مقایسه سه روش رنگ آمیزی کوماسی بلو R250، کلوئیدال کوماسی بلو و نقره آبی در ظاهر سازی پروتئین های مغز موش جدا شده توسط الکتروفورز دو بعدی

آنا میفور[1*]، مصطفی رضایی طاویرانی[1]

۱) مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران

تاریخ دریافت: ۹۲/۸/۱ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۲/۷

چکیده

مقدمه: در اغلب موارد، پس از انجام الکتروفورز دو بعدی تا چند صد پروتئین روی ژل از یکدیگر تفکیک می شوند. از آن جا که این پروتئین ها بی رنگ هستند، لازم است به نحوی آن ها را رنگ آمیزی و آشکار نمود. پس از رنگ آمیزی، هر پروتئین به صورت یک لکه روی ژل ظاهر می شود.

مواد و روش ها: در این تحقیق سه روش رنگ آمیزی کوماسی ساده، کلوئیدال کوماسی بلو و نقره آبی برای ظاهر سازی لکه های پروتئینی مغز موش ماده که توسط الکتروفورز دو بعدی جدا سازی شده اند مورد استفاده و مقایسه قرار گرفتند تا حساس ترین و مناسب ترین رنگ آمیزی مورد شناسایی قرار گیرد.

یافته های پژوهش: ژل های به دست آمده از الکتروفورز دو بعدی پروتئین های مغز موش ماده پس از مرحله تثبیت هر کدام در محلول رنگ مربوطه قرار گرفتند. سه ژل برای سه رنگ آمیزی کوماسی بلو R250، کلوئیدال کوماسی بلو و نقره آبی ظاهر گردیدند. پس از رنگ آمیزی هر کدام(طبق پروتکول مربوطه) رنگ زدایی شده و عکس آن ها ظاهر گردید.

بحث و نتیجه گیری: نتایج نشان داد که رنگ آمیزی نقره آبی بهترین روش برای رنگ آمیزی پروتئین مغز موش در ژل های الکتروفورز دوبعدی است.

واژه های کلیدی: کوماسی بلو R250، کلوئیدال کوماسی بلو، نقره آبی، پروتئین

***نویسنده مسئول**: مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران

Email: *meyfour_a@yahoo.com*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

مقدمه

روش های رنگ آمیزی متعددی در بسیاری از مقالات از زمان اولین کار دو محقق Ornstein و Davis پایه گذاران روش الکتروفورز منطقه ای با قدرت تفکیک منتشر شده است،(۱،۲). آن ها را می توان تقریباً به شرح زیر تقسیم کرد: ۱)رنگ های آلی ۲)رنگ های نقره ای ۳)رنگ های منفی ۴)رنگ های فلورسنت. در آخرین طبقه بندی، رنگی که شاید به صورت روزانه مورد استفاده قرار می گیرد مربوط به خانواده SYPRO می شود که با کمپلکس SDS-پروتئین ارتباط برقرار می کند و حساسیتش در حدود ۱-۴ ng/mm می باشد.(۳،۴)

یکی دیگر از روش های ظاهرسازی پروتئین ها، رنگ آمیزی های منفی یا معکوس هستند که اساس آن ها تشکیل نمک های فلزی نامحلول می باشد و باندهای پروتئین رنگ نشده زمانی که در مقابل یک زمینه تاریک قرار بگیرند مشاهده می شوند،(۵). آن ها به سرعت در عرض ۱۵ دقیقه انجام می شوند و اجازه بازیابی آسان پروتئین از ماتریس ژل را می دهند، چرا که نیاز به مرحله تثبیت ندارند. بعضی از رنگ آمیزی های منفی با محدودیت های تشخیصی که معمولاً استفاده می شوند، عبارتند از: کلرید مس(۵ نانوگرم/میلی متر)،(۶)، کلرید روی(۱۰-۱۲ نانوگرم/میلی متر)،(۷)، استات پتاسیم(۰/۱۲-۱/۵ میلی گرم)،(۸). بسیاری از رنگ آمیزی های منفی نیاز به حضور مواد شوینده در ژل برای ظاهرسازی پروتئین دارند.

