 M-8B、翠蓝 M-GB、红 M-2BE、深蓝 M-BE,均为商业染料,购自泰兴市锦鸡染料有限公司。

牛血清白蛋白(BSA, 纯度 ≥ 98%, 北京奥博星生物技术有限责任公司); 丙烯酰胺、*N,N'*-甲叉双丙烯酰胺、Tris 缓冲溶液、过硫酸铵(APS)、四甲基乙二胺(TEMED)、甘氨酸、硼酸、硼砂、乙醇、冰醋酸、考马斯亮蓝 G250 均为化学纯试剂。实验用水为二次蒸馏水。

2.2 实验过程

将活性染料与牛血清白蛋白在样品缓冲液中混合,通过聚丙烯酰胺凝胶电泳法对不同染料与蛋白染色的时间(10 ~ 90 min)、温度(40 ~ 80 ℃)和 pH 值(8.18 ~ 10.0)等进行考察,并对结果进行优化。蛋白标记结果以整合密度值(Integrated density value, IDV)半定量分析表示^[6], IDV 值通过 GTS-2010 软件计算得出。

选用 10% 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳(分离胶 10%, 浓缩胶 5%^[7]),电泳时设置初始电压约为 70 ~ 80 V, 初始电流约为 40 ~ 50 mA, 0.5 h 后升高电压至 100 ~ 110 V, 电泳时间约 2 h。电泳后直接观测,需用考马斯亮蓝溶液进行染色,操作参考文献[7]进行。

2010-01-19 收稿; 2010-04-10 接受

本文系国家自然科学基金(No. 20725621)资助项目

* E-mail: daibindlut@yahoo.com.cn

3 结果与讨论

3.1 反应原理

活性染料分子结构主要包括染料母体和活性基团两大部分。按活性基团不同,常见的活性染料可分为:二氯均三嗪型(X型)、一氯均三嗪型(K型)、乙烯砜型(KN型)、一氯均三嗪与 β -乙烯砜硫酸酯基复合型(M型)和双一氯均三嗪型(KE/KD型)。由于K型染料分子中只有一个活泼氯原子,所以反应活性低,通常要在较高温度(90℃以上)的条件进行染色;而KE/KD型染料反应活性与K型相似^[8],本研究中只选取X型、KN型和M型染料进行蛋白质标记。

通常活性染料对蛋白质纤维(丝绸、羊毛)染色的化学反应原理如图1。

血清白蛋白是血浆中含量最丰富的蛋白质之一,能够与类别广泛的内源物质(如代谢产物等)和外源物质(如药物等)进行可逆性的非共价结合,从而发挥其贮存、转运以及机体保护等重要的生理功能。相对于其它生物大分子而言,血清白蛋白(Serum albumin, SA)来源广泛,尤其是人血清白蛋白(Human serum albumin, HSA)和牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA),分子结构信息确知,故而在相关科学研究中作为模型生物大分子而得以广泛应用^[10]。本研究采用价格更为低廉的BSA作为测试蛋白质。

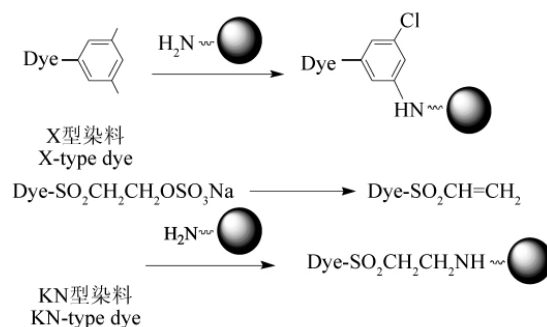


图1 活性染料对蛋白质纤维染色的反应原理^[9]

Fig. 1 Mechanism of chemical reaction between reactive dyes and protein^[9]

3.2 不同染色条件对活性染料标记效果的影响

分别选取艳蓝X-BR、艳蓝KN-R、深蓝M-2GE、深蓝M-BE染料进行染料标记条件的优化。影响活性染料与蛋白质反应的主要条件有反应缓冲液的pH值、反应温度和反应时间^[8]。本研究采用固定其它因素,每次只改变一个因素的实验方法。

3.2.1 反应缓冲液的pH值对标记效果的影响 从活性染料染蛋白质纤维的反应原理可以看出,反应缓冲液的pH值在8~10之间为佳。固定反应温度为60℃、反应时间为30min,取不同pH值(8.18, 8.60, 9.05, 9.50, 10.0)进行标记反应,结果见表1,标记效果如图2。实验表明,随着缓冲体系的pH值升高,蛋白质染色的速度和染色率均有所提高,但是pH值不宜过高,否则会造成染料水解速度的加快,反而削弱了染料的染色。pH=10.0时,标记效果最好。

