

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2009.00668

# 低背景、高分辨率 PAGE 简易银染法

高东, 杜飞, 朱有勇

云南农业大学农业生物多样性应用技术国家工程研究中心, 农业生物多样性和控制病虫害教育部重点实验室, 云南省植物病理重点实验室, 昆明 650201

**摘要:** 聚丙烯酰胺凝胶电泳银染一直存在耗时长、步骤繁琐等缺陷, 是其批量应用的瓶颈。文章报道了一种低背景、高分辨率的 PAGE 简易银染方法, 该法在降低 NaOH 浓度和批量显带方面进行了有益的探索, 建立了节省时间、节约试材, 对批量显带尤为实用的简易银染法。

**关键词:** 聚丙烯酰胺凝胶; 银染; 显影

## Low-background and high-resolution contracted silver-stained method in polyacrylamide gels electrophoresis

GAO Dong, DU Fei, ZHU You-Yong

*The National Center for Agricultural Biodiversity, Ministry of Education Key Laboratory of Agricultural Biodiversity for Plant Disease Management, Key laboratory of Plant Pathology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China*

**Abstract:** The disadvantage of time-consuming and fussy steps of conventional silver-stained method for polyacrylamide gels is evident, and has become the choke point in its application. In this paper, a low-background and high-resolution contracted silver-stained method for polyacrylamide gels was established. Compared with the conventional banding method, this contracted method has fewer steps and needs fewer reagents, in particular, lower NaOH concentration. It is rapid and economic, especially for mass silver-staining.

**Keywords:** PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis); silver staining; banding

聚丙烯酰胺凝胶电泳(Polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)自 1959 年建立以来, 在遗传图谱构建<sup>[1-4]</sup>和分子标记研究<sup>[5, 6]</sup>, 特别是大批量遗传多样性分析<sup>[7]</sup>等方面得到了广泛应用。针对大规模批量实验的需要, 在Bassam等<sup>[8]</sup>PAGE常规显带方法的基础上, 不少研究者对其简易方法进行了探索, 在显带时间和分辨率方面取得了很大进展<sup>[9-15]</sup>。本研究报道一种简易PAGE显带方法, 该法具有高分辨率、低背景、节省时间、节约试材和方便批量显带等优点。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

水稻三叶一心期幼苗叶片总 DNA; SSR 引物 RM335 和 RM225, 引物序列见表 1。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 PCR 反应体系和程序

反应体系 10  $\mu$ L, 包含 1  $\mu$ L 10 $\times$  buffer, 1  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L), 上下游引物各 0.4  $\mu$ L (10  $\mu$ mol/L),

收稿日期: 2008-11-04; 修回日期: 2008-11-28

基金项目: 国家“973”计划项目(编号: 2006CB100200)资助

作者简介: 高东(1978-), 男, 博士, 研究方向: 作物遗传多样性与病害控制。E-mail: gaodong521@yahoo.com.cn

通讯作者: 朱有勇(1955-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 作物遗传多样性与病害控制。E-mail: yppl@public.km.yn.cn

表 1 引物序列

位点	染色体	正向引物(5' 3')	反向引物(5' 3')
RM335	4	GTACACACCCACATCGAGAAG	GCTCTATGCGAGTATCCATGG
RM225	6	TGCCCATATGGTCTGGATG	GAAAGTGGATCAGGAAGGC

0.6 μL dNTPs (2.5 mmol/L each), 0.1 μL *Taq* DNA 聚合酶 (5 U/μL), 1 μL 模板 DNA (25~50 ng), 5.5 μL ddH<sub>2</sub>O。PCR 反应在 Eppendorf 5333 型 Mastercyder Gradiet PCR 仪上进行, 反应程序为: 94 预变性 3 min, 94 40 s, 55 30 s, 72 40 s, 36 个循环, 最后 72 延伸 10 min。

1.2.2 PCR 产物分离

PCR 产物在 6%的聚丙烯酰胺变性胶上分离, 胶片大小为 195 mm (长) × 120 mm (宽) × 1 mm (厚)。上样前, 加等体积上样缓冲液与 PCR 产物混合, 95 变性 5 min。300 V 电压电泳 1.5 h。