محبوبیت به خاطر سادگی روش، حساسیت بالا و سهولت استفاده است. رنگ آمیزی نقره اولین بار در سال ۱۹۷۹ توسط Merril و همکاران برای افزایش حساسیت تشخیص پروتئین بیش از رنگ آمیزی کوماسی آبی معرفی شد،(۹،۱۰). تمام رنگ آمیزی های نقره پروتکل در کاهش یونی فلز نقره بر روی سطح پروتئین بستگی دارد. در حالی که نمی توان انکار کرد که رنگ آمیزی های نقره از حساس ترین رنگ آمیزی هایی هستند که تا کنون گزارش شده است،(۱۳-۱۱)، اما اکثر محققان برای مطالعات کمی، مقایسه ای پروتئوم ها رنگ های کلاسیک آلی از خانواده کوماسی را ترجیح می دهند. اگر چه حساسیت کمتری دارند اما تکرارپذیری آن ها به دلیل عدم وابستگی به بسیاری از پارامترها از جمله دما، کیفیت حلال و زمان ظاهرسازی بسیار بیشتر است. علاوه بر این، تعداد زیادی از رنگ آمیزی های نقره اجازه پردازش بیشتر برروی پروتئین ها را نمی دهد، زیرا آلدهیدها به صورت برگشت ناپذیر با پلی پپتیدها واکنش می دهند.(۱۴)

رنگ آمیزی کوماسی برای اولین بار در سال ۱۹۶۳ توسط Fazekas de St. Groth گزارش شد،(۱۵)، و به خاطر حساسیت معقول و سهولت استفاده مورد محبوبیت قرار گرفت. حساسیت نسبتاً بالا این رنگ آمیزی ظاهرا به خاطر برهم کنش رنگ-رنگ در میان رنگ های کوماسی است که به صورت پیوند یونی و برهم کنش های هیدروفوبی با پروتئین ها می باشد. تعداد اسیدهای آمینه بازی هم چون لایزین، آرژنین و هیستیدین به نظر می رسد با شدت رنگ کوماسی ارتباط مستقیم دارد،(۱۶،۱۷). یک جهش بزرگ در رنگ آمیزی کوماسی با کار Neuhoff و همکاران ایجاد شد و این به خاطر ایجاد یک حالت میسلی در اثر حضور سولفوسیالیک اسید و فسفریک در رنگ بود که حساسیت رنگ آمیزی تا حدود ۳۰ ng افزایش یافت.(۱۸)

در تلاش برای بهبود پروتکل های رنگ آمیزی پروتئین ها روش دیگری که در واقع تغییر روش Neuhoff بود توسط Candiano و همکاران در سال ۲۰۰۴ معرفی شد که دارای حساسیت بالا در حدود ۱ نانوگرم پروتئین/باند می باشد و آن را «نقره آبی» نامیدند،(۱۹). در این تحقیق سه روش رنگ آمیزی کوماسی ساده، کلوئیدال کوماسی بلو و نقره آبی برای ظاهر سازی لکه های پروتئینی مغز موش ماده که توسط الکتروفورز دو بعدی جدا سازی شده اند مورد استفاده و مقایسه قرار گرفتند تا حساس ترین و مناسب ترین رنگ آمیزی برای شناسایی پروتئین های مغز موش مورد شناسایی قرار گیرد و بتوان از آن در دیگر تحقیقات پروتئومیکسی مغز هم چون تهیه پروفایل پروتئینی مغز در بیماری های مغزی مثل آلزایمر استفاده کرد.

مواد و روش ها

آماده سازی نمونه: پس از بیهوش و خارج کردن مغز موش، مغز با استفاده از هموژنایزر در کوکتل پروتئاز اینهیبیتور هموژنایز می شود، در نیتروژن مایع فریز می شود و به مدت ۲۴ ساعت برای پودر کردن نمونه در فریزدرایر قرار داده می شود. به نمونه فریزدرای شده، لایزیز بافر اضافه می شود و یک ساعت در دمای محیط می ماند. لایزیز بافر شامل، 2M Thiourea، 40mM Tris و 0.2% Biolyte می باشد. نمونه سانتریفیوژ شده و در نهایت تعیین غلظت پروتئین توسط روش Bradford انجام خواهد شد،(۲۰،۲۱). لازم به ذکر است جهت تکرار کار و

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

بالا رفتن اطمینان تعیین غلظت پروتئین توسط روش Bradford دو بار انجام شد.

