

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.01379

聚丙烯酰胺凝胶快速、高效银染方法的建立

梁宏伟^{1,2}, 王长忠^{1,2,3}, 李忠^{1,2}, 罗相忠^{1,2}, 邹桂伟^{1,2,3}

1. 中国水产科学研究院长江水产研究所,农业部淡水鱼类种质资源与生物技术重点开放实验室,荆州 434000;
2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心,无锡 214081;
3. 华中农业大学水产学院,武汉 430070

摘要: 聚丙烯酰胺凝胶电泳目前已经广泛应用在 SSR 标记、SNP 标记以及遗传图谱的构建等过程中,但是一直以来凝胶银染方法由于染色时间长、染色步骤繁琐,使得对于开展大批量的实验研究极为不利。文章通过对常规方法的改良,建立了一个银染步骤只需要 10 min,整个染胶过程只需约 20 min 的快速、高效的银染方法。

关键词: 银染方法; DNA; 聚丙烯酰胺凝胶

Improvement of the silver-stained technique of polyacrylamide gel electrophoresis

LIANG Hong-Wei^{1,2}, WANG Chang-Zhong^{1,2,3}, LI Zhong^{1,2}, LUO Xiang-Zhong^{1,2}, ZOU Gui-Wei^{1,2,3}

1. Key Laboratory of Fish Germplasm Resources and Biotechnology Certificated by Ministry of Agriculture, Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Jingzhou 434000, China;
2. Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;
3. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract: Polyacrylamide gel electrophoresis is widely applied in the SSR, SNP markers analysis and the construction of genetic map. It is disadvantage to use conventional silver-stained methods in experiment due to taking a very long time and having fussy steps. In this paper, a silver-stained method of DNA in PAGE gel was improved. The improved method is rapid banding which only takes about 20 min, and the high definition picture was obtained.

Keywords: silver-stained method; DNA; polyacrylamide gel electrophoresis

聚丙烯酰胺凝胶电泳(Polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)在 1959 年由 Raymonds 和 Weintraub 建立。由于其使用样品量少、不易扩散,具有较高的分辨率且易于观察^[1],目前已经广泛在 SSR、SNP 等分子标记研究和遗传图谱构建等方面。常规的聚丙烯酰胺凝

胶的染胶过程需要较长的时间,大批量的实验不仅费时、费力,而且影响着整个实验的进展。目前已经有一些银染方法的报道^[2-6],但存在着染色时间较长或分辨率较低等一些方面的缺点,本文旨在通过对常规染色方法的改良,建立一种快速、高效的银染显带方法。

收稿日期: 2008-03-28; 修回日期: 2008-08-01

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划(编号: 2006BAD01A1205), 国家科技基础条件平台专项(编号: 2006DKA30470-002)和中国水产科学研究院水产种质资源与养殖技术重点开放实验室开放课题(编号: 2006A005)资助[Supported by National Science & Technology Pillar Program in the Eleventh Five-year Plan Period(No.2006BAD01A1205), National Key Basic Research Program of Chinese Ministry of Science and Technology (No.2006DKA30470-002), and the Fund of Key Laboratory of Fisheries Genetic Resources & Aquaculture, Chinese Academy of Fisheries Sciences (No.2006A005)]

作者简介: 梁宏伟(1978-), 男, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 鱼类遗传育种。E-mail: lianghw@yfi.ac.cn

通讯作者: 邹桂伟(1963-), 男, 研究员, 研究方向: 鱼类遗传育种。E-mail: zougw@yfi.ac.cn

1 材料和方法

1.1 材料

从中国水产科学研究院长江水产研究所窑湾试验场采集尼罗罗非鱼的尾鳍, 保存在装有无水乙醇的离心管里, 带回实验室, 参考《分子克隆试验指南》^[7], 用苯酚-氯仿抽提法从尾鳍条进行基因组 DNA 提取, 获取模板 DNA。

1.2 PCR 扩增体系和程序

采用 SSR 标记分析方法作为本实验的研究方法, 引物采用 GenBank 上发布的尼罗罗非鱼引物 UNH817 (登录号: G64035), 引物序列如下^[8]:

正向引物序列: 5'-CCTCTTTCTGTGGGTTTC-TCC-3' ;

反向引物序列: 5'-CCCAGCCTGCAGTGATAC-TT-3'

反应体系总体积为 15 μ L, 其中 10 \times buffer 1.5 μ L, 10 mmol/L dNTPs 0.2 μ L, 5 U/ μ L Taq DNA 聚合酶 0.2 μ L, 10 μ mol/L 的上下游引物各 0.5 μ L, DNA 模板 0.2 μ L, ddH₂O 11.9 μ L。PCR 扩增程序为 94 预变性 5 min, 然后 34 个循环, 每个循环 94 变性 30 s, 52 复性 30 s, 72 延伸 1 min, 最后 72 延伸 10 min, 4 保存。

