

PAGE 银染和条带回收方法的改进

陈亮明, 张冬林, 李志辉, 陈永华, 肖晶晶, 彭丽梅

(中南林业科技大学 资源与环境学院, 湖南 长沙 410004)

摘要: 为了提高聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)的银染效果和条带回收的效率,以广玉兰DNA为材料进行ISSR-PCR分析,比较了两种银染(常规银染法和快速银染法)和条带回收法(乙醇糖原法和改进的煮沸法)。结果显示:两种银染方法效果一致,但常规银染要用2~3h,而快速银染仅用30min,是常规银染的1/6~1/4;改良的煮沸法回收条带比乙醇糖原法更简便、更快捷。因此,快速银染和改良的煮沸法条带回收法可以应用在以后的研究中。

关键词: 聚丙烯酰胺凝胶电泳; 银染; 回收; 广玉兰

中图分类号: Q503 **文献标志码:** A

Improvement on PAGE Silver Staining and Band Recovering

CHEN Liangming, ZHANG Donglin, LI Zhihui, CHEN Yonghua, XIAO Jingjing, PENG Limei
(School of Resources and Environment, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, Hunan, China)

Abstract: To enhance the efficiency of silver staining and band recovering in Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE), both conventional silver staining and speedy silver staining were investigated, using the technique of ISSR-PCR markers with *Magnolia grandiflora* DNA. During band-recovering, conventional ethanol heparin method and improved boiling method were employed and followed by re-amplification of PCR identification. The results indicate that the two methods produce similar clear bands and band patterns, but the procedure of conventional silver staining takes 2~3 hours while the speedy silver staining only requires 30 minutes which reduces the experimental time by 4~6 times. The improved boiling method is more convenient and time-saving than the conventional one. Speedy silver staining and improved boiling band-recovering can be employed in the future studies.

Key words: Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE); silver staining; recovering; *Magnolia grandiflora*

目前大部分实验室在检测PAGE凝胶条带时都采用常规银染法^[1~4],这种方法具有分辨率和灵敏度高、简便、无同位素污染等优点,但它的缺点是银染时间较长,银染过程需要2~3h。在PAGE胶中条带回收时,由于PAGE胶比较薄、条带较小,回收比较困难且效率低^[5]。针对这些问题,本文中比较了两种银染和条带回收法,目的在于简化程序,提高银染效果和条带回收效率。

1 材料和方法

1.1 材料

材料为广玉兰幼嫩叶片,于2006年4月采自湖南省长沙市天际岭生态公园,-20℃低温保存备用。用于ISSR-PCR反应的dNTP、Taq酶、Mg²⁺购自TaKaRa公司,标准分子量(100bp Marker)购自TNGEN公司,引物参照加拿大哥伦比亚大学(UBC)提供的ISSR引物序列,于Invertrigen公司合成。PCR反应在PTC2200型PCR循环仪上进行。

收稿日期: 2007-03-10

基金项目: 湖南省“芙蓉学者”专项基金(0595);中南林业科技大学引进人才基金项目(06Y035)。

作者简介: 陈亮明(1963-),男,湖南衡阳人,教授,博士研究生,研究方向:园林植物与观赏园艺及景观设计。E-mail: csfucm@tom.com。

1.2 方法

1.2.1 银染方法

比较变性PAGE胶在常规银染方法与快速银染方法的时间与银染效果。常规银染方法^[6]: 电泳后,小心地将胶与玻璃板分离,使胶附着于短板上。将胶连同短板浸泡在500 mL 固定液(100 mL 冰醋酸加去离子水定容至1 L)中,在摇床上摇至染料颜色消失大约2 h 或静置过夜。倒出固定液,在摇床上用去离子水洗3次,每次2 min。每次从水中取出时须将短板倾斜让水流尽后再进行下一次洗涤。将胶连同短板浸泡在500 mL 银染液(银染液: 1 g 硝酸银溶于1 L 去离子水中,用前加1.5 mL 甲醛)中,摇床上染色30 min。准备好显影液(显影液: 30 g 碳酸钠溶于1 L 去离子水中,用前加1.5 mL 甲醛和200 μ L 硫代硫酸钠),10 $^{\circ}$ C 预冷。将胶从染液中取出,放入去离子水中清洗,然后转入预冷的显影液中显影。注意:从胶放入去离子水到转入显影液时间不得超过5~10 s。在摇床上显影直至带全部显现。注意:为保持背景清晰,显影不可过度。将500 mL 固定液直接倒入显影液中中止显影。摇床上放置2~3 min。用去离子水洗2次。10 $^{\circ}$ C 置于去离子水短暂保存。

