

经验交流

用半干式印迹法的免疫酶染色检测膜糖蛋白

王建华 朱正美

(大连医学院生物化学教研室, 大连 116023)

关键词 蛋白质免疫印迹, 糖蛋白, 免疫酶技术, 凝集素

蛋白质印迹法 (Western blot) 是近十年来发展起来的一种生化新技术^[1,2]。糖蛋白是细胞膜的重要组成部分, 在细胞的相互识别、分化和组织发生等过程中起着重要的作用^[3]。由于凝集素具有对糖结构专一识别和结合的能力, 因此, 它在组化、细胞化学、鉴定糖链结构、分离纯化含糖高分子等方面得到了广泛的应用^[4], 为快速有效地检测膜糖蛋白, 我们首次综合利用 PAGE, Blotting, ABC (卵白素-生物素标记的辣根过氧化物酶复合物), Lectin (凝集素) 探针几种方法的优点, 结合现有的实验室条件, 摸索出一种新的检出方法——半干式免疫印迹法的 ABC 免疫酶染色, 现将方法介绍如下。

1 材料与方法

1.1 仪器

LKB-2117-Ⅰ型多用电泳仪 (瑞典 LKB-Pharmacia 公司生产)、V16-垂直电泳槽 (上海市科学器材公司)、SHZ-88台式水浴恒温振荡器 (江苏太仓实验设备厂)。

1.2 试剂

1.2.1 印迹缓冲液: 25mmol/L Tris, 192mmol/L 甘氨酸 (Gly), 20% (V/V) 甲醇, pH 8.3。

1.2.2 Tris 缓冲液 (TBS): 20mmol/L Tris, 0.5mmol/L NaCl, 用 1mol/L HCl 调 pH 至 7.5。

1.2.3 漂洗溶液 (TTBS): 20mmol/L Tris, 0.5mmol/L NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.5。

1.2.4 封闭溶液: 3g 牛血清白蛋白 (BSA) 溶于 100ml TBS。

1.2.5 抗体缓冲液: 3g BSA 溶于 100ml TTBS。

1.2.6 5 μ g/ml 生物素标记的凝集素溶液 [伴刀豆球蛋白 A (Con A), 麦胚凝集素 (WGA) 均为美国 Vector 公司生产]; 5mg/ml 生物素标记的凝集素 20 μ l, 加抗体缓冲液 20ml。

1.2.7 DAB (3, 3-二氨基联苯胺) 显色液: 临用时配, 20mg DAB 溶于 40ml TBS 后, 加 30% H₂O₂ 20 μ l。

1.3 电泳

取妊娠 6 周内子宫蜕膜膜蛋白提取液, 经 Hartree 氏法^[5]测定蛋白浓度, 进行 SDS-PAGE 电泳分析^[6], 每孔加样量为 20—60 μ g 蛋白质, 凝胶厚度 1.5mm, 分离胶及浓缩胶浓度分别为 10% 和 4%。

1.4 半干式电印迹

将电泳后的聚丙烯酰胺凝胶放入印迹缓冲液中平衡 30—60min, 带手套用清洁的剪刀和镊子, 将滤纸、硝酸纤维素膜 (NC) 及玻璃纸剪成与胶同样大小, 按方法^[7]操作, 注意各层之间勿留气泡, 室温下印迹 3h。

1.5 ABC 免疫酶染色^[8]

染色整个过程均在自封小塑料袋中进行以减少试剂的用量, 便于回收。塑料膜预先用 3% BSA 封闭溶液浸泡 0.5—1h。

1.5.1 封闭: 将印迹后的 NC 用 TTBS 洗 10min 后, 放入 3% 牛血清白蛋白 (BSA) 封闭溶液中, 室温振荡过夜。

1.5.2 结合: 将封闭后的 NC 转入不同的生物素标记的凝集素 (ConA, WGA) 溶液中, 37℃ 轻轻振荡 1h。

1.5.3 洗膜: NC 用 TTBS 漂洗 30min, 室温下轻轻振荡, 其间每 10min 换 TTBS 一次。

1.5.4 ABC 法染色: 将洗好的 NC 放入 ABC 溶液中 (反应前 1h 用 TTBS 溶液配制), 37℃ 轻轻振荡 1h。洗膜, 重复步骤 1.5.3。DAB 显色: 将 NC 转入 DAB 显色液中 37℃ 30min, 显色时避光, 显色后用蒸馏水洗以终止反应。用水洗过的 NC 可夹在两张普通滤纸间使之干燥, 避光保存。显色液的量可根据 NC 膜大小增减。生

