

文章编号 :1009 - 038X(2003)01 - 0093 - 03

重组小分子多肽的 SDS-PAGE 分析方法

邬小兵 , 乐国伟 , 施用晖
(江南大学 食品学院 ,江苏 无锡 214036)

摘 要 :比较了小分子多肽 SDS-PAGE 的各种显色方法 ,结果表明 ,考马斯亮蓝 R-250 染色需要 3 μg 以上的样品 ,相对分子质量 3 000 左右的肽才能得到清晰条带 ,而对含量低的基因工程产物不能显色 .银染可用于检测微量的分子多肽 ,银染过程中用戊二醛和甲醛进行敏化而减少固定时间 ,可显著提高检测灵敏度 ,是检测微量基因工程产物的好方法 .

关键词 :多肽 ;聚丙烯酰胺凝胶电泳 ;银染

中图分类号 :Q 503

文献标识码 :A

Analysis of Low Molecular Peptides by Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

WU Xiao-bing , LE Guo-wei , SHI Yong-hui
(School of Food Science and Technology , Southern Yangtze University , Wuxi 214036 , China)

Abstract : This article described several blotting methods of SDS-polyacrylamide gel electrophoresis to analysis low molecular weight polypeptides. The result showed that when the coomassie brilliant G-250 was used to stain the gel , the band of the peptide with 3 000 molecular weight couldn 't be seen clearly unless its mass is above 3 microgramme. During the process of silver blotting the Glutaraldehyde and the Formaldehyde were used to sensitize the stain process , to reduce the time to fix the polypeptides. The sensitivity was significantly improved to detect low molecular peptides by this method. Thus , silver blotting is an excellent way to detect the tiny amount low molecular peptides produced by recombined microorganism.

Key words : polypeptide ; SDS-PAGE ; silver blotting

20 世纪 60 年代 ,Shapiro 建立了 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)方法之后 ,经过 Weber , Glossmann 和 Douglas 等人多次改进 ,已显示出了在分离、鉴定和纯化蛋白质方面的优越性 ,但对于相对分子质量小于 10 000 的蛋白质 ,传统的 SDS-PAGE 分析方法无能为力 .20 世纪 80 年代 ,Schägger 等建立了以 Tricine 替代甘氨酸作为阴极

拖尾离子分析小分子多肽的方法^[1] .之后 ,许多学者进行了多次改进 .第四军医大学石继红等用凝胶总质量浓度(T)160 g/L ,交联度(C)60 g/kg ,含 6 mol/L 尿素的分离胶分离小分子多肽 ,用考马斯亮蓝 R-250 染色 ,上样量达 5 ~ 10 μg 时可以显示相对分子质量为 2 512 的多肽^[2] .基因工程生产的小分子多肽类药物的分离和分析 ,需要更加稳定的电泳

系统和灵敏的显色方法.作者在实验过程中比较了各种显色方法和缓冲系统,建立了一个重现性好、灵敏度高的方法,对微量小分子重组肽的分析得到比较满意的结果.

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

丙烯酰胺:Canalab 公司产品;N,N'-甲叉双丙烯酰胺(分析纯):Biomol 公司产品;Tris:上海化学试剂公司产品;Tricine:Amresco 公司产品;过硫酸铵和 TEMED:BIB 产品;SDS、尿素、甘油、硝酸银均为国产分析纯;双波长飞点凝胶扫描系统:岛津 SHIMADZU 公司产品;小型垂直式电泳附件模具,FD-201 稳亚稳流电泳仪:上海医用分析仪器厂.

1.2 分析用样品

人胰岛素:上海第一生化药业公司上海生物化

学制药厂产品(重组人胰岛素水溶液,0.6 mg/mL).分析用样品:本实验室构建的重组酵母 GS115-pPIC9K-CAG155 甲醇诱导表达后取发酵上清液(重组表达产物相对分子质量约 5 000)和提取胞内产物.