1.2.3 简易显带方法

(1) 电泳结束后, 自来水冲洗玻璃板双面, 预冷, 剥下凝胶, ddH<sub>2</sub>O 洗涤 2 次, 浸没于 200 mL 0.1%硝

酸银溶液中银染 10~20 min。

(2)银染后 ddH<sub>2</sub>O 洗涤 2 次, 随后浸没于 1.5% NaOH 溶液(含 0.4%甲醛)中显影约 5~10 min, 到见清晰的 DNA 条带为止, 显影后立刻用 ddH<sub>2</sub>O 洗涤 2 次, 将胶平铺于自制灯箱上, 用数码相机照相并存入电脑。

2 结果与分析

2.1 胶片质量

简易显带方法所得胶片质量高, 背景色低、分辨率高、条带更清晰(图 1); 常规银染方法(图 2 A)<sup>[14]</sup>、以往的改良银染方法所获得的图片(图 2, B, C和D)<sup>[14]</sup>以及将胶保留在缺口玻璃板银染晾干读带法(图 3)<sup>[15]</sup>, 在背景色、分辨率、目的条带清晰度等方面或其中某一方面不甚理想。

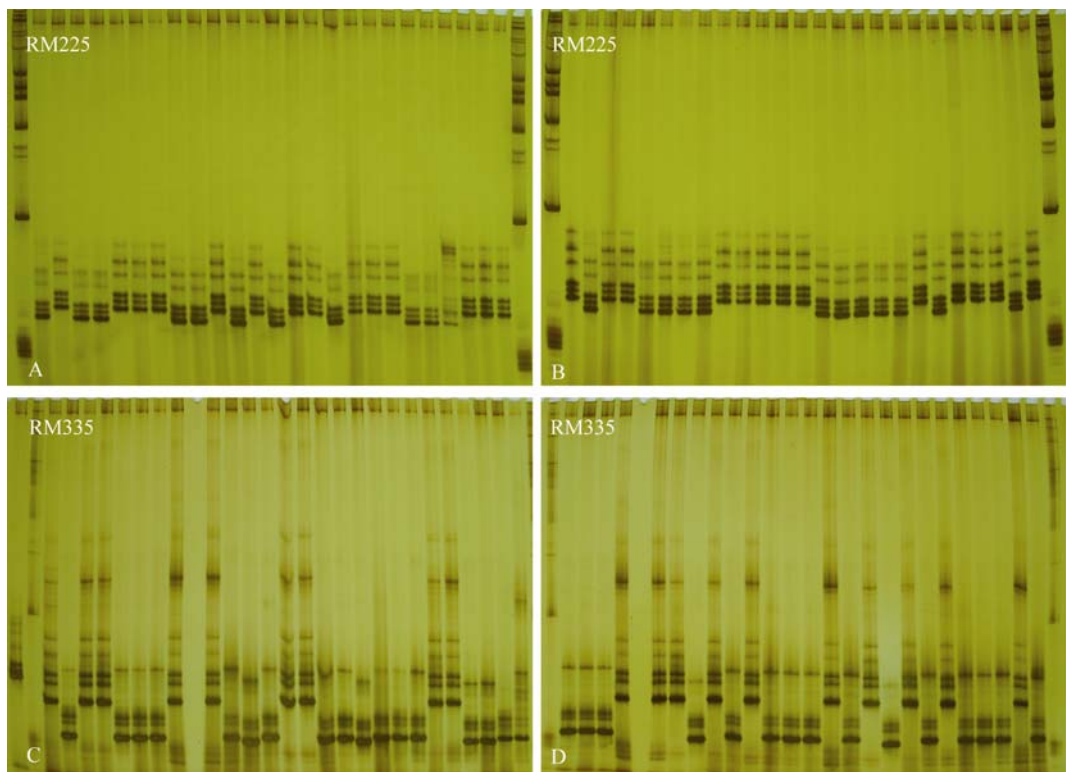


图 1 简易银染方法显带结果(2 μL PCR 产物)