快速银染方法: 双蒸水漂洗2次,每次1 min。0.1% AgNO_3 溶液染色10~15 min (AgNO_3 配置成20倍浓度,用时取20 mL 加双蒸水380 mL,稀释成400 mL)。双蒸水漂洗2次,每次1 min。显影液(氢氧化钠50 g+四硼酸钠1.9 g 加水至500 mL 配置成20倍浓度,预冷,用时取20 mL 加双蒸水380 mL,稀释成400 mL,再加750 μ L 37%的甲醛)显色5~10 min。等带完全现出后,倒掉显色液。双蒸水漂洗1~2 min,照相并用保鲜膜保存。

1.2.2 差异条带的回收方法

从银染的PAGE胶上切下差异条带,差异带回收采用乙醇糖原法^[7]和改进的煮沸法2种。乙醇糖原法:从聚丙烯酰胺凝胶上切下目的条带,放入1.5 mL 离心管中,用1 mL TE 快速冲洗1遍后,加入100 μ L TE buffer,碾碎胶条,室温放置15 min后,100 $^{\circ}$ C 水浴15 min,于10 000 r/min 离心2 min,除去凝胶,上清液转至一新的离心管中,加1/10 体积的NaAc(3 mol/L, pH4.8)、5 μ L 糖元(10 mg/mL)和250 μ L 无水乙醇,-20 $^{\circ}$ C 沉淀过夜。在4 $^{\circ}$ C 条件下15 000 r/min 离心15 min,70%乙醇洗2次,室温稍干燥后,用双蒸水溶解。

改进的煮沸法:做1.5 mm 厚的PAGE胶,上样量加大到15 μ L,从聚丙烯酰胺凝胶上切下目的条带,放入0.5 mL 的灭菌离心管中,加50 μ L 灭菌双蒸水洗胶2~3次,后加入30 μ L 灭菌双蒸水并用吸头碾碎,于沸水中煮沸10 min左右,冷却后离心收集上清液,-20 $^{\circ}$ C 条件下保存。

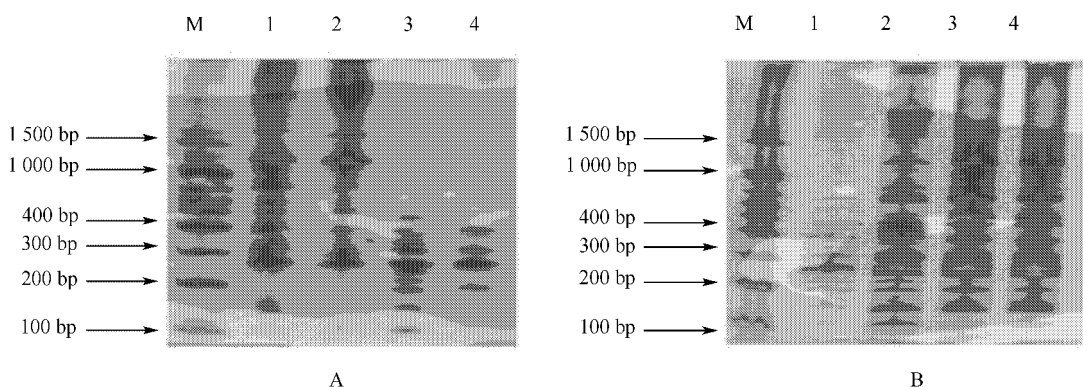
1.2.3 差异条带的再扩增

分别取乙醇糖原法和改进的煮沸法回收产物5 μ L 用于PCR 的重扩增。差异片段重扩增采用与ISSR-PCR 相同的反应体系和反应条件,与片段相对应的引物组合进行重扩增,1.0% 琼脂糖电泳检测。

2 结果与分析

2.1 两种银染方法结果比较

用常规银染(图见1-A)与快速银染(见图1-B)2种方法进行银染比较,银染结果在2种方法上没有发现



M: 100bp DNA 标记; 1~4: 广玉兰 ISSR-PCR 产物

图1 常规和快速银染方法的银染结果

Fig 1 The result of conventional silver staining and speedy silver staining

明显的差异,但银染时间不同,常规银染法需要2~3 h,而快速银染法只要30 min,大大缩短了银染时间,说明快速银染方法在保证银染效果的同时还具有快速和有效的优点。同时快速银染方法与常规银染方法比较,很明显的区别是胶的背景较浅,条带更清晰。

2.2 差异条带的回收与再扩增

用乙醇糖原法和改进的煮沸法获取的模板,经二次扩增后均获得了大小在400 bp左右的特异性的再扩增条带,用2种方法获取的模板进行再扩增的效果明显,结果也表现一致(见图2)。但改进的煮沸法回收的时间仅为30 min,比乙醇糖原法更简便、更快捷。