1.3 电泳及染色方法

1.3.1 电泳贮存液配制及胶的制备 按 Schägger (1987)的方法.阳极缓冲液:0.2 mol/L Tris 用 HCl 调节 pH 至 8.9;阴极缓冲液:0.1 mol/L Tris,0.1 mol/L Tricine,0.01 g/L SDS;胶缓冲液:3.0 mol/L Tris,0.03 g/L SDS,用盐酸调节 pH 8.4;丙烯酰胺贮液:称取 48 g 丙烯酰胺和 1.5 g N,N'-甲叉双丙烯酰胺于 100 mL 水中,溶解混匀后即得到凝胶总质量浓度(T)49.5 g/L,交联度(C)30 g/kg 的贮存液.分离胶、间隙胶和浓缩胶的组成见表 1.

表 1 分离胶、间隙胶、浓缩胶组成

Tab.1 Composition of separating, spacer and stacking gels

组 成	丙烯酰胺 贮液/mL	胶缓 冲液/mL	尿素 质量/g	加水量/ mL	10%过硫酸胺 溶液/ μ L	TEMED/ μ L	总体积/ mL
浓缩胶质量分数 4% T, 3% C	0.2	0.93	—	1.37	25	2.5	2.53
间隙胶质量分数 10% T, 3% C	0.6	1.00	—	1.40	25	25	3.02
分离胶质量分数 16.5% T, 3% C, 6 mol/L 脲	3.30	3.30	3.6	1.00	60	60	10.05

1.3.2 样品缓冲液的制备及样品的处理 胰岛素样品 5 μ L (3 μ g),发酵液及胞内提取液各 25 μ L 与上样缓冲液(50 mmol/L Tris·HCl, pH 6.8, 质量分数 2% SDS, 0.1% 溴芬蓝, 体积分数 10% 甘油, 2% 巯基乙醇)按质量分数 1:1 混匀,煮沸 3~5 min.

1.3.3 电泳条件 30 V 电泳 1~2 h,当样品全部进入浓缩胶后,将电压升至 100 V,电泳约 6 h,当溴酚蓝到达底部时停止电泳.

1.3.4 显色 考马斯亮蓝染色按参考文献 [1] 的方法,银染程序—^[3]:体积分数 30% 乙醇,10% 冰乙酸室温平缓摇动固定 4 h;体积分数 30% 乙醇洗 30 min;去离子水洗 3 次,每次 10 min;质量分数 0.1% 硝酸银室温 30 min;去离子水冲洗凝胶的两面,每次 20 s;质量分数 2.5% 碳酸钠,0.02% 甲醛显色至所需对比度;体积分数 5% 乙酸终止显色.

程序二:体积分数 50% 乙醇,10% 冰乙酸固定 30 min;体积分数 30% 乙醇,质量分数 6.8% 乙酸,0.125% 戊二醛,0.25% 五水硫代硫酸钠浸泡 30 min;蒸馏水洗 3 次,每次 5 min;质量分数 0.1% 硝酸银室温作用 20 min;蒸馏水洗凝胶的两面;质量分数 2.5% 碳酸钠,0.02% 甲醛显色至所需对比度;

体积分数 5% 乙酸终止显色^[4].

程序三:体积分数 40% 乙醇,10% 乙酸固定 10 min;去离子水漂洗 10 min;质量分数 0.05% 戊二醛,0.037% 甲醛,体积分数 40% 乙醇固定敏化 5 min;体积分数 40% 乙醇漂洗 20 min;去离子水洗 20 min;质量分数 0.02% 硫代硫酸钠敏化 1 min;去离子水漂洗 2 次,各 5 min;质量分数 0.1% 硝酸银银染 20 min;去离子水漂洗,并冲洗凝胶的两面;质量分数 2.5% 碳酸钠,0.02% 甲醛显色至所需对比度(若干分钟);体积分数 5% 乙酸终止显色^[4].

1.3.5 定量分析 用双波长凝胶扫描的方法分析目的蛋白质含量.