A: 0.1% AgNO<sub>3</sub> 银染 15 min, 1.5% NaOH 显带 6 min; B: 0.1% AgNO<sub>3</sub> 银染 20 min, 1.5% NaOH 显带 6 min; C: 0.1% AgNO<sub>3</sub> 银染 15 min, 1.2% NaOH 显带 8 min; D: 0.1% AgNO<sub>3</sub> 银染 20 min, 1.2% NaOH 显带 8 min。

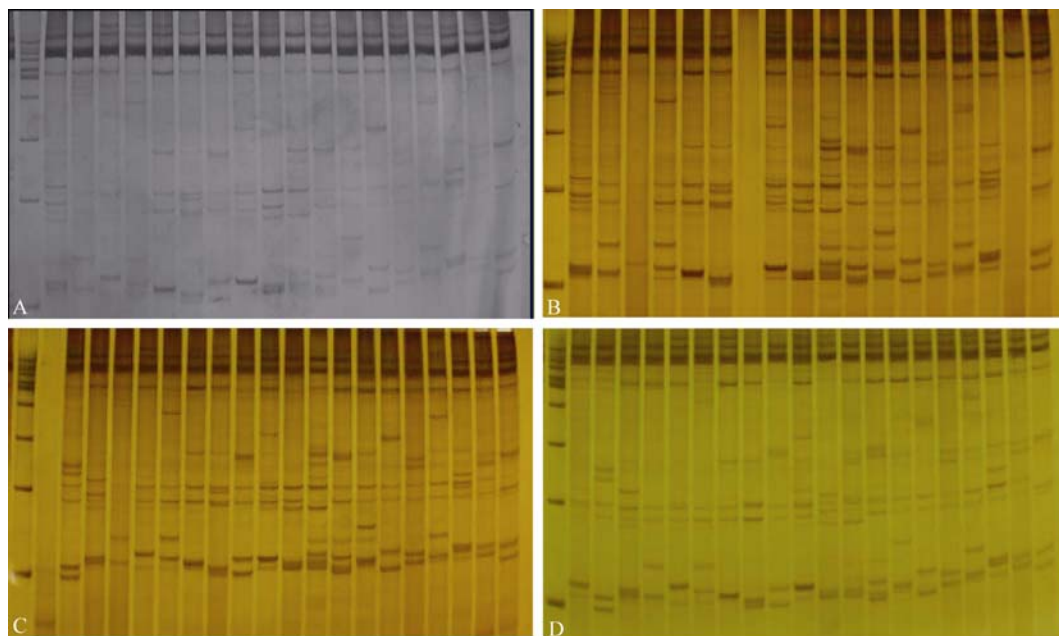


图 2 常规和改进银染方法显带结果<sup>[14]</sup>

A: 常规方法; B、C、D: 改进方法, 0.2%AgNO<sub>3</sub>、1%冰醋酸、10%无水乙醇进行银染, 时间依次为 20 min, 15 min 和 10 min; 然后用 3% NaOH 和 0.5% 甲醛显带 8 min。

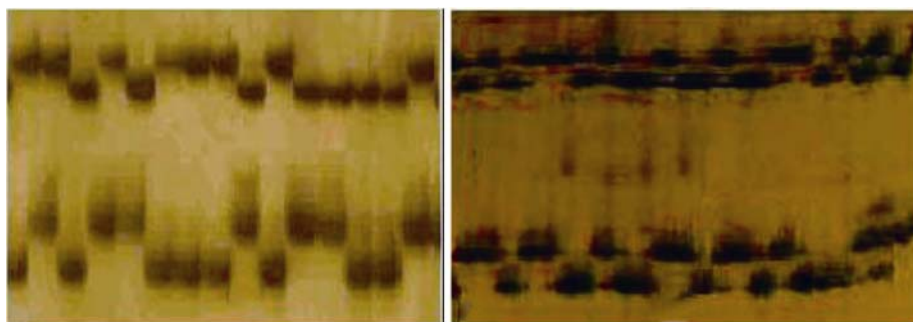


图 3 改进晾干读带法不同时间显带结果

0.1% AgNO<sub>3</sub> 银染, 2% NaOH 显带<sup>[15]</sup>。

## 2.2 显带耗时

常规银染方法一般需要 1 h 以上, 以往的改良银染方法明显缩短了显带时间。本研究建立的简易显带方法理论上只需 15 min, 实际操作中, 对于不同的样品, 要获得低背景、高分辨率、条带清晰的结果, 可在 15~30 min 间寻找适合各实验者习惯的最佳时间。

