

技术与方法 Techniques and Methods

一种利用普通垂直电泳槽回收PAGE胶蛋白条带的简便方法

王东辉 韩 韬 龚化勤 张 力 白书农*

北京大学生命科学学院, 北京 100871

A Simple Method for Protein Recovery with Ordinary Electrophoresis Apparatus

WANG Dong-Hui, HAN Tao, GONG Hua-Qin, ZHANG Li, BAI Shu-Nong*

College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871

提要 植物总蛋白样品经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离之后, 直接用考马斯亮蓝染色、切胶回收目的条带, 再用聚丙烯酰胺凝胶电泳槽电洗脱纯化得到单一条带的目的蛋白。此法可得到有活性的黄瓜衰老叶片中被特异激活的DNA酶, 对样品中含量少, 特别是与其他分子量相近的蛋白质十分有效。

关键词 蛋白质纯化; 电洗脱; DNase

最近我们在研究黄瓜单性花发育分子机制时发现, 雌花雄蕊中出现特异的、与叶片衰老时出现的DNA酶活性相同的蛋白^[1]。如何分离这一区域中特异激活的DNA酶成了急需解决的问题。常用的层析和电泳方法对我们的实验有一些困难。前者需要的样品量大, 而黄瓜幼花本身很小, 要取其中包含雄蕊的区域所得到的样品量更少, 难以用于目的蛋白的纯化。后者虽然可以用于少量材料的蛋白分析, 但从复杂的蛋白条带中分离出目的条带常用的活性染色方法^[2,3], 由于其分辨率低, 很难准确分离出目的条带。为了解决这一问题, 我们尝试在以PAGE胶从样品中分离蛋白之后, 直接用常规的考马斯亮蓝染色, 切胶回收目的条带, 再用常规的PAGE胶电泳槽电洗脱纯化目的蛋白, 成功地从雌花雄蕊区域和衰老叶片中得到了纯化且具有相同活性的DNA酶。现介绍如下。

材料与方法

1 试剂

Tris、SDS、甘氨酸等蛋白电泳试剂购自北京化学试剂公司; 低分子量标准蛋白购自上海东风试剂公司。

2 方法

2.1 蛋白质的提取 可溶性蛋白按照Mittler 和

Lam^[4]的方法获得。材料用液氮冷冻、在研钵中磨碎后, 每克加入1 mL提取缓冲液[100 mmol·L⁻¹ 3-(*N*-吗啡啉)乙磺酸(Mops), pH 6.8; 5 mmol·L⁻¹ 抗坏血酸盐; 2 mmol·L⁻¹ 还原性谷胱苷肽; 1 mmol·L⁻¹ 氯化钙; 1 mmol·L⁻¹ 氯化镁; 0.5 mmol·L⁻¹ 苯甲基磺酰氟(PMSF); 10 mmol·L⁻¹ 氯化锌]浸提2 h, 离心后以12 000×*g*于4℃下离心10 min, 上清液即为粗蛋白。

2.2 蛋白质的分离与分析 SDS-PAGE方法主要按照文献4方法进行。浓缩胶4%, 分离胶12%。电泳槽用BioRad Mini3型。氯化钾染色用预冷的0.5 mol·L⁻¹ KCl染SDS-PAGE胶5 min^[2,3]。考马斯亮蓝染色、脱色也按照文献5进行; 振荡染色2 h (100 mL染色液: 0.25 g考马斯亮蓝、45 mL甲醇、45 mL水、10 mL冰醋酸), 用脱色液(100 mL脱色液: 45 mL甲醇、45 mL水、10 mL冰醋酸)脱色直至背景清晰。

2.3 电洗脱纯化目的蛋白 将含目的蛋白的凝胶切下后装入合适的透析袋中, 加入1 mL电洗脱液(50 mmol·L⁻¹ Tris、50 mmol·L⁻¹ 甘氨酸、0.1%

