



生物化学实验

电泳技术

5.8 凝胶染色方法

北京大学 王青松 胡晓倩

概述

- 经琼脂糖和聚丙烯酰胺凝胶电泳分离的各种生物分子，需要用染色法使目的分离物在支持物相应的位置上显示出谱带（条带），从而检测其纯度、含量及生物活性。



总蛋白质染色方法

常用

较少使用



☐ 考马斯亮蓝染色法

☐ 氨基黑

☐ 银染色法

☐ 固绿

☐ 荧光染料染色法

☐ 广谱染料 (stains-all) 染色法

蛋白质染色分为：1) 总蛋白染色；2) 特定复合蛋白质（磷酸化蛋白、糖蛋白及脂蛋白等）。

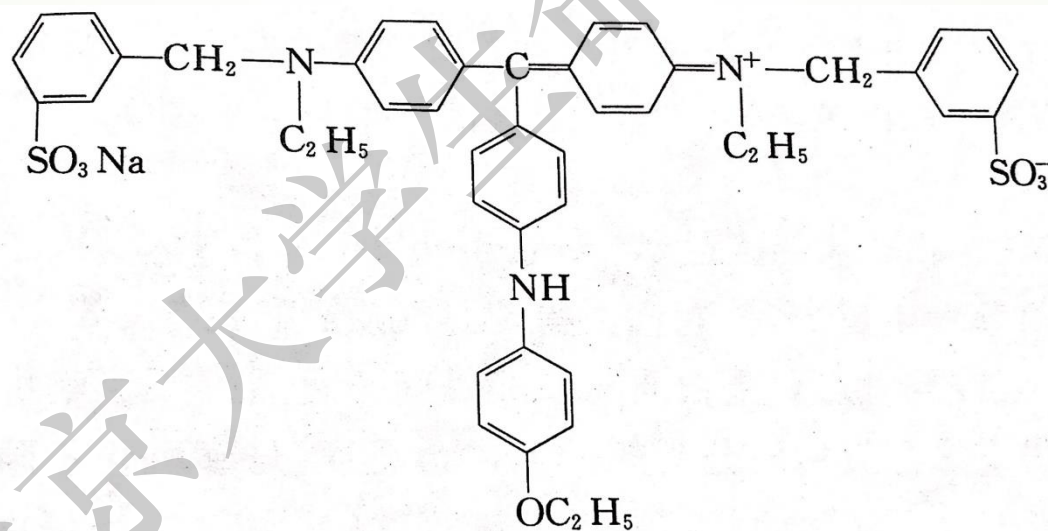
本章节主要介绍总蛋白染色方法。

常用总蛋白质染色方法比较

方法	优点	缺点
考马斯亮蓝法 (G250/R250)	染色快速简单，重复性好，保存时间长，成本较低，无毒	灵敏度相对较低 (0.1 μg)，背景色较高
银染色法	灵敏度最高 (< 1 ng)	背景较高，有毒，操作步骤复杂，费时费力，成本高
荧光染料染色法	灵敏度较高 (1-10 ng)，简单快速 (30-60 min)	成本高，需使用专门的凝胶成像仪扫描保存结果

考马斯亮蓝R-250染色

- 考马斯亮蓝R-250 (Coomassie brilliant blue R-250, 简称CBB R-250) 。 $M_r=824$ Da, $\lambda_{\max}=560\sim590\text{nm}$ 。