## 2.3 试剂消耗

简易法比常规银染方法大大节约了试剂, 与以往的改进银染方法相比, 没有使用冰醋酸和无水乙醇, 同时在 AgNO<sub>3</sub>、NaOH 和甲醛用量方面也有很大节约。

## 2.4 简易显带法时间缓冲能力

图 1 A、B 结果显示: 用 0.1% AgNO<sub>3</sub> 和 1.5% NaOH 显带, 在显影时间相同的情况下, 银染 15 min 和 20 min 无明显差异, 以往的改进银染方法有一定差异, 特别是 15 min 和 10 min 存在明显差异(图 2, B、C 和 D; 图 3); 图 1 C、D 结果显示: 用 0.1% AgNO<sub>3</sub> 和 1.2% NaOH 显带, 银染时间对显带也无明显影响, 以往的改进方法对银染时间要求相对严格(图 3); 比较 A 和 C、B 和 D, 发现可以通过降低 NaOH 浓度, 稍延长显影时间的方法降低背景色, 提高胶片质量。由于所用 AgNO<sub>3</sub> 和 NaOH 浓度比以往的改进银染方法低, 所以本简易方法在银染

15~20 min 和显影 6~8 min 内, 对时间较不敏感。

## 2.5 批量银染耗时结果

以笔者习惯采用的批量银染方法: 20 板胶分 4 批调节时间梯度, 一条龙顺次银染、显影为例。以第一批 5 板 8:00 开始, 0.1%  $\text{AgNO}_3$  银染 18 min, 1.5%  $\text{NaOH}$  显影 7 min 为例。现就时间分配详细说明如下: 8:00 开始第一批银染, 8:05 第二批, 8:10 第三批, 8:15 第四批, 每批 5 板剥胶约需 2~3 min, 恰好接上第一批显影时间 8:18, 8:23 开始第二批显影, 洗涤、换显影液  $\text{NaOH}$  每批约需 2 min, 恰好接上第一批照相时间 8:25, 照相耗时约 3 min, 恰好接上第三批显影时间 8:28, 依此类推(表 2)。理论上 20 板胶仅需 43 min, 在实际实验中笔者一般在 50~60 min 内完成 20 板胶显带实验。由于本简易方法在此时间段对银染和显影时间相对不敏感, 在实际操作中, 动作稍慢, 每步推后 2~3 min 对胶片质量影响不明显, 为批量银染提供了条件。

## 3 讨论

PAGE 银染、显影的胶片质量对统计分析至关重要, 若胶片背景色浓、分辨率低、条带模糊, 在统计时很容易误判, 导致分析结果不准确, 甚至完全错误。多数常规和改良的显色方法背景色浓、分辨率低<sup>[14,15]</sup>, 大多是由于  $\text{AgNO}_3$ 、 $\text{NaOH}$  和甲醛浓度较高, 银染和显影时间不易控制所致。改良方法也大多在试剂浓度、银染和显影时间上做优化<sup>[8~16]</sup>。如梁宏伟等<sup>[14]</sup>在试剂浓度、银染和显影时间上做优化, 采用 0.2%  $\text{AgNO}_3$ 、1% 冰醋酸、10% 无水乙醇进行银染, 然后用 3%  $\text{NaOH}$  和 0.5% 甲醛显带, 建立了聚丙烯酰胺凝胶快速、高效银染方法; 张玉山和白旭峰<sup>[15]</sup>采用 0.1%  $\text{AgNO}_3$  银染, 2%  $\text{NaOH}$  显带, 建立了简单快速高分辨率的 PAGE 显带方法。以往改良方法得到胶片质量比常规方法明显提高, 但是由于  $\text{AgNO}_3$  和  $\text{NaOH}$  或其中之一浓度仍然较高, 胶片质量有待