收稿 2003-01-17 修定 2003-06-06

资助 国家攀登预选项目(J00-A-005, G19990116)和国家自然科学基金课题(30070361)。

* 通讯作者(E-mail: shunongb@pku.edu.cn, Tel: 010-62755870)。

SDS, pH 8.9)。在普通 SDS-PAGE 上、下电泳槽中加入适量的电洗脱液, 将装好的透析袋放入上槽中, 再装好电泳槽, 100 V 电压, 洗脱 2 h。洗脱完毕后, 将透析袋中溶液取出, 并弃去碎胶, 溶液用 SDS-PAGE 电泳检查效果。鉴定后正确的蛋白溶液装入透析袋中, 用 PBS 溶液于 4℃ 下透析过夜。其间换 PBS 溶液 2~3 次。透析好的蛋白冻干浓缩后, 用以进行转膜测序或制备抗体。

2.4 DNA酶活性的胶内测定 主要参照 Mittler 和 Lam^[4] 方法进行, 略有修改。在普通的 SDS-PAGE 胶中, 每 10 mL 分离胶加入 50 μ L 2 mg·mL⁻¹ 鲑精 DNA 后, 进行电泳。电泳完毕后, 卸下的 SDS-PAGE 胶在洗脱缓冲液 (100 mmol·L⁻¹ Tris-Cl、1 mmol·L⁻¹ EDTA、1 mmol·L⁻¹ EGTA、1% β -巯基乙醇、1 mmol·L⁻¹ PMSF, pH 8.5) 中震荡洗脱 1 h, 再换新的洗脱缓冲液洗脱过夜, 翌日再换新的洗脱缓冲液洗脱 1 h。最后, 于加终浓度为 10 mmol·L⁻¹ 锰离子的新的洗脱缓冲液中, 37℃ 下静置保温 10 h 以上。进行溴化乙啶染色, 紫外灯下观察。

结果与讨论

为了检测纯化效果, 我们以黄瓜衰老叶片所提取的蛋白为材料比较了氯化钾染色法和考马斯亮蓝染色法在 PAGE 胶蛋白检测中的分辨率。从图 1 可见, 在 DNA 酶所在的 33~37 kD 区域, 氯化钾染色的胶中有一片较宽的白色不透明蛋白带; 而在考马斯亮蓝染色的胶中则可以清晰地分辨出 3 条带。其中箭头所指为胶内活性测定 (in gel assay) 中确定的 DNA 酶蛋白带。用刀片切下该蛋白带, 放入含电洗脱缓冲液的透析袋中。将收集有目的蛋白条带胶块的透析袋放在 BioRad 电泳槽的上槽中, 上、下槽均加入电洗脱缓冲液。根据我们的经验, 在 BioRad 小型电泳槽中稳压 100 V 电泳 2 h, 即可将透析袋中的蛋白从胶块中洗脱出来。取出透析袋中的胶块, 经过适当的透析和冻干, 即可得到纯化的目的蛋白。回收的蛋白为单一的条带 (图 2)。

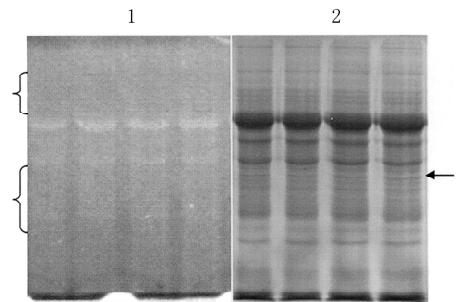


图1 两种染色方法的比较

图中两种染色方法所用的为同一块胶。1. 先用预冷的 0.5 mmol·L⁻¹ KCl 染色。2. 照相后再将此胶以考马斯亮蓝染色。大括号所标出的区域用考马斯亮蓝染色可以分辨出多个蛋白条带; 而以 KCl 染色则基本上无法分辨出蛋白条带。箭头所示为本实验中所要回收的分子量为 35 kD 目的蛋白。该蛋白在 KCl 染色方法中无法分辨, 而在考马斯亮蓝染色中则可辨清晰。1 和 2 中 4 条泳道为同一样品的重复。