物素标记的凝集素溶液或 ABC 溶液用过后可回收保存于4℃冰箱,可反复使用数次,每次用时可适当添加新的生物素标记的凝集素或 ABC 溶液。

2 结果和讨论

2.1 转移印迹后的凝胶用考马斯亮蓝染色,无明显条带,用灵敏度极高的银染法染色印迹前的凝胶,绝大部分条带均已转移在 NC 膜上,印迹效果满意 (图 1a)。

2.2 印迹后 NC 膜氨基黑染色检测上样量与印迹效率的关系,结果显示上样量 (蛋白总量) 20—50 μ g 印迹效果最好 (图 1b)。

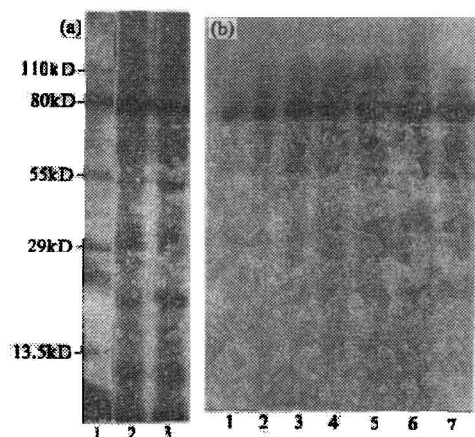


图1 人子宫蜕膜蛋白电泳上样量与印迹效果

(a) 印迹前银染谱 1: 标准分子量蛋白; 2, 3为孕5—6周子宫蜕膜 (蛋白质加样量分别为30 μ g, 40 μ g)

(b) 印迹后 NC 膜氨基黑染色谱 (均为孕5—6周子宫蜕膜样品) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7蛋白质总上样量分别为5 μ g, 10 μ g, 20 μ g, 30 μ g, 40 μ g, 50 μ g, 60 μ g

2.3 含糖蛋白样品通过一次电泳、印迹可得到多种凝集素结合谱。应用多个样品,经 SDS-PAGE、印迹后所得到的电泳谱,与生物素标记的 ConA 或 WGA 反应,显示出各自特异的糖蛋白谱带 (图2)。由于凝集素糖专一性不同,可对糖蛋白的不同糖链结构作出初步鉴别。实验中同一块凝胶板可切成多个胶条进行多种凝集素染色,这样,一次实验可同时鉴定分析多种糖蛋白或进行各样品间的相互比较。

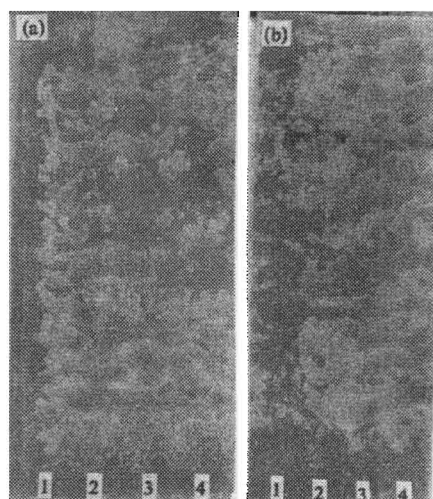


图2 人子宫内膜蛋白经 SDS-PAGE, 印迹后凝集素结合谱

(a) 人子宫内膜蛋白电泳印迹后 ConA 结合谱

1: 孕5—6周子宫蜕膜; 2: 孕5周内子宫蜕膜; 3: 分泌期子宫内膜; 4: 增殖期子宫内膜

(b) 人子宫内膜蛋白电泳印迹后 WGA 结合谱

1: 增殖期子宫内膜; 2: 分泌期子宫内膜;

3: 孕5周内子宫蜕膜; 4: 孕5—6周子宫蜕膜

此外,本法还具有灵敏度高 (所用生物素标记的凝集素的浓度仅5 μ g/ml,就可明确检测出膜糖蛋白), 用费省 (整个染色过程在自制塑料袋中进行,并根据膜大小节省试剂用量,反复回收), 操作简便, 结果易保存等优点, 可推广试用。

参 考 文 献

- 1 范培昌, 生物大分子印渍技术和应用, 上海: 科学技术文献出版社, 1989; 1—94
- 2 Towbin H, Gordon J. Immunoblotting and dot immunobinding——current status and outlook. *J Immunol Meth*, 1984; **72**:313
- 3 朱正美, 程腊梅. 细胞表面糖复合物与妊娠. 生殖与避孕, 1992; **12**(2):3
- 4 孙册, 朱政, 莫汉庆. 凝集素, 北京: 科学出版社, 1986; 117—130
- 5 Hartree E F. Determination of protein; Modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem*, 1972; **48**:422
- 6 Laemmli U K. Cleavage of structural protein during the assembly of the bacteriophage T₄. *Nature*, 1970; **227**:680
- 7 Anon. LKB 2117 multiphor II electrophoresis system laboratory manual. LKB produkter AB, Bromma, Sweden;