表1 pH值对标记效果的影响(IDV值)

Table 1 Integrated density values(IDVs) obtained from different pH value

pH	蓝 X-BR Blue X-BR	蓝 KN-R Blue KN-R	蓝 M-2GE Blue M-2GE	蓝 M-BE Blue M-BE
8.18	184552	725322	360774	1466762
8.60	233810	865828	479468	1432022
9.05	306800	1135053	284441	1418285
9.50	304434	1321530	644280	1531860
10.0	321348	1375623	692496	1608332

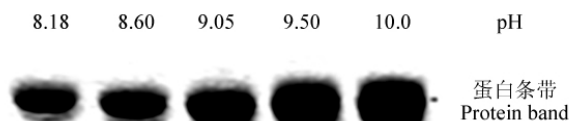


图2 pH值对KN型染料标记的影响(蓝KN-R)(60℃,30min)

Fig. 2 Effect of pH value on KN-type reactive dyes(Blue KN-R) (60℃,30min)。

3.2.2 反应温度对标记效果的影响 从活性染料染蛋白质纤维的反应原理可见,X型染料的标记反应温度在40~60℃之间为佳;KN型和M型染料的标记反应温度在60~75℃之间为佳。同时要考虑温度对蛋白质的影响,温度过高会导致蛋白质空间结构的改变^[10,11]。在本实验中,针对X型染料取5个温度点(30,40,50,60和70℃),针对KN型和M型染料取6个温度点(40,50,60,70,80和90℃)。固定pH=9.50、反应时间为30min标记,结果见表2,标记效果如图3。实验表明,温度升高10℃,反应

速度可提高 2 ~ 3 倍；但是温度过高也会使染料的水解速度加快 , 染色率降低。X 型和 KN 型染料反应温度为 60 ℃ 时 , 标记效果最好；M 型染料反应温度为 70 ℃ 时 , 标记效果最好。

表 2 温度对标记效果的影响(IDV 值)
Table 2 IDVs obtained from different reaction temperature

温度 Temperature (℃)	蓝 X-BR Blue X-BR	蓝 KN-R Blue KN-R	蓝 M-2GE Blue M-2GE	蓝 M-BE Blue M-BE
30	147963	—	—	—
40	159258	771537	482515	1433192
50	176764	964777	685611	1572274
60	198924	1286230	906936	1716960
70	151686	1152162	991600	2540322
80	—	798752	20764353	142513
90	—	320640	—	3201517

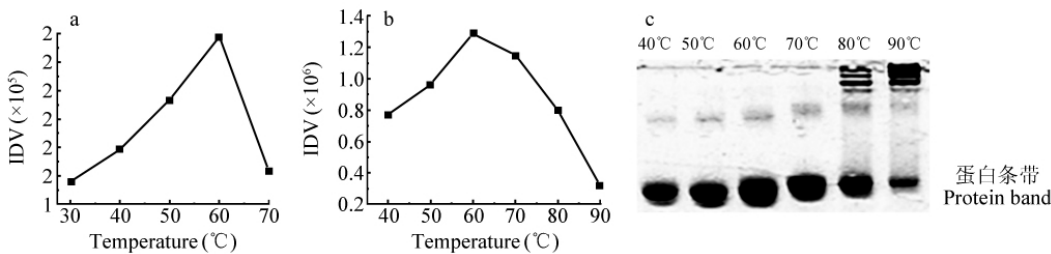


图 3 (a) 反应温度对 X 型染料标记的影响(蓝 X-BR , pH 9.50 , 30 min) ; (b c) 反应温度对 KN 型染料标记的影响(蓝 KN-R , pH 9.50 , 30 min)

Fig. 3 (a) Effect of temperature on X-type reactive dyes (Blue X-BR , pH 9.50 , 30 min) ; (b and c) effect of temperature on KN-type reactive dyes (Blue KN-R , pH 9.50 , 30 min)

3.2.3 反应时间对标记效果的影响 在反应温度影响测试中将反应时间设定在 10 ~ 90 min。固定 pH 值为 9.50 , 反应温度为 60 ℃。在不同反应时间(10 , 20 , 30 , 40 , 50 , 60 和 90 min) 下进行标记 , 结果见表 3。实验表明 , 相对延长蛋白质染色时间 , 能使染料充分扩散 , 染色率有所提高。反应时间较长时 , 标记效果好；染色时间超过 60 min 后 , 染色率基本不再升高 , 而且长时间染色会对蛋白质造成损伤 , 故本实验将反应时间设定为 60 ~ 90 min。