进一步提高。乐晓萍等<sup>[16]</sup>研究发现甲醛浓度梯度对显影有较大影响, 浓度越低, 显影时间越长, 以 0.5% 浓度效果最佳, 对比度最好。我们对甲醛浓度梯度实验, 最终采用了 0.4% 甲醛, 同样获得了质量较好的胶片。许绍斌等<sup>[17]</sup>发现在显影液中加入弱碱盐, 有助于显带和保持条带的稳定, 韩永亮和常金华<sup>[12]</sup>发现弱碱法染色的背景浅, 更适于观察。本研究采用降低  $\text{AgNO}_3$ 、 $\text{NaOH}$  和甲醛浓度的策略, 特别是采用强碱低浓度的策略, 较好地降低了背景色, 提高了分辨率, 克服了弱碱耗时长缺点。同时发现在对多条带, 且条带大小差别不大的胶片染色时, 可以采用降低上样量和显影甲醛浓度, 适当延长银染和显影时间, 或者在原上样量的情况下采用弱碱盐( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  或  $\text{NaHCO}_3$ )代替  $\text{NaOH}$  显影均有助于获得优质的胶片。

聚丙烯酰胺凝胶显色在整个实验中的耗时问题也是研究人员较为重视的一个问题, 常规显带方法耗费大量的精力和时间, 逐步被改进方法所取代<sup>[9~15]</sup>。特别是在进行大批量遗传图谱构建和遗传多样性评估过程中, 凝胶显色耗时问题成为实验进度的瓶颈。傅占江等<sup>[18]</sup>比较 3 种银染方法发现: Carlos 等方法的操作时间需要 20 min; Brant 等的操作时间需要 1 h; 而 Johansson 和 Skoog 的操作时间至少需要 4.25 h。本研究通过优化显色方法, 简化步骤和合理安排各步时间, 在保证胶片质量的同时大大节约了时间, 加快了实验进度。

实验中节约试剂和材料是实验室尤为关注的问题, 常规方法为了降低背景, 采用烦琐的洗脱、固定和终止步骤, 大大耗费了时间和试剂<sup>[18]</sup>。改良方法<sup>[14~16]</sup>一般都略去了固定和终止步骤, 但是在试剂用量方面仍然值得探讨。本研究在保证胶片质量的前提下, 弃用了冰醋酸和无水乙醇, 降低了  $\text{AgNO}_3$  和甲醛浓度, 特别是通过降低  $\text{NaOH}$  浓度的策略, 大大节约了试剂, 降低了成本。同时本研究弃用带有刺鼻气味的固定液醋酸、降低甲醛浓度对实验者健康有利。

表 2 批量银染理论时间表

	第一批	第二批	第三批	第四批
银染	8:00~8:18	8:05~8:23	8:10~8:28	8:15~8:33
显影	8:18~8:25	8:23~8:30	8:28~8:35	8:33~8:40
照相	8:25~8:28	8:30~8:33	8:35~8:38	8:40~8:43
共计	43 min			

聚丙烯酰胺凝胶显色各步骤在耗时方面的缓冲问题是批量显色时最需要考虑的问题。张玉山和白旭峰<sup>[15]</sup>采用其建立的改良方法代替常规方法, 仅仅用常规方法五分之一的时间就构建了水稻全基因组分子标记连锁图谱。常规方法耗时长, 大部分改进方法, 由于AgNO<sub>3</sub>和NaOH浓度仍然偏高, 同时又省去了固定和终止显影步骤, 导致对剩余各步时间要求较严格, 缩短时间则条带不清晰, 延长则背景色增强<sup>[14,15]</sup>, 而且越到显影后期显影速度越快。在批量显色时动作稍慢, 就会显色过度, 给一次染板数量带来了较大限制。梁宏伟等<sup>[14]</sup>对常规方法和部分改进方法银染各步骤时间进行比较, 结果显示改进方法不仅节约各步时间, 而且节省了步骤。根据其结果: 常规方法一单板银染全程耗时 65 min; 常规方法二单板银染全程耗时 58 min; 而其建立的改进方法以 18 min最佳, 大大节约了时间。常规方法一和二单板银染全程耗时均高于本研究 20 板批量银染时间; 假使采用其 18 min最佳改进法(银染 10 min, 显色 8 min), 而换显影液和照相就耗时约 5 min, 时间相对紧缺, 动作稍慢, 就会显色过度。笔者倾向于推荐使用其 23 min改进法进行批量银染。本研究采用降低试剂浓度, 特别是NaOH浓度的策略, 使得在 15~20 min内银染, 在 6~8 min内显影, 可以适当调整银染和显影时间, 方便批量染胶, 同时, 这种时间限制缓冲能力, 也方便不同实验者根据各自习惯调整银染和显影时间, 进行批量染胶, 获得满意胶片。