الکتروفورز دوبعدی: پروتئین بر روی ۳ نوار IPG با pH برابر ۳-۱۰ و غیر خطی اضافه می شود، و IEF در دستگاه Protean IEF cell انجام می شود. مقدار پروتئین لود شده برای ۳ نوار IPG یکسان می باشد. نوارهای IPG در بافر تعادل(Equilibration Buffer) قرار می گیرند. تا متعادل سازی صورت گیرد. پس از اتمام مرحله متعادل سازی، SDS-PAGE به عنوان بعد دوم از الکتروفورز دو بعدی انجام می شود. ابتدا سه ژل به دست آمده از الکتروفورز دو بعدی پروتئین های مغز موش که هر کدام به یک میزان دارای پروتئین هستند در محلول تثبیت(Fixation solution) حاوی ۵۰ درصد اتانول، ۱۰ درصد اسید استیک و آب قرار می گیرند. پس از گذشت یک ساعت، ژل ها از محلول تثبیت خارج شده و دو با آب آنالار شستشو داده می شوند. ژل ها(هر کدام داخل یک رنگ طبق پروتکول مربوطه) با کوماسی بلو R250 (BioRad BioSafe Coomassie)، کلوئیدال کوماسی بلو شامل ۲ درصد اسید فسفریک، ۱۰ درصد آمونیوم سولفات، ۰/۱ درصد کوماسی بلو G-250، ۲۰ درصد متانول و Blue silver شامل ۱۰ درصد اسید فسفریک، ۱۰ درصد آمونیوم سولفات، ۰/۱۲ درصد کوماسی بلو G-250، ۲۰ درصد متانول به صورت Over night قرار داده می شوند. سپس هر کدام(طبق پروتکول مربوطه) رنگ زدایی می شوند. محلول رنگ زدایی برای رنگ آمیزی کوماسی R250 شامل ۵۰ درصد متانول، ۱۰ درصد استیک اسید در آب است تصاویر رنگ آمیزی ژل با اسکنر GS-800 اسکن می شوند،(۱۸،۱۹)، و در نهایت تصاویر حاصله با نرم افزار Image Master برای شمارش تعداد لکه پروتئینی مورد آنالیز قرار می گیرند.

