

酪蛋白在蛋白质转移电泳及 ELISA 中的应用

单立新 杜国光

(北京医科大学生化教研室, 北京)

蛋白质转移电泳 (Western Blot) 结合免疫酶染色法是八十年代初发展起来的一种高特异高灵敏的检测体系^[1]。酶联免疫吸附 (ELISA) 则已广泛用于许多抗原或抗体的测定。这两种检测体系均在固相膜上进行。为了降低膜的非特异性吸附, 降低本底, 提高灵敏度, 通常用 5% 浓度的牛血清白蛋白 (BSA) 进行封闭, 以减少非特异性吸附所致的显色, 其缺点是所用 BSA 的浓度高, 对特异性吸附的物质有一定的顶替作用; 同时 BSA 的用量大价格贵。我们在实验工作中比较了几种廉价蛋白质后, 发现 1% 酪蛋白 (Casein) Merck 产品有满意可靠的封闭效果。

我们实验所用的抗原为人绒毛膜促性腺激素 (HCG) NIH 标准品 CR₁₂₁₀。相应抗体为小鼠抗 HCG 单克隆抗体 (抗 HCG-McAb), 由北医大生理教研室李伟雄副教授提供^[2]。以免抗鼠 IgG 的 F(ab)₂ 结合辣根过氧化物酶作为免疫酶标探针 (本实验室制备^[3])。

将 HCG 经 PAGE 电泳后, 通过 Western Blot 转移到硝酸纤维素膜上 (浙江黄岩化工厂产品)。经 1% 酪蛋白 PBS-Tween 浸泡 0.5 小时, 转入抗 HCG-McAb 液反应 3 小时后, 充分洗涤, 加入用 0.5% 酪蛋白 PBS-Tween 配制的免疫酶标探针试剂, 4℃ 反应过夜, 洗净后以联苯茴香胺显色。结果 (见图) 表明 HCG 样品可显出特异性的蛋白条带; 而作为对照的鼠血清样品只显出 γ 球蛋白条带 (因它可与兔抗鼠 IgG 结合), 胃蛋白酶样品也不显色。若不经酪蛋白封闭单纯用 PBS-Tween 者, 本底高, 且有非特异性显色。

在 ELISA 法中, 我们用 HCG 为抗原包被于酶标软板, 经 1% 酪蛋白-PBS 封闭后, 以抗 HCG-McAb 为第一抗体, 经充分洗涤后加免疫

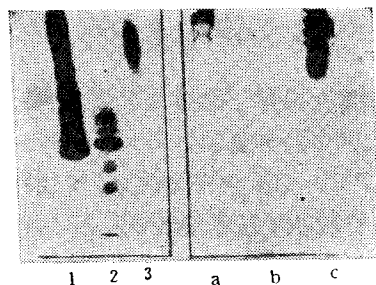


图 1、2、3 为 PAGE 电泳后考马斯亮蓝染色的结果
(1 为小鼠血清; 2 为胃蛋白酶; 3 为 HCG)

a、b、c 为 Western Blot 转移后在硝酸纤维素膜上免疫酶染色的结果: (1) 为小鼠血清 γ 球蛋白特异显色条带; (2) 为胃蛋白酶无显色; (3) 为 HCG 的特异显色条带, 因免疫酶染色灵敏度高, (3) 中 HCG 显出宽带; 由于 HCG 是糖蛋白, 糖的不均一使之出现若干带, 与文献结果相符。

酶标探针, 以邻苯二胺显色, 结果发现本底读数低, 1% 酪蛋白 PBS 封闭液具有与 5% BSA 同样满意的封闭效果。

实验表明, 以低浓度的酪蛋白代替高浓度 BSA 作封闭剂是行之有效的办法。联系 Johnson 等 (1984)^[4] 介绍脱脂奶粉用于 DNA 分子杂交的封闭试剂, 看来脱脂奶粉中的主要蛋白质——酪蛋白同样可用来作蛋白质检测的封闭试剂。其封闭机理推测主要是占位效应, 酪蛋白被吸附在固相膜的空白部分, 从而降低了膜对第一抗体和免疫酶标探针的非特异性吸附。

参 考 文 献

- [1] Batteiger B. et al.: J. Immunol. Methods. 1982, 55, 297.
- [2] 李伟雄等: “抗 HCG 单克隆抗体的制备与鉴定”《生殖与避孕》1986, 6(3)8。
- [3] Hudson L. et al.: In “Practical Immunology” 2nd ed. Blackwell Scientific Publications, London, 1981.
- [4] Johnson D. A. et al.: Gene Anal. Techn., 1984, 1, 3.

[本文于 1987 年 7 月 4 日收到]