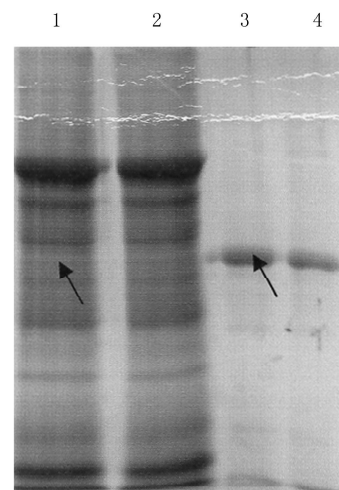


图2 回收纯化的蛋白

图中结果是以考马斯亮蓝染色方法染色后用洗脱方法回收的分子量为 35 kD 目的蛋白。泳道 1、2 为含 DNA 酶活性的黄瓜衰老叶片总蛋白。箭头所示为 35 kD 具有 DNA 酶活性的蛋白。泳道 3、4 为用电洗脱方法纯化的 35 kD 目的蛋白单一条带。

为了证明所得到的蛋白是否是所需要的 DNA 酶蛋白, 我们对所回收纯化的分子量为 35 kD 蛋白进行了胶内活性测定。结果表明, 所纯化的蛋白与直接从黄瓜衰老叶片中所提取的粗蛋白一样, 具有明显的 DNA 酶活性 (图 3)。

以上结果说明, 用常规的电泳仪对 PAGE 胶

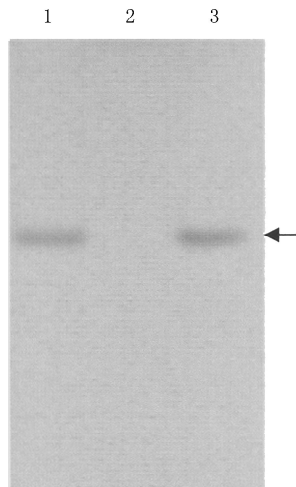


图3 纯化的35 kD蛋白的DNase活性检测

1. 衰老叶片总蛋白; 2. 绿色叶片总蛋白; 3. 回收纯化的35kD蛋白。回收纯化的35 kD蛋白有与衰老叶片中蛋白相同的DNA酶活性(箭头所示条带)。

中的目的蛋白进行回收纯化是非常简便的。根据我们的经验, 无论是什么样品的蛋白, 或用什么方法提取蛋白, 只要是常规 SDS-PAGE 胶中能够分辨的蛋白, 都可以用这种方法进行回收纯化, 其回收效率也相当高。在我们的实验中, 从2个

胶块中回收的蛋白, 即可用作 DNA 酶蛋白电泳纯度鉴定; 而从10个胶块中即可制备得到2 mg DNA 酶蛋白。此外, 我们还用此方法成功回收纯化了分子量高达120 kD的蛋白。我们认为这种方法对分离纯化样品中含量少, 特别是与其他蛋白分子量相近的蛋白是十分有效的。

参考文献

- 1 Hao YJ, Wang DH, Peng YB et al. DNA damage in the early primordial anther is closely correlated with stamen arrest in the female flower of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Planta*, 2003, 217:888~895
- 2 Dahmusme HC. Rapid visualization of protein bands in preparative SDS-polyacrylamide gels. *Anal Biochem*, 1979, 93:257~260
- 3 Lee C, Levin A, Branton D. Copper staining: a five-minute protein stain for sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gels. *Anal Biochem*, 1987, 166:308~312
- 4 Mittler R, Lam E. Identification, characterization, and purification of a tobacco endonuclease activity induced upon hypersensitive response cell death. *Plant Cell*, 1995, 7:1951~1962
- 5 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 金冬雁, 黎孟枫译. 分子克隆实验指南. 第2版. 北京: 科学出版社, 1992. 880~886