1.3 电泳

采用 12%(39:1)的聚丙烯酰胺凝胶, 150 V 电压电泳 4 h, 然后进行银染照相。

1.4 显带方法

1.4.1 聚丙烯酰胺凝胶常规银染方法一

(1) 电泳结束后切断电源, 从电泳槽中倒出缓冲液, 然后取下胶板, 将凝胶从玻板中取出放入装有蒸馏水的瓷盘中, 用蒸馏水漂洗 2 次。

(2) 固定凝胶: 向盘中加入固定液(10%的乙醇)浸没凝胶, 放在摇床上轻轻摇 20 min, 倒去固定液, 用蒸馏水漂洗 2 次。

(3) 凝胶氧化: 然后加入 1%的硝酸氧化 5 min, 硝酸回收, 用蒸馏水漂洗 2 次。

(4) 银染凝胶: 加入 0.1%的硝酸银染色液浸没凝胶, 放在摇床闭光轻轻摇 30 min, 倒去液体, 用蒸馏水漂洗 2 次。

(5) 凝胶显影: 向瓷盘中加入 2%的碳酸钠(加 0.1~0.2 克硫代硫酸钠, 每 500 mL 溶液加 750 μ L 甲醛)显色液浸没凝胶, 边摇边观察, 直到凝胶上显现

清晰的电泳条带。

(6) 终止显影: 条带清晰后迅速倒出显色液, 尽快加入 4%的乙酸停显液浸没凝胶, 停止显色反应。

(7) 停显后, 加入蒸馏水浸没凝胶。

(8) 凝胶摄影: 用数码相机对凝胶进行照相。

1.4.2 聚丙烯酰胺凝胶常规银染方法二

(1) 电泳结束后切断电源, 从电泳槽中倒出缓冲液, 然后取下胶板, 将凝胶从玻板中取出放入装有蒸馏水的瓷盘中, 用蒸馏水漂洗 2 次。

(2) 固定: 加入固定液(1%的冰醋酸、10%的无水乙醇)进行固定 30 min, 然后用蒸馏水漂洗 2 次。

(3) 银染: 加入染色液(0.2%的 AgNO₃、1%的冰醋酸、10%的无水乙醇)进行银染 20 min, 然后用蒸馏水漂洗 2 次。

(4) 显影: 加入显影液(3%的无水 NaOH, 每 200 mL 溶液加 1 mL 甲醛)进行显色。

(5) 凝胶摄影: 用数码相机对凝胶进行照相。

1.4.3 聚丙烯酰胺凝胶改进的银染方法

(1) 电泳结束后切断电源, 从电泳槽中倒出缓冲液, 然后取下胶板, 将凝胶从玻板中取出放入装有蒸馏水的瓷盘中, 用蒸馏水漂洗 2 次。

(2) 银染: 加入染色液(0.2%的 AgNO₃、1%的冰醋酸、10%的无水乙醇)进行银染, 然后用蒸馏水漂洗 2 次。

(3) 显影: 加入显影液(3%的无水 NaOH, 每 200 mL 溶液加 1 mL 甲醛)进行显色。

(4) 凝胶摄影: 用数码相机对凝胶进行照相。

2 结果

2.1 不同聚丙烯酰胺凝胶银染方法银染结果

不同聚丙烯酰胺凝胶银染方法银染结果见图 1~图 6。图 1 为常规银染方法一的银染结果, 图 2 为常规方法二的银染结果, 图 3~图 6 为改进后不同银染时间的银染结果。从图中可以看出常规银染方法一银染的背景较浅, 目的片段也较为模糊, 不够清晰, 给准确判型带来一定的困难。常规方法二和改进后的方法背景呈黄色, 条带清晰, 便于基因型的判定。