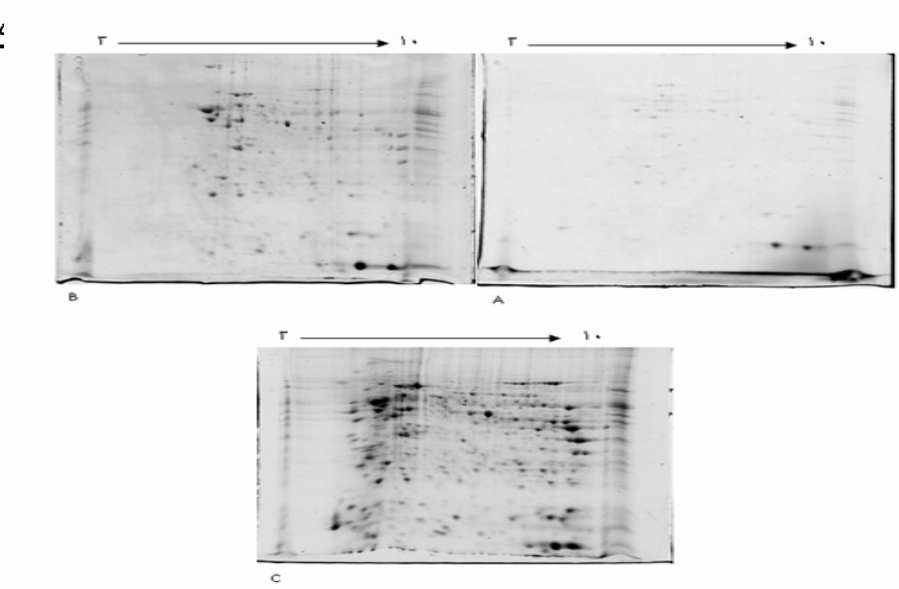
یافته های پژوهش

غلظت نهایی نمونه برای انجام الکتروفورز دوبعدی رابطه مستقیمی با نوع رنگ آمیزی دارد. برای به دست آوردن روش رنگ آمیزی مناسب با حساسیت بالا و رنگ پشت زمینه(background) کمتر از ۳ روش رنگ آمیزی کوماسی ساده(Coomassie R250)، کلوئیدال کوماسی بلو و Blue Silver (نوعی رنگ آمیزی بهبود یافته کلوئیدال کوماسی بلو) استفاده شد. برای هر سه رنگ آمیزی مقدار ۳۰۰ µg/µl پروتئین استفاده شد. همان طور که در شکل شماره ۱ ملاحظه می شود به ترتیب از ژل A تا C، رنگ آمیزی آمیزی کوماسی ساده(Coomassie R250)، کلوئیدال کوماسی بلو و Blue Silver، تعداد لکه های پروتئینی به طرز چشمگیری افزایش یافته است و حساسیت رنگ آمیزی Blue Silver بسیار بیشتر است. ژل ها با نرم افزار Image Master مورد آنالیز قرار گرفتند و نتایج نشان داد(جدول شماره ۱) که به ترتیب تعداد ۸۷،۲۹۱،۵۱۰ لکه پروتئینی در ژل 2DE رنگ آمیزی شده با کوماسی بلو، کلوئیدال کوماسی بلو و Blue Silver مورد شناسایی قرار گرفتند.

جدول شماره ۱. تعداد لکه های پروتئینی شناسایی شده از نمونه مغز موش در هر ژل 2DE با توجه به نوع رنگ آمیزی

رنگ آمیزی	تعداد لکه پروتئینی
کوماسی ساده	۸۷
کلوئیدال کوماسی بلو	۲۹۱
Blue Silver	۵۱۰

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]



شکل شماره ۱. مقایسه سه روش رنگ آمیزی کوماسی ساده(ژل A) ، کلوئیدال کوماسی بلو(ژل B) و نقره آبی(ژل C) در ژل های ۷cm (pH=3-10) از پروتئین های مغز موش که با روش الکتروفورز دو بعدی جداسازی شده اند.

بحث و نتیجه گیری

روش انتخابی برای رنگ آمیزی ژل پس از انجام الکتروفورز دو بعدی بستگی به طبیعت نمونه اولیه و هدف آزمایش دارد. برای شناسایی پروتئین ها روی ژل دو بعدی که سازگار با طیف سنجی جرمی باشد، یک روش رنگ آمیزی قابل برگشت مورد نیاز است. از رنگ آمیزی ژل پلی اکریل آمید با آبی کوماسی نتایج مطلوبی به دست خواهد آمد که با روش های طیف سنجی جرمی سازگار است. استفاده از کوماسی بلو به صورت سه روش دیده می شود: رنگ آمیزی کوماسی ساده، کلوئیدال کوماسی بلو و Blue Silver که هر کدام مزیت و معایبی دارند. هر سه این روش ها ارزان، دینامیک و سازگار با طیف سنجی جرمی هستند اما حساسیت های مختلفی دارند.