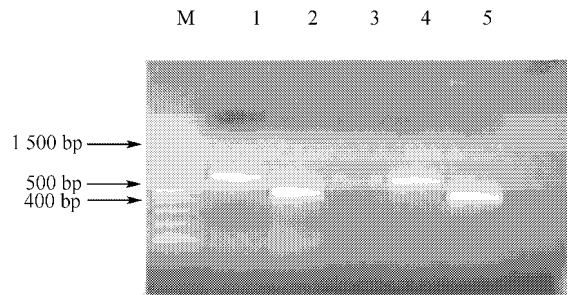
3 讨论

与常规银染方法比较,快速银染法也具有很高的分辨率,还具有快速的优点,可广泛应用于涉及聚丙烯酰胺胶的DNA检测研究,如mRNA差异显示RA PD、RFLP、SSP、SSCP、SSR和ISSR等^[8-10]。银染反应的进行需要一个碱性的环境,在实验中发现随着NaOH质量浓度的增加,胶的背景可变浅,并有助于祛除胶中非特异的银颗粒,而当NaOH质量浓度低于10 g/L时,胶的背景变深,不利于DNA带的显现。有研究发现,在显色液中加入少量其它的非中性弱酸盐(如NaHCO₃、NaH₂PO₄、Na₂B₄O₇、Na₂HPO₃、EDTA-2Na、CH₃COONa和CH₃COOK等)也有助于条带的显现,并保持显带的稳定性,维持胶的浅色背景,使其在显色液中较长时间放置背景也不会加深^[11]。

从PAGE中回收差异条带效率的高低,对回收产物的二次PCR扩增以及以二次扩增为基础的纯化、克隆和测序具有重要的作用,对于PAGE胶银染后差异条带的回收,有许多学者^[12,13]曾采用过不同的方法进行研究,所持的观点不尽相同,这可能与不同的研究者所用的实验材料及实验条件不同有关。为提高回收的效率,将PAGE胶的厚度增加到1.5 mm,上样量加大到15 μL,改进的煮沸法从银染的PAGE中回收差异条带,这种方法较常规的乙醇糖原法操作方便,程序简化,有利于减少二次扩增时模板信息量的损失,经过二次扩增电泳,证明了这种方法的有效性和可靠性。笔者认为,采用快速银染法对PAGE胶进行快速银染和采用改进的煮沸法进行差异条带回收,可以优化ISSR标记技术,使之更快捷、更有效。

参考文献

- [1] Liang P, Pardee A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction[J]. Science, 1992, 257: 967-971.
- [2] 王光利,石培春,张薇,等. 微卫星DNA非变性PAGE银染法的分析探讨[J]. 新疆农业科学, 2006, 43(6): 455-458.
- [3] 周兴文,杨秋生,李永华. 牡丹基因组AFLP银染反应体系的建立和优化[J]. 河南农业大学学报, 2006, 4(6): 602-606.
- [4] 张志峰,史洪才,黄俊成. 微卫星DNA聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)银染法的改良[J]. 生物技术, 2005, 15(3): 51-53.
- [5] 李拥军,敖红,孙桂金. mRNA差异显示技术中特异条带回收方法的比较[J]. 生物技术, 2005(3): 43-44.
- [6] 熊建华,陈学峰,李阳生,等. 红莲型杂交水稻红莲优6号及其亲本苗期与分蘖期根系基因表达差异分析[J]. 中国水稻科学, 2004, 18(2): 94-98.
- [7] 彭秀玲,袁汉英. 基因工程实验技术(第二版)[M]. 长沙:湖南科技出版社, 1998: 101-103.
- [8] 陈永华,严钦泉,肖国樱,等. mRNA差异显示技术的研究进展[J]. 西北农业学报, 2005(2): 9-12.
- [9] 陈永华,赵森,严钦泉,等. 差异显示法分离水稻耐淹涝相关的基因[J]. 农业生物技术学报, 2006, 6(14): 894-898.
- [10] 谭晓风,漆龙霖,罗春清,等. 山茶属植物RAPD分析中琼脂糖凝胶电泳条件的研究[J]. 中南林学院学报, 2000, 20(2): 83-85.
- [11] 许绍斌,陶玉芬,杨昭庆. 简单快速的DNA银染和胶保存方法[J]. 遗传, 2002, 24(3): 335-336.
- [12] 宋显军,张伟,曹萍,等. 大豆SSR标记PAGE银染方法的改进[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(16): 3922-3923.
- [13] 王跃进,张今今. 葡萄银染mRNA差异显示分析体系的建立及优化[J]. 农业生物技术学报, 2005(2): 254-255.



M: 100 bp DNA 标记; 1: 乙醇糖原法; 2: 改进的煮沸法;
3: 阴性对照; 4, 5 为 1, 2 的重复

图2 用乙醇糖原法和改进的煮沸法回收产物进行再PCR产物的琼脂糖电泳检测

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of second PCR products on ethanol heparin method and improved boiling method