- 1986.
- 8 Anderson T L, Olson G E, Hoffman L H. Stage-specific alterations in the apical membrane glycoproteins of en-

dometrial epithelial cells related to implantation in rabbits. *Biol Reprod*, 1986; **34**:701

以 AQ 膜中沉积铂的玻碳电极为基底的葡萄糖传感器*

纪学锋** 章咏华***

(中国科学院长春应用化学研究所电分析化学开放研究实验室, 长春 130022)

关键词 Eastman AQ-55, 化学修饰电极, 葡萄糖氧化酶, 电流式传感器

生物传感器所面临的两个主要问题就是电活性物质对测定的干扰和生物样品中大分子物质对电极的污染. 人们很早就研究解决这两个问题的方法. 使用透析膜可以一定程度地解决上述问题, 但这种传感器的响应时间太长. 从80年代起, 人们开始研究使用化学修饰电极来解决干扰和污染的问题, 先后研制了以醋酸纤维素膜^[1]、聚邻苯二胺膜^[2]、Nafion 膜^[3-6]修饰电极为基底的葡萄糖传感器. Eastman AQ 是一种全氟代磺酯, 具有阳离子交换性质, 易溶于水, 而干燥后不再溶于水. 利用这个性质, J. Wang 用 AQ-55 在铂电极表面用一步法固定了葡萄糖氧化酶, 在 +0.7V (vs. Ag/AgCl) 下, AQ 膜可以使干扰降低到最小的程度^[7]. Hale 等在碳糊葡萄糖氧化酶电极表面涂一层 AQ-29D 膜, 用来消除干扰和防止酶的流失^[8].

本文描述一种以 Eastman AQ-55 膜修饰电极为基底的葡萄糖传感器. 该传感器可以大大地降低测定时电活性物质的干扰, 同时电极具有良好的响应特性和使用寿命, 是一种性能良好的葡萄糖传感器.

1 材料与方法

1.1 仪器

DH-1型恒电位仪(吉林省龙井器材厂), X-Y 记录仪(Series 60 000, 沈阳精密仪器厂), pHs-3型酸度计(上海第二分析仪器厂), 超低恒温槽(国产), 电解池由三电极体系构成: 酶电极、铂对极, 银-氯化银参化电极.

1.2 试剂

葡萄糖氧化酶(GOD)(E.C. 1.1.3.4, 23500U/g,

Sigma); Eastman AQ-55 (美国 Eastman Kodark 公司), 配成1%水溶液; 葡萄糖、尿酸、抗坏血酸都是生化试剂, 用 pH7.0 的 0.1mol/L 的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ 缓冲溶液配成 0.5mol/L 的标准溶液. 以上各物质和溶液均置冰箱中保存. 其余各种物质都是分析纯, 所有溶液都用二次蒸馏水配制.

1.3 实验方法

1.3.1 AQ/pt/GC 电极的制备 取直径为 3mm 的玻碳(GC)电极, 用砂纸磨平, 然后分别在 1 μm , 0.3 μm 的 Al_2O_3 粉末上抛光, 最后分别用丙酮、乙醇, 二次蒸馏水在超声清洗器上洗涤、干燥. 取 10 μl 1% 的 Eastman AQ-55 水溶液滴于 GC 电极表面, 室温下干燥, 得到涂有 AQ-55 膜的化学修饰电极(CME). 将 AQ 膜 CME, 铂对极, Ag/AgCl 参比电极一起构成三电极体系, 在 3% 的氯铂酸钾水溶液中进行循环电位扫描, 扫描电位 -0.15—+0.7V (vs. Ag/AgCl), 扫速 120mV/s, 扫描时间为 10min, 得到 AQ 膜中沉积铂的 CME. 该电极在室温下干燥后备用.

1.3.2 GOD/AQ/pt/GC 电极的制备 取 GOD 1mg, BSA (牛血清白蛋白) 2mg, 加 pH7.0 的磷酸盐缓冲液 (0.1mol/L) 200 μl , 使 GOD, BSA 溶解, 再加 12.5% 的戊二醛溶液 30ml, 搅拌, 取此溶液 10 μl 滴于 AQ 膜中沉积铂的 CME 表面, 冰箱中干燥成膜, 然后

*国家自然科学基金资助项目.

**现在天津石化公司研究所工作.

***通讯联系人.

收稿日期: 1992-07-16 修回日期: 1992-11-14