

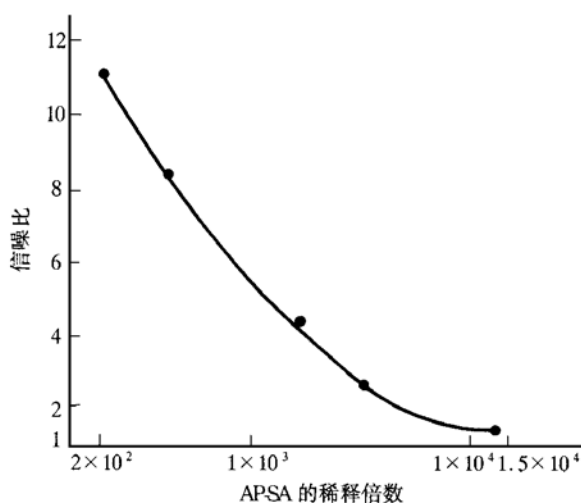


图2 AP-SA 的稀释线性

表2 AP-SA 的信噪比的稳定性

测量日期	AP-SA 的稀释倍数				
	4000	2000	400	100	50
1996-05-27	2.16	2.42	6.76	15.30	20.59
1996-07-24	1.19	2.63	8.19	11.79	14.87
1996-11-06	-	1.55	3.08	6.71	8.90

本文用戊二醛二步法, 用 AP 标记 SA. 先以戊二醛处理 AP, 形成 AP 与戊二醛结合物, 经透析除去过量戊二醛. 第二步, 活化的 AP 与 SA 上的游离氨基作用. 本法质量均一, 活性高. 本法比文献报道一步法的活性至少高 10 倍. 本文报道的研究内容, 国内未见报道.

参 考 文 献

- 赵启仁 (Zhao Q R). 时间分辨荧光免疫分析及其应用前景. 国外医学放射医学核医学分册 (Foreign Medical Sciences, Radiation Medicine and Nuclear Medicine), 1992, **16** (4): 182 ~ 188
- Diamandis E P, Kitching R, Christopoulos T K. Enzyme amplified time-resolved fluoroimmunoassays. Clin Chem, 1991, **37** (6): 1038
- Bobrow N M, Harris T D, Shaughnessy K J, et al. Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays. J Immunol Method, 1989, **125** (1/2): 279~ 285
- Evangelista R A, Pollak A, Gudgin-Templeton E F. Enzyme amplified lanthanide luminescence for enzyme detection in bioanalytical assays. Anal Biochem, 1991, **197** (1) 213~ 224
- 李美佳, 赵启仁, 庄湘莲, 等 (Li M J, Zhao Q R, Zhuang X L, et al.). 酶放大时间分辨荧光免疫分析酶底物试剂 5-氟水杨酸磷酸酯的研制. 中国医学科学院学报 (Acta Academiae Medicinae Sinicae), 1997, **19** (2): 106
- 赵启仁, 李美佳, 刘洁, 等 (Zhao Q R, Li M J, Liu J, et al.). 酶放大镧系元素发光法测定碱性磷酸酶. 生物化学与生物物理进展 (Prog Biochem Biophys), 1998, **25** (1): 71~ 74

Study of Alkaline Phosphatase-labelled Streptavidin.

ZHAO Qi-Ren, LI Mei-Jia, LIU Jie, SONG Na-Ling, ZHUANG Xiang-Lian, CHEN Ai (Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China).

Abstract Alkaline phosphatase (AP)-labelled streptavidin (SA) is the most important general reagent in enzyme-amplified time-resolved fluoroimmunoassay. A two step method of AP-labelled SA using glutaraldehyde was described. Characteristics of the labelled product AP-SA were measured using the self prepared fluorescence developing solution and the substrate 5-fluorosalicyl phosphate. The labelled recovery of AP is 38.7%. The relationship between diluting times of the AP-SA and signal/noise ratio of Tb^{3+} is linear when diluting the AP-SA 200~ 12 800-fold. Enzyme activity of the AP-SA is stable during two months at least.

Key words enzyme-amplified time-resolved fluoroimmunoassay, alkaline phosphatase, streptavidin

一种 SDS-PAGE 与 MALDI-TOF 质谱联用的方法*

潘晓宇 赵 晖 胡美浩¹⁾

(北京大学生命科学学院, 蛋白质工程和植物基因工程国家重点实验室, 北京 100871)

摘要 以尿激酶原为材料, 探索一种从 SDS-PAGE 胶上回收蛋白质做 MALDI-TOF 质谱的方法. 所用的回收方

* 北京大学与美国惠普公司实验室合作项目资助.