#### 参考文献(References):

- [1] Jiang GH, He YQ, Xu CG, Li XH, Zhang QF. The genetic basis of stay-green in rice analyzed in a population of doubled haploid lines derived from an *indica* by *japonica* cross. *Theor Appl Genet*, 2004, 108(4): 688–698. [\[DOI\]](#)
- [2] 储黄伟, 刘海生, 李晖, 王红梅, 韦嘉励, 李娜, 丁淑燕, 黄海, 马红, 黄潮锋, 罗达, 袁政, 刘文轩, 张大兵. 水稻叶状颖壳突变体 *Oslh* 的遗传分析和 *OsLH* 基因的定位. *植物生理与分子生物学学报*, 2005, 31 (6): 594–598.
- [3] Wang GW, He YQ, Xu CG, Zhang QF. Identification and confirmation of three neutral alleles conferring wide compatibility in inter-subspecific hybrids of rice (*Oryza sativa* L.) using near-isogenic lines. *Theor Appl Genet*, 2005, 111(4): 702–710. [\[DOI\]](#)
- [4] Yue B, Xue WY, Xiong LZ, Yu XQ, Luo LJ, Cui KH, Jin DM, Xing YZ, Zhang QF. Genetic basis of drought resistance at reproductive stage in rice: separation of drought tolerance from drought avoidance. *Genetics*, 2006, 172(2): 1213–1228. [\[DOI\]](#)
- [5] 施勇烽, 应杰政, 王磊, 朱智伟, 庄杰云. 鉴定水稻品种的微卫星标记筛选. *中国水稻科学*, 2005, 19(3): 195–201.
- [6] 庄杰云, 施勇烽, 应杰政, 鄂志国, 曾瑞珍, 陈洁, 朱智伟. 中国主栽水稻品种微卫星标记数据库的初步构建. *中国水稻科学*, 2006, 20(5): 460–468.
- [7] Zhang HY, Liu XZ, Li TS, Yang YM. Genetic diversity among flue-cured tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) revealed by amplified fragment length polymorphism. *Bot Studies*, 2006, 47(3): 223–229.
- [8] Bassam BJ, Caetano AG, Gresshoff PM. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamid gels. *Anal Biochem*, 1991, 196(1): 80–83. [\[DOI\]](#)
- [9] 方卫国, 韦宇拓, 裴炎. 一种新的 DNA 银染方法. *遗传*, 2000, 22(3): 167–168.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] Ji YT, Qu CQ, Cao BY. An optimal method of DNA silver staining in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 2007, 28(8): 1173–1175. [\[DOI\]](#)
- [14] 梁宏伟, 王长忠, 李忠, 罗相忠, 邹桂伟. 聚丙烯酰胺凝胶快速、高效银染方法的建立. *遗传*, 2008, 30(10): 1379–1382.
- [15] 张玉山, 白旭峰. 一种简单快速高分辨率的 PAGE 胶显带方法. *遗传*, 2008, 30(2): 251–254.
- [16] 乐晓萍, 杜鹃, 张钦宪, 丁一, 金辉. 聚丙烯酰胺凝胶银染技术改良. *河南医科大学学报*, 2001, 36(4): 395–396.
- [17] 许绍斌, 陶玉芬, 杨昭庆, 褚嘉档. 简单快速的 DNA 银染和胶保存方法. *遗传*, 2002, 24(3): 335–336.
- [18] 傅占江, 刘宝文, 刘体全, 谢明, 江源, 刘晓达, 王全立. DNA 聚丙烯酰胺凝胶电泳三种银染方法比较. *临床军医杂志*, 2002, 30(4): 71–73.