

经验交流

转移缓冲液对蛋白质印迹的影响

周 建 王小行 高小平¹⁾

(中国科学院成都地奥制药公司, 成都 610041)

摘要 利用三种转移缓冲液, 分别以半干和湿转法, 检测癌基因产物 Bcl-2, 并获得不同强度的印迹结果。不含 SDS 的转移缓冲液转移效果明显优于含 SDS 的转移缓冲液, 且 SDS 含量越高印迹带越弱; 此外, 半干转移与湿转相比, 可大大缩短转移时间, 但转移效果不及湿转理想且稳定性较差。

关键词 蛋白质印迹, 转移缓冲液, 十二烷基硫酸钠

学科分类号 Q939.91

免疫印迹技术 (Western blotting) 是将凝胶电泳和免疫化学有机结合的一种蛋白质分析检测技术, 其敏感性和特异性受各种因素如凝胶电泳、抗原或抗体等的制约。电转移过程中, 缓冲系统也是不可忽视的重要因素。常用的缓冲系统主要有三种, 其差异主要在于是否含有 SDS, 或 SDS 含量的多少。缓冲液中 SDS 的存在与否或含量多寡可能影响印迹结果。为此, 我们分别应用半干和湿转移方法, 比较了三种缓冲系统在检测癌基因产物的印迹结果。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

人早幼粒白血病 HL-60 细胞, 按常规方法培养。Miniprotein II 电泳槽、Transblot SD 半干转移槽和湿转装置、Goat Anti-Mouse IgG (H+L) 及 Immun-Blot PVDF 膜为 Bio-Rad 公司产品。甲叉双丙烯酰胺和 SDS 购自 CALBIOCHEM。ECLTM Kit (增强化学发光试剂盒) 购自: Amersham Pharmacia Biotech 公司; 其余试剂均为市售分析纯。

1.2 方法

1.2.1 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳: a. 样品处理: 待测细胞加入适量样品处理液 (含 4% SDS、10% 巯基乙醇、1 mmol/L EDTA、20 mmol/L Tris、pH 8.0) 使细胞密度为 1×10^5 个/ μ l, 100℃加热 3 min。b. 电泳: 对不同细胞数上样电泳, 用考马斯亮蓝染色后确定细胞最适上样量为 7.5×10^5 个每孔, 200 V 恒压电泳 40 min。

1.2.2 转移: 转移缓冲液: a. 含 25 mmol/L Tris, 191 mmol/L 甘氨酸, 20% 甲醇的转移缓冲液^[1]; b. 含 25 mmol/L Tris, 191 mmol/L 甘氨酸, 0.1% SDS, 20% 甲醇的转移缓冲液 (Bio-Rad 公司仪器说明书); c. 含 48 mmol/L Tris, 39 mmol/L 甘氨酸, 0.037% SDS, 20% 甲醇的转移缓冲液^[2]。将待转移凝胶和 PVDF 膜分别于三种转移缓冲液中浸泡 30 min。再分别按照 Bio-Rad 半干转移及湿转说明书转移。

1.2.3 印迹: PVDF 膜置于 5% 脱脂奶粉中 (溶于 PBS) 浸泡 4 h。鼠抗人 Bcl-2 IgG 加入 5% 脱脂奶粉中使其终浓度为 0.5 mg/L, 室温结合 2 h。PBS-Tween20 洗膜 3 次, 每次 10 min、250 ml。羊抗鼠 HRP 结合物按 1:3 000 加入 5% 脱脂奶粉中, 室温结合 2 h。PBS-Tween20 洗膜 3 次, 每次 10 min、250 ml。按试剂盒说明书进行 ECL 显色。

2 结果与讨论

三种转移缓冲液并用半干和湿转方法检测原癌基因产物 Bcl-2 蛋白的印迹结果见图 1 和图 2: 无论用半干还是湿转, 含有 0.1% SDS 的缓冲液检测 Bcl-2 获得的印迹条带明显弱于不含 SDS 或含微量 SDS 的结果, 表明 SDS 的含量可直接影响 Bcl-2 蛋白与膜的结合。根据两种转移方法的比较, 半干转移 (图 2) 所需时间明显低于湿转移 (图 1), 但

¹⁾ 通讯联系人。

Tel: (028) 2900418, E-mail: gxplw@mail.sc.cninfo.net

收稿日期: 1999-05-21, 修回日期: 1999-08-06

结果不及湿转效果好,特别是在含 0.1% SDS 的转移缓冲体系中差别更明显.

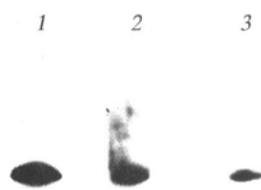


图 1 湿转法

200 mA 恒流转移 3 h. 1: 不含 SDS 缓冲体系; 2: 含 0.037% SDS 缓冲体系; 3: 含 0.1% SDS 缓冲体系.

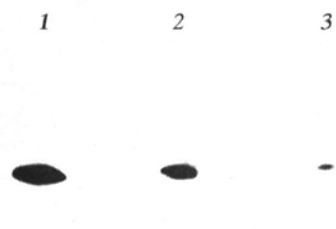


图 2 半干转移

10 V 恒压转移 30 min. 1: 不含 SDS 缓冲体系; 2: 含 0.037% SDS 缓冲体系; 3: 含 0.1% SDS 缓冲体系.

免疫印迹法已广泛应用于蛋白质分析和检测,但对某些表达量较低的蛋白,如检测某些肿瘤细胞的基因产物,还存在灵敏度不够的缺点,转移方法及缓冲体系的选择是一个不可忽视的因素.本文结果表明在转移缓冲液中,SDS 的存在可缩短转移时间,但能影响膜对蛋白质的结合能力;半干转移与湿转相比可大大缩短转移时间并提高转移效率,但转移效果不及湿转法理想且稳定性较差.因此在实际的研究工作中,可根据检测蛋白质质量的多寡选择实验方法,如对于表达量低的蛋白质检测,可选用湿转法并不含 SDS 的缓冲体系;而对于含量较高

的蛋白质检测,则可选用半干并含 SDS 的缓冲系统,从而既可获得满意的印迹结果,又可缩短实验时间.

参 考 文 献

- 1 赵永芳. 生物化学技术原理及其应用. 武汉: 武汉大学出版社, 1988. 358~ 359
Zhao Y F. The Principle and Application of Biochemical Techniques. Wuhan: Wuhan University Press, 1988. 358~ 359
- 2 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 分子克隆实验指南. 第二版. 北京: 科学出版社, 1992. 891~ 893
Jin D Y, Li M F (eds). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd. Beijing: Academic Press, 1992. 891~ 893

Comparison of Three Transfer Buffer in the Protein Blotting with Semidry and Tank Electric Transfer.

ZHOU Jian, WANG Xiao-Xing, GAO Xiao-Ping (Chengdu Di Ao Pharmaceutical Company, The Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China).

Abstract In western blotting, the electrophoretic transfer effect of the proteins can be affected by sodium dodecyl sulfonate (SDS) in the transfer buffer. Using three transfer buffer with or without SDS in both semidry and tank transfer systems, the Bcl-2 protein levels were tested and the spectrum of the protein blots were compared. The addition of SDS in buffer reduced the binding of Bcl-2 protein with PVDF membrane, either in semidry or tank electric transfer. The transfer efficiency of both semidry and tank systems were also compared. The semidry electric transfer markedly minimized the transfer times, but the transfer result were a little poorer than the tank transfer system.

Key words protein blotting, transfer buffer, sodium dodecyl sulfonate