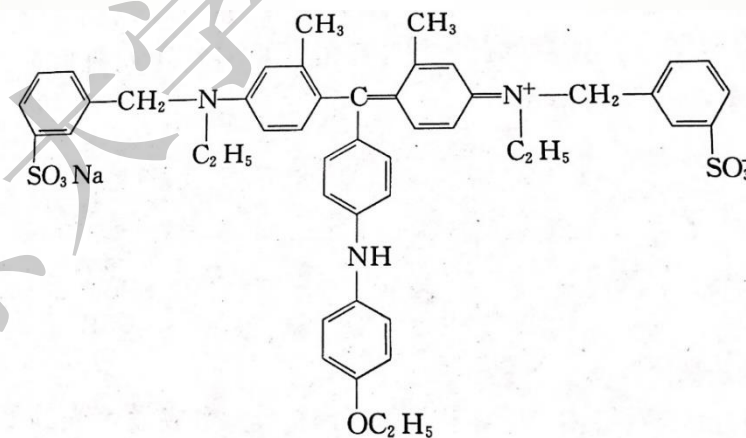
考马斯亮蓝R-250的分子结构

考马斯亮蓝R-250染色

- 考马斯亮蓝CBB R-250是通过范德华力与蛋白质的碱性基团结合，它与蛋白质结合呈现基本相同的蓝色，其线性范围为15~25 μg ，扫描峰的面积与蛋白量呈线性关系，可用于定量分析。
- 考马斯亮蓝R-250染色灵敏度比氨基黑高5倍，尤其适用于SDS电泳后微量蛋白质的染色。
- 蛋白质浓度过高时，染色不符合Beer定律，定量分析时要注意。

考马斯亮蓝G-250染色

- 考马斯亮蓝G-250 (coomassie brilliant blue G-250, 简称CBB G-250), 即二甲基花青亮蓝, 比CBB R-250多2个甲基, $M_r=854$ Da, $\lambda_{\max}=590\sim610\text{nm}$ 。
- CBB G-250染色灵敏度不如CBB R-250, 但比氨基黑高3倍。
- **优点:** CBB G-250能有选择地使蛋白质染色, 而凝胶几乎无本底色, 常用于需要重复性好和稳定的染色, 适于做定量分析。



考马斯亮蓝G-250的分子结构

银染色法

- 银染色法（silver staining，简称银染），原理是银离子在碱性pH 环境下被还原成金属银，沉淀在蛋白质的表面而显色，大部分蛋白质银染显示黑色或棕色。银染的方法种类很多，其准确的染色机制还不是特别清楚。
- 银染的灵敏度很高，可染出胶上低于1 ng/蛋白质条带，较CBB R-250法灵敏100倍。
- 银染广泛的用于：
 - 1) 2-DE双向凝胶电泳分析；
 - 2) 含量极低的蛋白样品的PAGE凝胶电泳分析，例如：常用于内源性GST-pulldown、蛋白质免疫共沉淀Co-IP的蛋白质样品。