آبی کوماسی اولین بار برای رنگ آمیزی اسیدی پشم تهیه شد. دو گونه مختلف این رنگ وجود دارد که به نام های آبی کوماسی G250 و R250 شناخته می شوند. رنگ آبی کوماسی با اسید آمینه قلیایی از جمله آرژنین، تیروزین، هیستیدین و لیزین ایجاد کمپلکس می کند. رنگ شدید زمینه و متعاقب آن نیاز به مراحل متعدد رنگ زدایی از نکات منفی این روش است. در سال ۱۹۸۸، Neuhoff روش حساسی برای رنگ آمیزی پروتئین ها در ژل های اکریل آمید بر پایه ویژگی کلوئیدی آبی کوماسی G250 ارائه کرد،(۱۸). در طی رنگ آمیزی تعادلی بین اشکال کلوئیدی و فرم پراکنده مولکول رنگ وجود دارد. فرم پراکنده وارد ماتریکس ژل می شود و پروتئین ها را رنگ می کند حال آن که فرم کلوئیدی بیرون نگه داشته می شود و به این ترتیب از رنگ زدایی پرهیز می شود،(۲۲). پروتکل های مختلفی برای رنگ آمیزی با کوماسی وجود دارد. اخیراً یک روش رنگ آمیزی جدید Blue Silver بر گرفته از رنگ آمیزی کولوئیدال کوماسی گزارش شده است که ادعا می کند حساسیت آن در اندازه رنگ آمیزی نقره است. در این روش غلظت مواد به کار رفته در رنگ آمیزی کلوئیدال کوماسی را تغییر داده اند تا حساسیت روش بالا رود. دو تغییر عمده در این روش ایجاد شده است: تغییر درصد رنگ از ۰/۱ درصد به ۰/۱۲ درصد و اسید فسفریک از ۲ درصد به ۰/۱۰ درصد جالب توجه است که با افزایش غلظت اسید فسفریک، جذب رنگ در نواحی پروتئینی بیشتر و سریع تر می شود و لکه های پروتئینی آبی تر می شوند.(۲۵-۲۲)

به علت غلیظ بودن محتوای سلولی گروه های مورد آزمایش از نظر پروتئینی، حجم بالای نمونه و سازگاری بالای رنگ کوماسی بلو با تکنیک طیف سنجی جرمی، برای ادامه آزمایشات رنگ آمیزی ژل ها با استفاده از رنگ Blue Silver انجام شد. حساسیت این روش در حدود ۱-۱۰ng تقریباً نزدیک به رنگ آمیزی نیترات نقره می باشد،(۲۳)، و در مقایسه با دو روش دیگر تعداد لکه های پروتئین بیشتری را با رنگ پشت زمینه کمتر ظاهر کرده است. همان طور که در شکل شماره ۱ ملاحظه می گردد رنگ آمیزی Blue Silver در مقایسه با دو روش دیگر بسیار حساس تر می باشد و تعداد لکه های پروتئینی بیشتری را ظاهر کرده است. و از آن جا که هدف از انجام تحقیق حاضر انتخاب روشی حساس و ارزان برای رنگ آمیزی ژل دوبعدی به دست آمده از پروتئین های مغز

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

موش، انتخاب روش رنگ آمیزی بدون نیاز به رنگ بری و انتخاب روشی سازگار با طیف سنجی جرمی می باشد، رنگ آمیزی Blue Silver به عنوان روش برگزیده برای رنگ آمیزی ژل های 2DE حاصل از پروتئین های مغز موش انتخاب می شود تا در تحقیقات آتی و مطالعات بیشتر پروتئین های مغز،(۲۶)، مورد استفاده قرار گیرد.

References

1. Ornstein L. Disc electrophoresis: Background and theory. Ann NY Acad Sci 1964; 121: 321-49.

2. Davis BJ. Disc electrophoresis: Method and application to human serum Proteins. Ann NY Acad Sci 1964;121: 404-27.

3. Steinberg TH. SYPRO orange and SYPRO red protein gel stains: one-step fluorescent staining of denaturing gels for detection of nanogram levels of protein. Anal Biochem 1996;239: 223-37.

4. Steinberg TH, Haugland RP, Singer VL. Applications of SYPRO orange and SYPRO red protein gel stains. Anal Biochem 1996;239: 238-45.

5. Candiano G. Negative staining of proteins in polyacrylamide gels with methyl trichloroacetate. Anal Biochem 1996;243: 245-8.

6. Lee C, Levin A, Branton D. Copper staining: a five-minute protein stain for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. Anal Biochem 1987;166:308-12.

7. Dzandu JK, Johnson JF, Wise GE. Sodium dodecyl sulfate-gel electrophoresis: staining of polypeptides using heavy metal salts. Anal Biochem 1988;174: 157-67.