表 3 时间对标记效果的影响(IDV 值)
Table 3 IDVs obtained from different reaction time

时间 Time (min)	蓝 X-BR Blue X-BR	蓝 KN-R Blue KN-R	蓝 M-2GE Blue M-2GE	蓝 M-BE Blue M-BE
10	422699	829572	524190	1341615
20	435744	1119708	611237	1452580
30	481374	1142052	832524	1691579
40	506016	1207032	836784	1532454
50	536988	1223904	912030	1616565
60	577296	1165050	1093369	1781906
90	606265	1191712	1334073	2246400

综上所述 , 活性基团类型不同时 , 染色的反应条件不同 , 如 X-BR 和 KN-R；相同类型的活性染料标记蛋白的条件类似 , 如 M-2GE 和 M-BE。优化的实验条件：X 型染料的最佳标记条件为 60 ℃ , pH 10.0 , 90 min；KN 型染料的最佳标记条件为 60 ℃ , pH 10.0 , 50 min；M 型染料的最佳标记条件为 70 ℃ , pH 10.0 , 90 min。

3.3 蓝 KN-R 染料的蛋白检出限

在对蛋白质的标记过程中发现 , KN 型染料有较好的标记效果。这是因为 M 型染料有两个活性基团 , 易于与两分子的蛋白质结合 , 对蛋白质检测不利。而 X 型染料的活性基团是平面型的三聚氯氰 , 较

KN 型染料的链状乙烯砷活性基团有更大的空间位阻,与蛋白质结合不利。在测试的 KN 型染料中,尤以蓝 KN-R 染料的蛋白标记检出限最低。蓝 KN-R 为蒽醌型染料母体,染料中含有适量的磺酸基。因为染料的标记条件为偏碱性,此时蛋白质呈电负性,过多的磺酸基使染料和蛋白质产生较大的静电排斥,对染料标记不利。反之,磺酸基缺乏,会降低染料的水溶性。

以蓝不同含量蛋白质(1000 500 200 100 80 和 50 ng)效果如图 5。由图 5 可见,蓝 KN-R 型活性染料标记蛋白的检出限为 200 ng,且重复性较好。

为了进一步验证实验结果,将预染蛋白和未染蛋白在同一块胶上进行电泳实验。染料与蛋白质共价结合后会不可避免地改变蛋白质的分子量和带电性质,并进一步导致蛋白质迁移率的变化^[13]。如蓝 KN-R 预染蛋白的迁移率低于未染蛋白(图 5)。

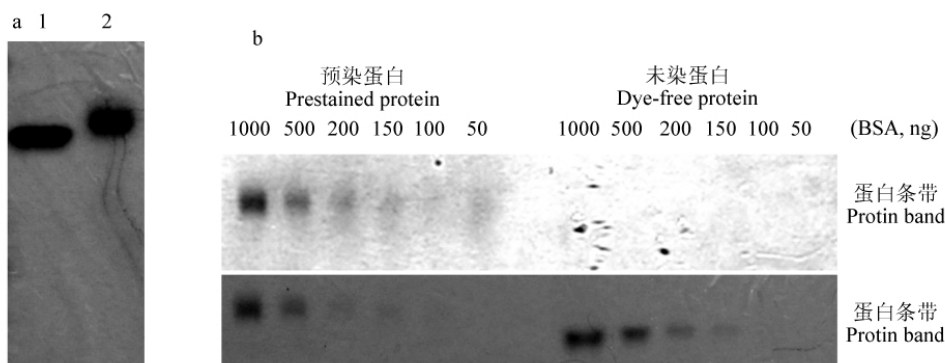


图 5 a. 蛋白染色前后迁移率的变化(泳道 1 为考马斯亮蓝后染蛋白带,泳道 2 为蓝 KN-R 预染蛋白带); b. 蓝 KN-R 预染(上)与考马斯亮蓝后染(下)蛋白检出限对照图,上图由 GTS-2010 型全自动数码凝胶仪拍摄,下图由 canon SX120 相机拍摄

Fig. 5 a. Migration rate of poststained protein (lane 1) and prestained protein (lane 2); b. Prestaining and poststaining pictures of detection limits of BSA (Above is the picture taken by GTS-2010 automatic digital gel image processing system. Below is the picture taken by canon SX120)。

为考察蛋白标记效果与蛋白含量是否有定量关系,以整合密度值 IDV 为纵坐标、蛋白含量为横坐标作图,发现有较好的线性关系($R = 0.99438$),结果见图 6。

本实验表明,采用聚丙烯酰胺凝胶电泳前染色方法,X 型染料的最佳标记条件为: 60 °C, pH 10.0, 90 min; KN 型染料的最佳标记条件为: 60 °C, pH 10.0, 50 min; M 型染料的最佳标记条件为: 70 °C, pH 10.0, 90 min。以活性蓝 KN-R 标记性能最优, IDV 值与蛋白含量在测试范围内有较好的线性关系,是一类比较有应用前景的蛋白质染色染料。