银染注意事项

1. 电泳完毕，凝胶中的蛋白质需提前固定在凝胶上，防止它们在溶液中扩散。



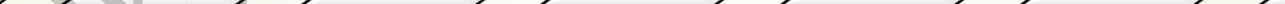
2. 需除去某些干扰染色的物质，如还原剂、缓冲液成分（甘氨酸）、去污剂等。



3. 银染对水的要求很高，清洗用水尽量用高纯度去离子水，可减少背景着色。



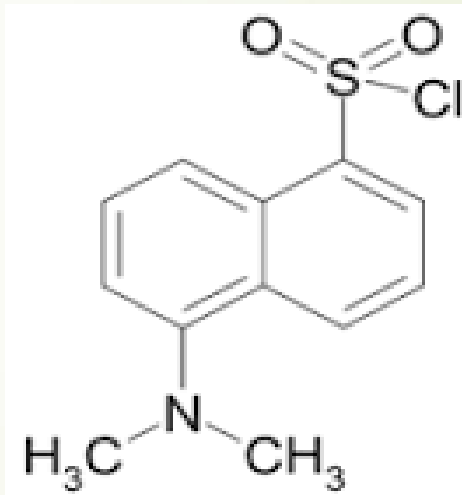
4. 所用器皿要洁净，不用手直接接触凝胶，以免杂蛋白污染。



荧光染料染色法：丹磺酰氯法

● 荧光染料染色法主要有丹磺酰氯法和荧光胺法2种。

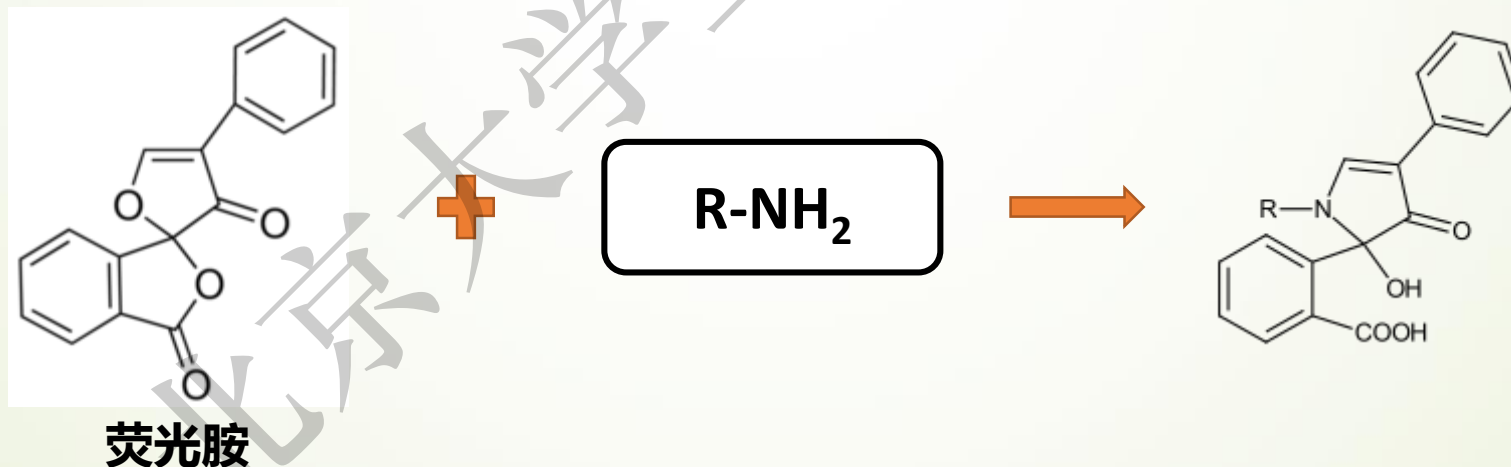
- 丹磺酰氯法 (2,5-二甲氨基萘磺酰氯, dansyl chloride, DNS-Cl)
 - 在碱性条件下, 丹磺酰氯可与氨基酸、肽、蛋白质的末端氨基发生反应, 可在波长320 nm或280 nm的紫外灯下, 观察染色后的各区带或点。蛋白质/肽经丹磺酰化后, 不影响电泳迁移率, 因此少量丹磺酰化的样品还可用于无色蛋白质分离的标记物。



丹磺酰氯DNS-Cl

荧光染料染色法：荧光胺法

- 荧光胺法 (fluorescamine, 又称fluram)
 - 与丹磺酰氯作用类似，由于自身及分解产物均不显示荧光，染色后没有荧光背景，检测灵敏度高，可检测出1 ng的蛋白质。但是荧光胺会引入负电荷，引起电泳迁移率的改变。在SDS-PAGE电泳中，这种电荷效应可忽略。



核酸染色

RNA染色



☐ 溴乙锭EB

☐ 焦宁Y

☐ 甲苯胺蓝

☐ 次甲基蓝

☐ 吖啶橙

DNA染色



☐ 溴乙锭EB

☐ 甲基绿

☐ 二苯胺

☐ Feulgen染色

溴乙锭EB染色

- 溴乙锭 (ethidium bromide, EB) 是最常用的核酸荧光染料，用于观察琼脂糖凝胶中的 RNA、DNA 条带。
- 原理：EB 可嵌入核酸双链的配对碱基之间，导致 EB 与核酸的结合。在紫外线激发下，DNA 吸收 254 nm 处的紫外线并传递至 EB，而 EB 本身在 302 nm 和 366 nm 有光吸收，两者都以 590 nm 波长发射出来，利用紫外分析灯 (253 nm) 观察荧光。EB-DNA 复合物中 EB 发出的荧光，比游离在凝胶中的 EB 发出的荧光强度大 10 倍，因此无需洗净背景即可清楚观察核酸带型。

