

# 用于检测病毒多肽的一种灵敏快速的染色法

李 港 张义平 张亚强 李洪臻 王用楫

(卫生部北京生物制品研究所)

**摘要** 本文报道了铬银染色法用于 PAGE 分析 I 型单纯疱疹病毒 (HSV-I) 结构多肽的方法, 并与常规法考马斯亮蓝 R 250 染色进行了比较。前者检出 45 条多肽带, 后者仅能检出 28 条。这个结果表明, 铬银染色法具有灵敏、快速的特点。

**关键词** 聚丙烯酰胺凝胶电泳; I 型单纯疱疹病毒; 结构多肽; 铬银染色

PAGE 是目前实验室广泛用于分析蛋白质的方法, 通常以考马斯亮蓝或氨基黑进行染色, 但这两种染料对蛋白质的着色并不敏感, 不能检出 ng 量的电泳区带。1979 年 Switzer 发表了铈银染色法<sup>[1]</sup>, 1981 年 Merrill 又报道了铬银染色法<sup>[2]</sup>, 在 PAGE 中铬银染色法可检测到 ng 水平, 较考马斯亮蓝染色敏感 100 倍<sup>[3,4]</sup>, 其灵敏度可与同位素放射自显影媲美。这样既可大大简化实验步骤, 同时也无需放射性同位素实验室的严格条件和必要的防护设施。目前铬银染色法已用于蛋白质的分析, 对于分子量较小的多肽效果如何, 似应加以观察, 我们综合有关铬银染色法的资料, 在实践中作了一些改进,

对 I 型单纯疱疹病毒 (HSV-I), 进行了结构多肽的分析, 结果报告如下。

## 材料与 方法

### (一) 材料

I 型单纯疱疹病毒 (HSV-I) 为本实验室保存的 SM-44 毒株。所用化学试剂为北京化工厂的分析纯产品。电泳仪为北京生化仪器厂生产的 BS423 型稳流稳压电泳仪。

### (二) 方法

#### 1. 病毒的培养和纯化

使 HSV-I 在人胎肺二倍体细胞 (2BS 株) 内, 进行培养繁殖, 所用维持液中不加牛血清。

收获物经二次冻融, 7000r/min 离心 30 分钟取上清, 再以 36000r/min 离心 2 小时, 取沉淀悬于少量 pH 7.2 的 PBS 中, 经超声波分散后, 进行 25—70% 蔗糖密度梯度离心, 25000r/min 2 小时, 吸取病毒带用 PBS 悬洗后, 再经 36000 r/min 离心, 超声波分散, 即为纯化之病毒样品, 置 -27℃ 冰箱备用。

## 2. SDS-PAGE

垂直板型凝胶电泳, 用 4% 隔层胶、10% 分离胶, 均含有 0.1% SDS。电极缓冲液, pH 8.3 0.05mol/L Tris-甘氨酸缓冲液(含 0.1% SDS)。样品处理液, 5% 2ME、3% SDS、30% 甘油、12.5% 电泳缓冲液、0.005% 溴酚蓝。病毒经样品处理液煮沸 5 分钟, 冷后上样电泳, 开始电压 60V, 样品进入分离胶后调至 200V, 电泳 3 小时。

## 3. 染色

(1) 考马斯亮蓝染色法: 0.2% 考马斯亮蓝 R 250, 甲醇-醋酸溶液, 凝胶板染色 30 分钟, 7% 醋酸脱色, 直至底色透明为止。

(2) 铬银染色法: 参考 Merrill<sup>[4]</sup> 及其他方法<sup>[3,5]</sup>作了一些改进, 具体步骤如下:

① 电泳凝胶在 50% 甲醇-12% 醋酸溶液中, 固定 30 分钟或 1 小时。

② 用 10% 甲醇-5% 醋酸溶液浸洗三次, 每次 15 分钟。

③ 在 3.4mmol/L 重铬酸钾-3.2mmol/L 硝酸银溶液中, 氧化 10 分钟。

④ 用无离子水充分浸洗凝胶 45 分钟, 每 5 分钟换水一次, 到底色几乎无色为止。

⑤ 在 12mmol/L 硝酸银溶液中, 浸泡 20 分钟, 经常摇动。

⑥ 无离子水浸洗三次, 每次 2 分钟。

⑦ 用 0.28mol/L 碳酸钠-甲醛溶液进行显影, 甲醛用量为 1000ml, 在 0.28 mol/L 碳酸钠溶液中, 加 0.5ml 市售的甲醛溶液。在显影过程中, 随时更换显影液, 直到凝胶上褐色蛋白带的深度达到要求为止。

⑧ 立即将凝胶浸泡在 3% 醋酸中停影, 10 分钟后, 可将凝胶放于无离子水中保存或制成

凝胶干片。

## 结果与讨论

本实验所纯化的 HSV-I 经电镜检查, 呈单一病毒颗粒, 无细胞碎片及细胞器存在(图 1), 表明我们所用的病毒样品是高度纯化的。



图 1 I 型单纯疱疹病毒电子显微镜照片(60000×)