2 结果与讨论

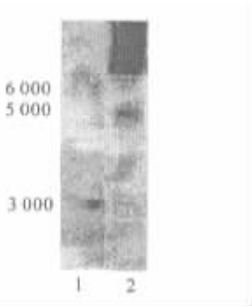
图 1 为银染程序一实验结果,图 2 为银染程序二实验结果,图 3 为银染程序三实验结果,图 4 为考马斯亮蓝染色结果.

凝胶双波长扫描结果表明,胞内提取物和胞外分泌物中目的蛋白质质量分数均为 10 μ g/mL.目的蛋白质质量分数分别占胞内、胞外总可溶性蛋白质质量分数约 30% 和 8%.实验结果表明,用考马斯亮

蓝 R-250 染色,胰岛素加样量在 3 μg 以上时,可以得到相对分子质量 6 000 和 3 000 的 2 个条带,但发酵液上样量在 25 μL 约含 0.3 μg 目的蛋白质时不能得到清晰的条带.目的小分子肽上样量在 0.3 μg 时银染可以得到清晰的低分子条带,而程序一的显色灵敏度大大低于程序二和程序三,而且重现性也不如程序二和程序三.可能原因是,小分子肽在显色过程很容易被洗脱,因此减少固定时间及洗涤时间就很重要.程序一固定、洗涤时间过长,程序二和程序三由于用异戊醛和甲醛固定敏化而缩短了固定时间,因而显色效果好.因此,在检测发酵液中

微量小分子肽时,作者推荐使用银染程序三的显色方法.

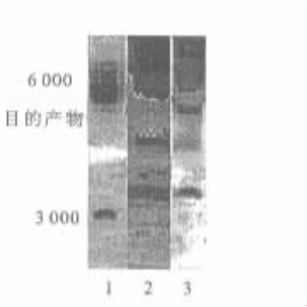
电泳缓冲系统是影响电泳结果的重要因素.由于本实验所用的阴阳极缓冲液 pH 值及组成不同,电泳过程中阴阳极缓冲液 pH 会趋向一致,所以每次电泳最好使用新鲜的电泳缓冲液(最多可重复使用一次).阴极缓冲液所使用的 Tricine 价格昂贵,每次电泳更换阴极缓冲液成本较高,实验过程中,用 Tricine 将使用过的阴极缓冲液调至 pH 8.25,阴极缓冲液可以重复使用多次且有较好的重现性.



1.胰岛素标准 2.重组菌发酵液

图 1 银染程序一

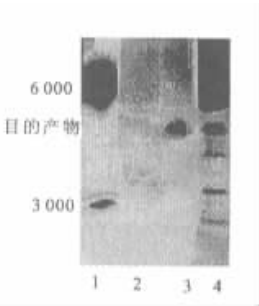
Fig.1 The first program of silver blotting



1.胰岛素标准 2.对照菌发酵液;3.重组菌发酵液

图 2 银染程序二

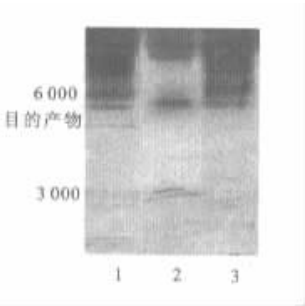
Fig.2 The second program of silver blotting



1.胰岛素标准 2.对照菌胞内提取液;
3.重组菌胞内提取液 4.重组菌发酵液

图 3 银染程序一

Fig.3 The third program of silver blotting



1. 重组菌发酵液 2. 重组菌胞内提取液;
3. 胰岛素标准

图 4 考马斯亮蓝染色

Fig.4 Coomassie brilliant blue blotting

参考文献：

[1] Schagger H, Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa[J]. *Anal Biochem*, 1987, 166(2): 368-397.

[2] 石继红,赵永同,王俊楼,等.SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析小分子多肽[J].第四军医大学学报,2000,21(6):761-763.

[3] 丁.萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯.分子克隆实验指南[M].金东雁,黎孟枫译.第2版.北京:科学出版社,1992.880-887.

[4] 郭晓君.蛋白质电泳[M].北京:科学出版社,1999.

万方数据

(责任编辑 杨 勇)