溴乙锭EB染色

优点

1) 操作简便，快速

2) 灵敏度高

3) 多余EB不干扰紫外灯下检测荧光，一般不需脱色

● 注意：

- EB染料是强诱变剂，操作时需注意防护，务必戴手套。
- 可使用没有细胞毒性及诱变性的Gelred等EB替代升级产品，用于核酸的染色。

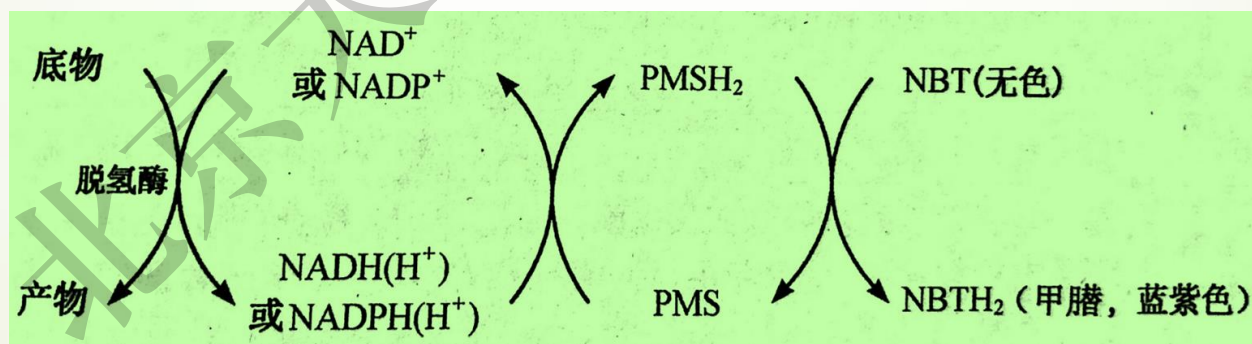
同工酶的染色

- 同工酶广泛存在于动植物及微生物组织细胞中，不仅在科研中具有重要作用，同时在临床医学检验、法医破案、农林牧产品品质鉴定等广泛使用。
- 同工酶经电泳分离后，可根据酶的特性，使用不同的染色法进行鉴定。包括：



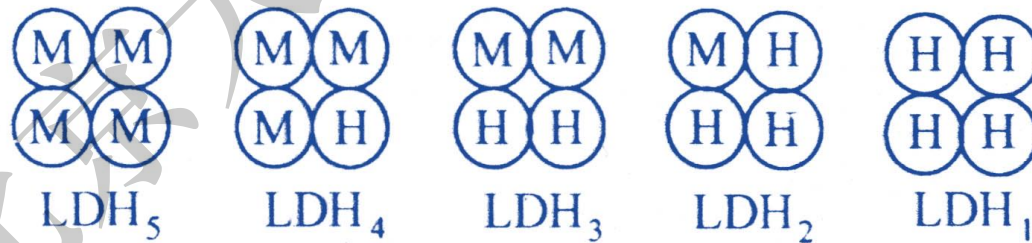
电子转移染色法

- 电子转移染色法是目前同工酶染色最广泛应用的方法，多用于以 NAD^+ 、 NADP^+ 为辅酶的各种脱氢酶类的鉴定。
- 原理：在 NAD^+ 、 NADP^+ 存在下，酶促反应后其产物不显色，只有在催化剂甲硫吩嗪（phenazine methosulfate, PMS）存在下，将电子转移至染料氯化硝基四氮唑蓝（nitroblue tetrazolium chloride, NBT）或甲基噻唑四氮唑蓝MTT，产生不溶性蓝紫色产物甲臞（formazan），可显示各类脱氢酶的存在。反应式如下：



乳酸脱氢酶同工酶的活性染色法

- 乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 。1959年Markert等用电泳的方法将纯化的心肌乳酸脱氢酶(LDH)分离出5条区带, 由阳极到阴极依次命名为LDH1、LDH2、LDH3、LDH4、LDH5, 它们均具有LDH的催化活性, 从而首先提出了同工酶的概念。
- LDH同工酶是由H和M亚基按不同比例组成的四聚体。
- LDH同工酶广泛存在于动植物及微生物中, 动物各组织中LDH同工酶各组分含量不同。临床上对LDH及同工酶的检测可作为某些疾病诊断的依据之一。



乳酸脱氢酶同工酶的活性染色法

- 乳酸脱氢酶同工酶经过**净电荷聚丙烯酰胺凝胶电泳**后，可以保持其原有的分子构象和生物学活性包括酶活性，给同工酶的检测创造了条件，可在凝胶上对同工酶进行原位染色。
- 该实验用同工酶活性染色对LDH进行鉴定，将凝胶浸泡在活性染色液中，LDH与底物的反应，用甲硫吩嗪(PMS)作为电子的中间载体，氯化硝基四氮唑蓝(NBT)作为最终电子受体，底物脱下的氢最后传递给NBT，NBT被还原后，产生蓝紫色的不溶于水的物质以对LDH定位。反应式如下：