¹⁾ 通讯联系人. 收稿日期: 1998-05-12, 修回日期: 1998-11-06

法包括电洗脱、脱盐、除 SDS 等过程。电洗脱用的是高盐阻断法, 脱盐用的是超滤技术, 去除 SDS 用的是冷丙酮沉淀法。结果证明, 此方法至少对一些蛋白质 (如尿激酶原和牛血清白蛋白) 是可行的。

关键词 尿激酶原, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 基质辅助激光解吸附/离子化飞行时间质谱

科学分类号 Q53, Q633

基质辅助激光解吸附/离子化飞行时间质谱 (matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS) 是一种比较新的质谱技术。其原理是使待测大分子样品以一定比例与基质 (matrix) 混合、干燥, 当一定波长的激光打在样品上时, 可以使大分子样品很容易离子化, 然后在电场力作用下飞行, 通过检测离子的飞行时间计算出其电荷质量比。其特点是可检测的相对分子质量范围广 (上限可达几十万), 分辨率为 600 ($m/\Delta m$)、灵敏度 (ng 级)、精确度 (内标法可达 0.01%) 都优于 SDS-PAGE, 操作也比较简便、迅速, 所以在生物大分子方面有着广泛的用途^[1]。但是, 它对样品纯度的要求比较苛刻, 无机盐、去污剂等杂质如果超过一定限度, 就会影响检测结果。另外, 样品在与基质混合时必须处于溶解状态, 如果处在聚合悬浮状态, 就会测不出结果。所以, 样品在做 MALDI-TOF MS 之前, 一般要经过纯化和脱盐。

SDS-PAGE 除了可以作为一种检测生物大分子的相对分子质量组成、纯度的工具, 还可作为一种分离纯化的工具。这种纯化方法直观、简便, 而且对于某些变性蛋白质 (如包涵体), 也能很方便地分离出来。另外, 从电泳胶上回收蛋白质也很简便, 方法也较多, 其中电洗脱回收就有半透膜、不连续电导梯度、静态堆积缓冲液等多种方法可供选择^[2]。为了在蛋白质得量少的环境下进行 MALDI-TOF 质谱分析, 我们探索了一种直接从 SDS-PAGE 胶上回收蛋白质做 MALDI-TOF 质谱测定的方法。我们用的是不连续电导梯度法, 即高盐阻断法来回收蛋白质。另外, 在做 MALDI-TOF MS 之前, 还需除掉 SDS, 冷丙酮沉淀法是一种比较简便的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

在昆虫细胞 Sf9 中表达的重组尿激酶原 (r-pror-UK) 经单克隆抗体亲和层析纯化。MALDI-TOF 质谱仪 G2025A LD-TOF System、样品制备仪 G2024A、蛋白质分子质量标准 Protein Standard 和

Sinapinic Acid Matrix 购自美国惠普公司。LKB 2014 Extraphor Electrophoretic Concentrator 购自瑞典 LKB 公司。

1.2 方法

1.2.1 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和电洗脱: 用常规方法进行 SDS-PAGE, 蛋白质上样量约 15 μg , 用考马斯亮蓝染色。脱色后把所要回收的带切下, 用约 100 ml 电洗脱缓冲液 (50 mmol/L Tris, 50 mmol/L 甘氨酸, 0.1% SDS, pH 8.9) 洗三次, 每次 10 min。用 LKB 2014 Extraphor Electrophoretic Concentrator 做回收, 在 100 V 电压、20~22 mA 电流的条件下电洗脱 1 h, 高盐阻断缓冲液是 50 μl 含 3 mol/L NH_4HCO_3 的电洗脱缓冲液。电洗脱后, 把回收液离心除去不溶杂质, 保留上清。

1.2.2 脱盐: 用 Ultrafree-MC centrifugal filter unit (5000 NMWL, Millipore Corp.) 超滤离心管, 加样品 400 μl , 室温离心 60 min, 转速 6 000 r/min, 弃掉滤液, 加稀释液 (0.1% SDS) 到 400 μl , 重复上述步骤 5 次, 最后把样品浓缩到 50~70 μl 。