2.2 改进后银染方法不同银染时间对银染结果的影响

对于改进后银染方法条件的优化, 实验中使用

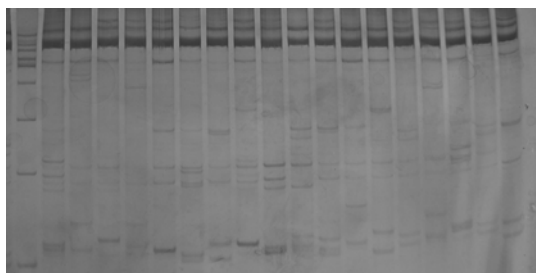


图 1 常规银染方法一的银染结果

Fig. 1 Result of the first conventional silver-stained method

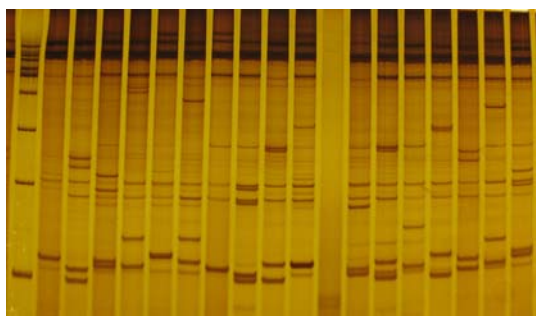


图 2 常规银染方法二的银染结果

Fig. 2 Result of the second conventional silver-stained method

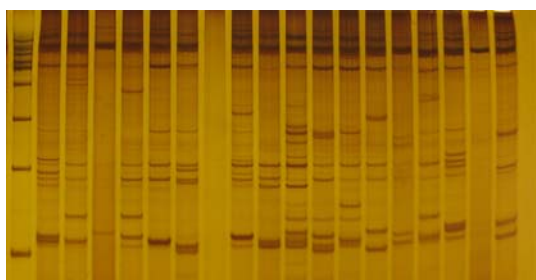


图 3 改进的银染方法银染结果(20 min)

Fig. 3 Result of improved silver-stained method (20 min)



图 4 改进的银染方法银染结果(15 min)

Fig. 4 Result of improved silver-stained method (15 min)

了 20 min、15 min、10 min、5 min 四个银染时间梯度, 从银染结果(图 3~图 6)来看, 显色时间相同(8 min)时

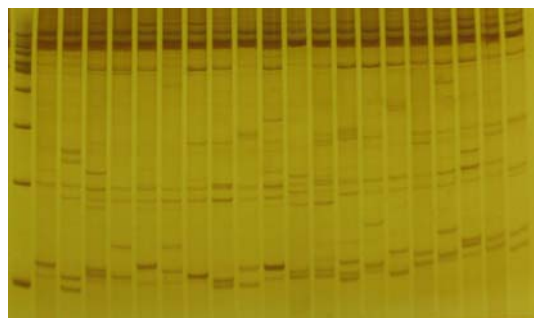


图 5 改进的银染方法银染结果(10 min)

Fig. 5 Result of improved silver-stained method (10 min)

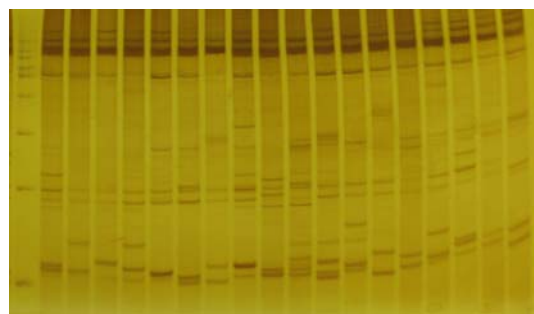


图 6 改进的银染方法银染结果(5 min)

Fig. 6 Result of improved silver-stained method (5 min)

凝胶银染 5 min 和 10 min 的背景颜色较银染 15 min、20 min 时浅, 银染 10 min、15 min、20 min 时 DNA 条带没有明显的差异, 均较清晰, 而银染 5 min 时条带稍有模糊, 清晰度较差。

2.3 不同银染方法银染时间比较

从表 1 可以看出, 常规方法一需要时间最长, 至少需要 65 min, 而改进后的银染方法需要时间明显缩短, 最长的也只需要 30 min 左右。

3 讨论

聚丙烯酰胺凝胶银染显色整个过程需要分步进行, 常规的显色方法需要花费较长的时间。本实验主要以缩短显色时间为目点, 但其是以得到理想的目的条带为前提条件的, 因而并非染色时间越短越好, 故在改进后的银染步骤中设置了梯度, 以筛选适宜的银染时间。通过四个时间梯度的银染效果比较发现, 显色时间相同时凝胶银染 5 min 和 10 min 的背景颜色较银染 15 min、20 min 时浅, 银染 10 min、15 min、20 min 时 DNA 条带没有明显的差异, 均较清晰, 而银染 5 min 时条带稍有模糊, 不是很清晰, 因而笔者认为采用 10 min 的显色时间为好。同

表 1 不同银染方法银染时间比较

Table 1 Comparison of time in different silver-stained method

	常规方法一 First conventional silver-stained method (min)	常规方法二 Second conventional silver-stained method (min)	改进后银染方法 Improving silver-stained method (min)			
固定 Fixing	20	30				
氧化 Oxidation	5		20	15	10	5
银染 Silver-stained	30	20				
显色 Banding	10	8	8	8	8	8
共计 Total	65	58	28	23	18	13

