

Biotin-Avidin 免疫转移技术

金 灵 苏 新

(军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京)

提 要

Biotin-Avidin-Immunoblot 是将生物素和亲和素引入酶标免疫检测中, 用于经电泳分离并转移到硝酸纤维素膜上的蛋白质的分析。该方法特异性好, 具有很好的重复性, 检测灵敏度可达 1.5×10^{-11} mg, 与放射免疫检测方法相似。

免疫转移技术 (Immunoblot)^[1,2] 是将高分辨率的凝胶电泳和高敏感度的免疫检测结合起来, 用于鉴定微量蛋白质。目前免疫转移技术主要采用放射免疫法和酶标免疫法检测, 但二者皆不够理想。近年来生物素 (Biotin)-亲和素 (Avidin) 作为生物放大系统引入免疫分析^[3], 广泛用于免疫组化、可溶性抗原抗体的检测和某些物质的分离及纯化^[4,5]。本实验室为分析福氏痢疾菌膜成分, 建立了免疫转移技术, 在国内首次尝试将生物素-亲和素系统引入免疫转移技术中, 并称之为 “BA-Immunoblot”。

材 料 和 方 法

抗原 福氏痢疾菌经超声破碎后的膜成分^[6]。

抗血清 以福氏痢疾菌2a死菌经静脉免疫家兔而获得。该血清凝集效价达 1:1280。

第二抗体 生物素标记羊抗兔 IgG、亲和素标记辣根过氧化物酶均为本室制备^[7,8]。胶体金标记猪抗兔 IgG 在本院陈德惠教授处购买。¹²⁵I 标记羊抗兔 IgG 以 Iodogene^[9]法标记。Iodogene 为本院六所合成。¹²⁵I 为原子能科学院产品。

转移电泳 据 Towbin^[11] 方法改进。SDS-PAGE 的凝胶浓度为 12.6%。硝酸纤维素膜 (NC) 由北京化工学校产。转移电泳槽由北京

六一仪器厂制。转移电极液为 0.025 mol/L Tris-0.192 mol/L 甘氨酸-10% 甲醇, 转移 4 小时, 电流为 0.9 A。

点印渍 将抗原与等体积的样品处理液混合, 100℃ 5 min。稀释至蛋白量为 2 mg/ml, 然后对倍稀释 20 次, 用微量注射器取样 0.5 μ l 依次点在 NC 上, 待 NC 自然干燥。第 1 点的抗原量为 1 μ g。

免疫检测 经转移电泳或点印渍附着在 NC 上的抗原采用如下三种方法检测。

BA-酶免疫法 为减少非特异着色, 提高检测敏感度, 我们曾试用了不同系列的缓冲液 (见表 1)、不同稀释度的抗原、抗体和酶。其基本过程: (1) 封闭 NC 上未结合蛋白的部位,

表 1 免疫检测中所用的缓冲液系列

系列	Tris-HCl (pH7.4) (mol/L)	NaCl (mol/L)	Tween20 (%)	牛血清白蛋白 (%)
A A1	0.05	0.5	—	3
A2	0.05	0.5	0.5	0.5
A3	0.01	0.5	0.5	—
A4	0.01	0.5	0.5	0.5
A5	0.05	0.5	—	—
B B1	0.05	0.15	—	3
B2	0.05	0.15	0.05	0.5
B3	0.01	0.15	0.05	—
B4	0.01	0.15	0.05	0.5
B5	0.05	0.15	—	—

浸泡于 A1 液中, 37℃ 1h。(2) 抗血清, 以 A2 液稀释, 4℃ 过夜, 37℃ 1h。(3) 漂洗, A3 液 4 × 10min, A4 液中浸泡 15min。(4) 生物素标记第二抗体, A2 液稀释, 37℃ 2h。(5) 漂洗, 同 (3)。(6) 亲和素-过氧化物酶, A₂ 液稀释, 37℃ 1h。(7) 漂洗, A₃ 液 4 × 10min。(8) 二氨基联苯胺 (DAB) 60mg 溶于 A₅ 液 100ml 中, 过滤, 加 H₂O₂ 150μl, 显色。(9) 1mol/L H₂SO₄ 终止反应, 或直接大量蒸馏水漂洗。

放射免疫法 (1)、(2)、(3)步同 BA-酶免疫法。(4) ¹²⁵I 标记抗体, A₂ 液稀释至 5 × 10⁵ cpm/ml, 室温, 2h。(5) 漂洗, A₃ 液 4 × 30 min。(6) 医用 X 光片曝光 3—5 天。

免疫金法^[11] (1)、(2)、(3)步同 BA-酶免疫法。(4) 胶体金标记抗体, A₂ 液稀释至 1:10—1:20 (A₅₂₅ = 0.04—0.06), 37℃ 2h。(5) 漂洗, A₃ 液 4 × 10min, 蒸馏水 2 × 5min。(6) 硝酸银显影, 1mol/L 柠檬酸缓冲液 (pH 3.5—4.0) 10ml, 对苯二酚 (1.7g) 30ml, 加蒸馏水至 100ml, 充分混匀。在暗室中加 20% 硝酸银溶液 2ml, 混匀, 显影 5—8min。(7) 大量蒸馏水漂洗。