同一批 HSV-I 样品电泳后, 分别用考马斯亮蓝 R 250 及铬银法染色, 对两种染色方法的结果进行比较。结果证明, 考马斯亮蓝法染色仅检出 28 条多肽带, 而铬银法染色却检出了 45 条(图 2), 而且底色透明, 色带清晰, 比前者大大提高了检出率。

蛋白质铬银染色法的基本原理系银离子与蛋白质以盐或配价络盐形式结合, 后经甲醛将银离子还原成可见的银颗粒, 其中重铬酸钾起到媒染剂的作用, 可使着色加深<sup>[3]</sup>。在铬银染色中, 第 4 步用无离子水充分浸洗非常必要, 否则 3.4 mmol/L 重铬酸钾与 12 mmol/L 硝酸银相遇, 其浓度积将大于重铬酸银的溶度积, 在凝胶上, 可产生红色沉淀使染色失败。第 7 步中, 显影液一旦浑浊, 就应立即更换, 否则沉淀物将吸附于凝胶表面, 使底色浑浊不清, 从而影响凝胶的透明度。

通过我们的实验表明, 铬银染色法, 用于多肽的分析效果是满意的, 该法不仅检出率高, 而且 3 小时即可得到清晰的凝胶图谱, 不需考马斯亮蓝法的长时间醋酸脱色, 从而缩短了实验时间, 同时也不需要特殊设备和试剂。由此可知, 用 SDS-PAGE 检测蛋白质、多肽的铬银染色法, 具有灵敏、快速等优点, 因此该法对于蛋白质及多肽的分析具有广泛的实用价值, 尤其

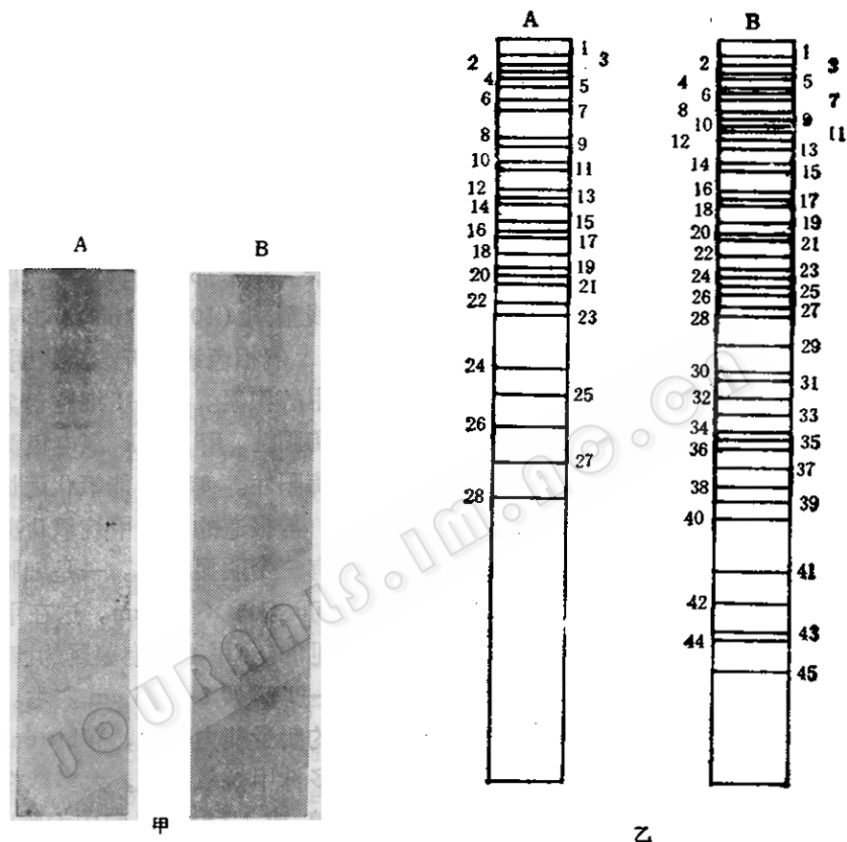


图2 1型单纯疱疹病毒结构多肽 SDS-PAGE 图谱(甲)和示意图(乙)

A. 考马斯亮蓝 R250 染色 B. 铬银染色

对蛋白含量较少的样品,由于此法十分敏感,更能取得令人满意的结果。

### 参 考 文 献

[1] Switzer, R. C. et al: Anal. Biochem. 98: 231, 1979.

[2] Merril, C. R. et al: Science, 211: 1437, 1981.

[3] 张向明:《生物化学与生物物理进展》,3: 63, 1983.

[4] 《Methods in Enzymology》 104(C): 442, 1984.

[5] Tsai Chao-Ming et al.: Anal. Biochem. 119: 115—119, 1982.