8. Nelles LP, Bamburg JR. Rapid visualization of protein--dodecyl sulfate complexes in polyacrylamide gels. Anal Biochem 1976;73:522-31.

9. Merril CR, Dunau ML, Goldman D. A rapid sensitive silver stain for polypeptides in polyacrylamide gels. Anal Biochem 1981;110: 201-7.

10. Merril CR, Switzer RC, Van Keuren ML. Trace polypeptides in cellular extracts and human body fluids detected by two-dimensional electrophoresis and a highly sensitive silver stain. Proc Natl Acad Sci USA 1979;76: 4335-9.

11. Merril CR, Harrington MG. "Ultrasensitive" silver stains: their use exemplified in the study of normal human cerebrospinal fluid proteins separated by two-dimensional electrophoresis. Clin Chem 1984;30:1938-42.

12. Goldman D, CR Merril, Ebert MH. Two-dimensional gel electrophoresis of cerebrospinal fluid proteins. Clin Chem 1980; 26:1317-22.

13. Switzer RC, CR Merril, Shifrin S. A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. Anal Biochem 1979;98:231-7.

14. Sinha P. A new silver staining apparatus and procedure for matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis of proteins after two-dimensional electrophoresis. Proteomics 2001;1: 835-40.

15. Fazekas GS, Webster RG, Datyner A. Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. Biochim Biophys Acta 1963;71: 377-91.

16. Wilson CM. Studies and critique of Amido Black 10B, Coomassie Blue R, and Fast Green FCF as stains for proteins after polyacrylamide gel electrophoresis. Anal Biochem 1979;96:263-78.

17. Tal M, Silberstein A, Nusser E. Why does Coomassie Brilliant Blue R interact differently with different proteins? A partial answer. J Biol Chem 1985;260:9976-80.

18. Neuhoff V. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. Electrophoresis 1988;9:255-62.

19. Candiano G. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. Electrophoresis 2004;25:1327-33.

20. Tan AA. Optimal protein extraction methods from diverse sample types for protein profiling by using Two-Dimensional Electrophoresis (2DE). Trop Biomed 2010;28: 620-9.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

21. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72: 248-54.

22. Silber ML, BB Davitt. Preparative binding of Coomassie brilliant blue to bovine serum. Prep Biochem Biotechnol 2000; 30:209-29.

23. Candiano G. Two-dimensional maps in soft immobilized pH gradient gels: a new approach to the proteome of the Third Millennium. Electrophoresis 2002;23: 292-7.

24. Congdon RW, Muth AG. Splittgerber The binding interaction of Coomassie blue with proteins. Anal Biochem 1993; 213:407-13.

25. Skoog DA, Leary JJ. Principles of instrumental analysis. 4th ed. Saunders: New York; 1992.P. 150.

26. Foldi I. Characterisation of the variation of mouse brain proteome by two-dimensional electrophoresis. J Proteomics 1999; 74: 894-901 .

Comparison of Three Staining Methods, Coomassie Blue R250, Colloidal Coomassie Blue and Blue Silver, for Detecting Mouse Brain Proteins Separated by Two-Dimensional Electrophoresis

Meyfour A[1], Rezaie Tavirani M[1]*

(Recived: October 23, 2013 Accepted: February 26, 2014)

Abstract

Introduction: In most cases, after two-dimensional gel electrophoresis procedure about hundreds proteins are separated from each other. Because these proteins are colorless, so they need to be stained and appeared. After staining, each protein appears as a spot on the gel.

Materials & Methods: In this study, three staining methods including simple coomassie blue, colloidal coomassie blue and blue silver were used to stain mouse brain proteins and separate them using two dimensional electrophoresis techniques. These staining methods were compared to identify the most appropriate and sensitive ones.

Findings: Before staining, the gels were fixed in fixation solution. Three gels were appeared for the three staining methods. After gel staining (according to the related protocol), they were destained and scanned by scanner.

Discussion & Conclusion: Results showed blue silver staining were the most appropriate method for staining mouse brain proteins in two-dimensional gels.

Keywords: Coomassie blue R250, colloidal coomassie blue, blue silver, protein

1.*Proteomics Research Center, Faculty of Paramedical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
** (Corresponding author)*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]