结果与讨论

检测转移到 NC 上的抗原, 其检测效果不仅与转移到 NC 上的抗原量 (转移效果) 有很大关系, 还与降低染色背景、减少非特异染色密切相关。为此我们分析了 BA-酶免疫法检测过程中的几个影响因素。

(1) **稀释液、冲洗液的浓度** 采用低盐、低 Tween 20 的系列 B 时, 非特异染色较深, 蛋白区带模糊, 且 DAB 可非特异地沉积到 NC 表面。而用高盐、高 Tween 20 的系列 A 时, 非特异染色较浅, 蛋白区带清晰, 且对抗原抗体结合反应没有影响。

(2) **抗血清、生物素标记第二抗体和亲和素标记酶的稀释度及孵育时间** 抗血清根据其抗体滴度而稀释, 一般以 1:100—1:200 为宜, 孵育时间为 4℃ 过夜, 加 37℃ 1h。长时间的 4℃ 孵育有利于在电泳、电转移过程中变性的抗原复性。第二抗体与第一抗体的结合、生物素与亲和素的结合比较快, 分别以 37℃ 2h、37℃ 1h, 即可充分结合。生物素标记抗体和亲和素标记酶的浓度对本底有很大的影响, 如图 1。图中四种浓度配对, 敏感度相似, 方块 (1) 的

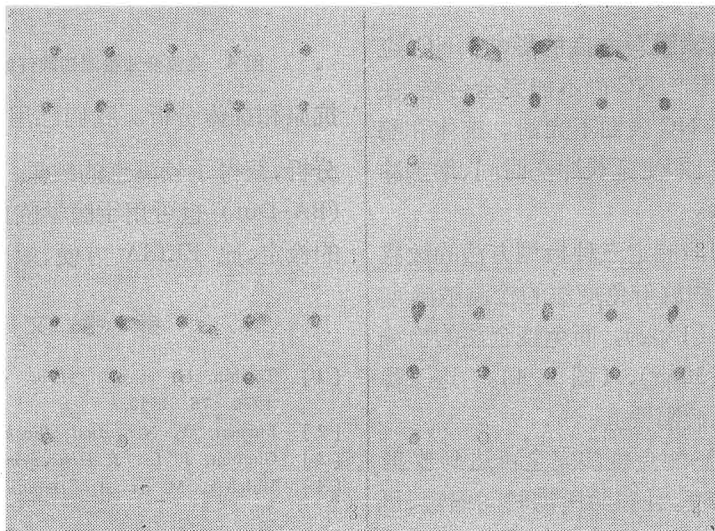


图 1 BA-酶免疫法检测硝酸纤维素膜上抗原

生物素标记第二抗体和亲和素标记酶的稀释度分别是:

(1) 20μg/ml、20μg/ml, (2) 40μg/ml、20μg/ml, (3) 20μg/ml、40μg/ml, (4) 40μg/ml、40μg/ml。

本底清晰、非特异染色少。故在实验中,采用生物素标记抗体 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 、亲和素标记酶 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

(3) 硫酸终止反应 用 $1\text{mol}/\text{L}$ H_2SO_4 终止显色反应并非必需。若能很快拍照,以大量流水冲洗,也可终止反应。若不能很快拍照,或需长期保存结果,宜用 H_2SO_4 终止反应,否则本底会继续加深(图2)。

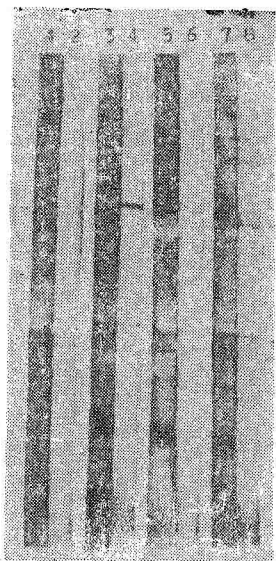


图2 用 BA-Immunoblot 分析福氏痢疾菌的膜蛋白

第1、3、5、7条没有用 H_2SO_4 终止显色反应,
第2、4、6、8条采用 H_2SO_4 终止反应。

(4) 硝酸纤维素膜对本底的影响 NC 应平整光滑均匀,但国产 NC 尚不能完全合格,使用时须注意挑选。NC 表面不光滑,抗体和酶容易非特异地附着,即使延长冲洗时间、增加冲洗强度也不易去除。

本实验用点印渍测定三种检测方法的敏感度,BA-酶免疫法和放射免疫法的检测敏感度相似,均达 2^{-16}mg (15pg),而免疫金法的检测敏感度为 2^{-15}mg (30pg), (图3、4)。这三种检测方法均未出现假阳性。

综上所述,BA-酶免疫法完全可达到放射免疫法的检测敏感度,且实验所需时间缩短,可在一天内完成。采用 BA-Immunoblot 可获得清晰准确的蛋白区带图谱,非特异显色少,背景浅,且具有较好的重复性,可用于微量或复杂的