时, 实验过程中还发现银染时间的长短并不影响显色时间, 在改进后的方法中筛选适宜的银染时间时虽然银染的时间不同, 但是在显色步骤中 8 min 左右均能出现较好的染色效果。

聚丙烯酰胺凝胶显色在整个实验中需要花费相当大的一部分时间, 特别是在进行大批量的实验中, 譬如在 SSR、SNP 等遗传多样性分析以及遗传图谱构建过程中。由于染胶过程都是分步进行的, 每一步都需要一定的时间去等待, 需要投入较大的精力。在本文比较的 3 种银染方法中, 常规方法一整个银染过程至少需要 65 min, 常规方法二则也至少需要 58 min, 而改进后的银染方法整个过程中银染需要 10 min, 显色需要 8 min, 整个过程只需要 20 min 左右。在 3 种方法中改进后的银染法最为省时, 极大地提高了工作效率。常规方法一整个需要经过 8 个步骤, 常规方法二需要 5 个步骤, 而改进后的方法需要 4 个步骤。就染胶的核心步骤(即除去取胶板和照相步骤)而言, 常规方法一分 6 步进行, 常规方法二分 3 步进行, 改进后的方法则只有 2 步。在 3 种方法中改进后的方法步骤最少, 操作更为简便。

在染色试剂的配制方面, 常规染色方法一在染胶过程中需要配制固定液、氧化液、染色液、显色液、停显液 5 种溶液, 常规染色方法二需要配制固定液、染色液、显色液 3 种溶液, 而改进后的染色方法只需要配制染色液、显色液两种溶液。染胶过程中明显的减少了溶液配制的种类, 从而简化了显色程序。改进后的方法在染胶过程中省去了常规方法一中使用的硫代硫酸钠, 同时其冰醋酸和无水乙醇的用量也仅为常规方法二的一半, 节约了试剂的用量, 降低了成本。

参考文献(References):

- [1] YANG An-Gang, MAO Ji-Fang, YAO Li-Bo. Laboratory Methods in Biochemistry and Molecular Biology. Beijing: High Education Press, 2001, 37–39.
- [2] 杨安钢, 毛积芳, 药立波. 生物化学与分子生物学实验技术. 北京: 高等教育出版社, 2001, 37–39.
- [3] Bassam BJ, Caetano AG, Gresshoff PM. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamid gels. *Anal Biochem*, 1991, 196: 80–83. [\[DOI\]](#)
- [4] FANG Wei-Guo, WEI Yu-Tuo, PEI Yan. An effective silver staining protocol for DNA. *Hereditas (Beijing)*, 2000, 22(3): 167–168.
- [5] 方卫国, 韦宇拓, 裴炎. 一种新的 DNA 银染方法. *遗传*, 2000, 22(3): 167–168.
- [6] ZHOU Guo-Quan, WU Guang-Hong, HUANG Cui-Yan, CAI Yi, ZHAN Fu-Jian, HUANG Zhuo-Lie. A rapid de-staining method of polyacrylamide gel electrophoresis. *Plant Physiology Communications*, 2006, 42(1): 95–97.
- [7] 周国权, 巫光宏, 黄翠颜, 蔡毅, 詹福建, 黄卓烈. 聚丙烯酰胺凝胶电泳的快速脱色方法. *植物生理学通讯*, 2006, 42(1): 95–97.
- [8] HAN Yong-Liang, CHANG Jin-Hua. Comparative analysis of two kinds methods to detect SSRs on polyacrylamide gel electrophoresis systems. *Rain Fed Crops*, 2006, 26(3): 176–177.
- [9] 韩永亮, 常金华. 聚丙烯酰胺凝胶电泳的两种染色方法对 SSR 标记的影响. *杂粮作物*, 2006, 26(3): 176–177.
- [10] GUAN Hai-Tao, XU Shi-Chang, GUO Yu-Hua. Comparison of two ways of silver staining for DNA in PAGE. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2006, 37(1): 86–87.
- [11] 关海涛, 徐世昌, 郭玉华. 两种聚丙烯酰胺凝胶银染方法的比较. *沈阳农业大学学报*, 2006, 37(1): 86–87.
- [12] HUANG Pei-Tang. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Beijing: Science Press, 2005, 484–485.
- [13] 黄培堂. 分子克隆实验指南. 北京: 科学出版社, 2005, 484–485.
- [14] Carleton KL, Streelman JT, Lee BY, Garnhart N, Kidd M, Kocher TD. Rapid isolation of CA microsatellites from the tilapia genome. *Animal Genetics*, 2002, 33: 140–144. [\[DOI\]](#)