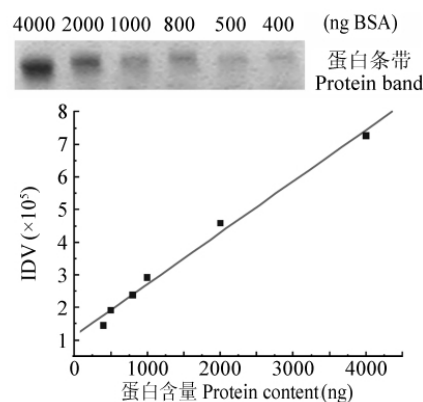


图 6 预染蛋白的定量关系测定

Fig. 6 Quantitative measurement of prestained BSA

References

- 1 LIU Yong(刘 勇), WANG Rong(王 荣), GAO Lan(高 岚), JIA Zheng-Ping(贾正平), XIN Xiao-Ting(辛晓婷), XIE Hua(谢 华), MA Jun(马 骏). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2009**, 37(10): 1494 ~ 1498
- 2 Miller I, Crawford J, Gianazza E. *Proteomics*, **2006**, 6(20): 5385 ~ 5408
- 3 Stasyk T, Morandell S, Bakry R, Feuerstein I, Huck C W, Stecher G, Bonn G K, Huber L A. *Electrophoresis*, **2005**, 26(14): 2850 ~ 2854
- 4 Suzuki Y, Yokoyama K, Namatame I. *Electrophoresis*, **2006**, 27(17): 3332 ~ 3337
- 5 SHANG Zhen-Hua(商振华), YU Yi-Nian(于亿年), GUO Wei(郭 为). *Chinese Journal of Chromatography*(色谱), **1993**, 11(4): 236 ~ 238
- 6 Meyer-Siegler K L, Ordorica R C, Vera P L. *J. Interferon Cytokine Res.*, **2004**, 24(1): 55 ~ 63
- 7 GUO Yao-Jun(郭尧君). *Protein Electrophoresis Experimental Technique*(蛋白质电泳实验技术). Beijing(北京): Science Press (科学出版社), **1999**: 70 ~ 87
- 8 XU Ke-Ren(徐克仁). *Ranse*(染色). Beijing(北京): China Textile Press(中国纺织出版社), **2007**: 78 ~ 97
- 9 Shore J. *J. Soc. Dyers Colour.*, **1968**, 84(8): 408 ~ 412
- 10 Ercelen S, Klymchenko A S, Mely Y, Demchenko A P. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2005**, 35(5): 231 ~ 242
- 11 Lin V J C, Koenig J L. *Biopolymers*, **1976**, 15: 203 ~ 218
- 12 Kuznetsow A N, Ebert B, Lassmann G, Shapiro A B. *Biochim. Biophys. Acta*, **1975**, 379(1): 139 ~ 146
- 13 Meier R J, Steiner M, Duerkop A. *Anal. Chem.*, **2008**, 80(16): 6274 ~ 6279

Optimized Conditions of Protein Prestained with Reactive Dye in Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis

DAI Bin¹, JI Kun-Mei², ZHANG Tong-Yan¹, PENG Xiao-Jun^{*1}

¹(State Key Laboratory of Fine Chemicals, Dalian University of Technology, Dalian 116012)

²(Medical School, Shenzhen University, Shenzhen 518960)

Abstract Reactive dyes are introduced to label bovine serum albumin (BSA) before native polyacrylamide gel electrophoresis. The results show that blue KN-R is the best dye in protein staining and the optimum reaction conditions are pH 10.0, 60 °C, 50 min. The excellent reproducibility and stoichiometry within the test scope were obtained and the detection limit to BSA was 200 ng. The method is sensitive, simple, direct and convenient to be observed by naked eyes in real-time style and has good application prospects for the use as protein label agent.

Keywords Polyacrylamide gel electrophoresis; Protein staining; Reactive dyes

(Received 19 January 2010; accepted 10 April 2010)

《颗粒分散科学与技术》

该书从胶体化学、表面(界面)化学理论、材料学及颗粒技术出发,系统地介绍了颗粒的性质、颗粒间的相互作用、颗粒表面改性、颗粒在不同介质中的分散理论、分散特征、分散方法与技术。该书对分散剂、分散的评价方法、典型设备以及分散技术的应用等也作了介绍。

该书系统地总结国内外有关颗粒分散技术的最新研究成果和生产实践,以促进超细颗粒技术及其相关工业的发展,有助于相关行业人员加深和拓宽对颗粒分散这门多学科、跨行业的新兴综合性科学技术的理解。

该书对超细颗粒加工和颗粒分散相关行业和学科感兴趣的科技工作者参考。

该书由任 俊、沈 健、卢寿慈 著,化学工业出版社出版,定价 28.00 元。