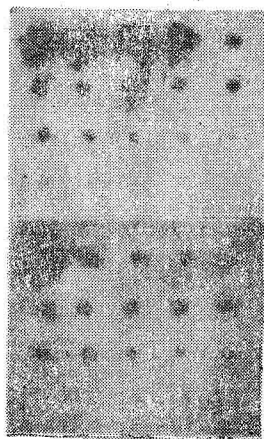


图3 放射免疫法检测硝酸纤维素膜上的抗原

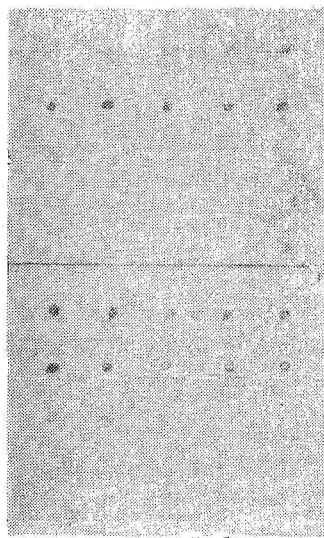


图4 免疫金法检测硝酸纤维素膜上的抗原

抗原和抗体分析。我们已用于痢疾菌膜蛋白的分析,获得了较满意的结果。此外,BA-点印渍(BA-Dot)也可用于医学临床中某些阳性标本的检定,比 ELISA 方便、敏感、价廉。

参考文献

- [1] Towbin, H. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1970, 76, 4350.
- [2] Burnett, W. N.: *Anal. Biochem.*, 1981, 112, 195.
- [3] Gueston, J. L.: *J. Histochem.*, 1979, 27, 1131.
- [4] Wilchek, M. et al.: *Immunology Today*, 1984, 5, 39.
- [5] Lanzillo, J. J. et al.: *Electrophoresis*, 1983, 4, 313.
- [6] 苏新等:《军事医学科学院院刊》1987,11,199.
- [7] Michael, H. et al.: *J. Cell Biol.*, 1977, 73, 783.
- [8] 初连端等:《军事医学科学院院刊》1986,10,50.

糖化酶活性的电化学测定及其影响因素

邱娟娟

刘瑞莲 汪卫华

(上海市劳动卫生职业病研究所)

(上海市电视十一厂)

范培昌

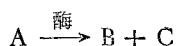
(华东师范大学生物系)

提 要

采用上海电视十一厂生产的 MS-1 型电化学酶活力测定仪,能快速而准确地测出糖化酶活力,又能直观其酶反应动力学。实验表明,本法灵敏度比常规比色法高。本文还试验了各种影响因素,确定了糖化酶活力测定的最适反应条件。

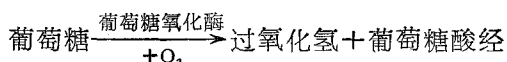
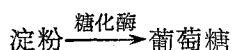
范培昌等人曾试制了一架电化学酶活力测定仪^[1],并已成功地应用于胆碱酯酶类^[1,2],过氧化氢酶与过氧化物酶类的活力测定^[3]。现在该仪器已由上海电视十一厂生产,并取名为 MS-1 型酶活力测定仪。我们把这种仪器用于对无锡酶制剂厂酶法生产葡萄糖的糖化酶活力测定,获得了比原用比色法更佳的测定效果。

按文献所述^[1-4],凡属:

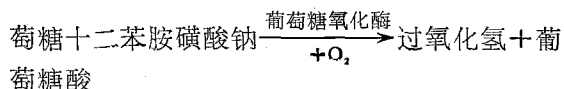


这类酶反应,只要产物 B 或 C 具有小于(如胆碱酯酶类^[1,2])或大于(如过氧化氢酶和过氧化物酶类^[3])底物 A 的电活性,就能用本法测定。但是,如果底物没有电活性,本法是否还起作用呢?本文对这一问题给出了肯定的答案。

无锡酶制剂厂在酶法制取葡萄糖时,系用糖化酶催化淀粉水解,糖化酶活力测定则是根据所生成的葡萄糖量,用次亚碘酸盐化学比色法定量,我们是根据 Guibault 法进行测定,其反应式如下:



用 MS-1 型酶活力测定仪测定,证明上述两酶底物均无电活性,本体系不能起动,似乎难以用本仪器测定。据此,我们根据 Guibault 法^[4,5],在体系中加入一种不影响本反应但具有电活性的物质(二苯胺磺酸钠),促使体系起动。即:葡萄糖十二苯胺磺酸钠



($E_0 - 0.8V$)

($E_0 - 1.3V$)

实验结果表明,这种想法是正确的,这就扩大了本仪器的应用范围。

材 料 与 方 法

葡萄糖氧化酶购自 Sigma,比活力为 35.3 单位/毫克。其他试剂均用分析级,且用 8 兆无离子水配制。

1. 标准曲线的绘制

[9] Porker, P. J.: *Biochem. Biophys. Commun.*, 1978, 80, 849.

[11] Beisiegel, U.: *Electrophoresis*, 1986, 7, 1.

[10] Brada, D. et al.: *Anal. Biochem.*, 1984, 142, 79.

[本文于 1988 年 1 月 4 日收到]