1.2.3 去除 SDS: 样品 50 μl 加 4 倍体积预冷至 -20 $^{\circ}\text{C}$ 的 200 μl 丙酮, 混匀后置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内 30 min, 10 000 r/min 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min。倒掉上清液, 用 200 μl 80% 丙酮把沉淀洗一遍, 再倒掉上清液, 将沉淀置室温干燥, 最后溶于 10 μl 50% 乙腈, 用 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

1.2.4 MALDI-TOF MS: 样品一般经过脱盐, 再用 50% 乙腈配成浓度为 0.05~0.5 g/L 的蛋白质溶液, 取 5 μl 溶液与 5 μl 基质混合, 取 0.5~1 μl 混合液点在探头上, 经样品制备仪抽干后上样。

2 结果与讨论

经过亲和层析纯化的尿激酶原冻干样品约 15 μg 用蒸馏水溶解, 加入常规的 SDS-PAGE 样品处理液, 100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸 5 min 后进行 SDS-PAGE、染色、脱色, 在胶上分子质量 50 ku 处显现出清晰的尿激酶原条带。切下条带, 经过电洗脱后, 蛋白质样品和结合在其上的考马斯亮蓝染料都被洗脱下

来. 在超滤离心脱盐后, 考马斯亮蓝染料仍然和蛋白质样品结合在一起, 直到用丙酮沉淀法除 SDS 时, 才与蛋白质分开, 它和 SDS 都留在上清里, 仅仅蛋白质留在沉淀里. 把蛋白质沉淀用 50% 乙醇溶解后, 做 MALDI-TOF 质谱分析.

为了比较, 我们还把没有经过 SDS-PAGE 纯化的尿激酶原脱盐后, 做了 MALDI-TOF 质谱分析 (图 1 和图 2). 图 1 和图 2 标识的 $(M+H)^+$ 峰为带一个质子的分子离子峰, 而标识 $(M+2H)^{2+}$ 峰为带两个质子的单体的峰. 测得的分子质量结果分别是 $(46670.9 \pm 133.1) \text{ u}$ (图 1) 和 $(47033.6 \pm 107.7) \text{ u}$ (图 2). 分子质量后的标准差为实验重复的精确度, 不是指绝对偏差.

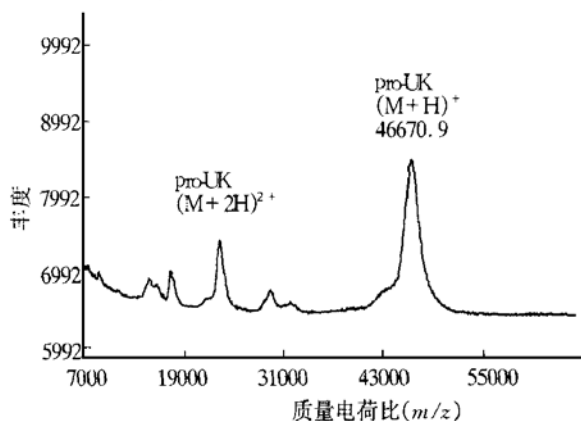


图 1 从 SDS PAGE 胶上回收的 r pro UK 的 MALDI-TOF 谱图

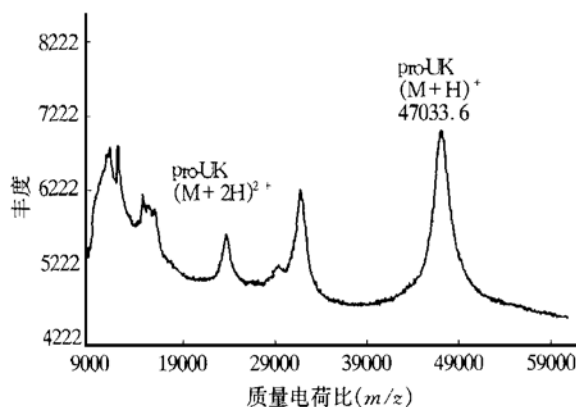


图 2 亲和层析纯化的 r pro UK 的 MALDI-TOF 谱图

图 1 的主峰明显, 噪音峰较小. 另外, 我们还用牛血清白蛋白 (BSA) 做了类似实验, 同样得出较好结果, 说明这个方法有一定的可行性. 图 1 所得结果比图 2 降低了约 360 u. 另外, 我们用牛血清白蛋白 (BSA) 试验从 SDS-PAGE 胶上回收做 MALDI-TOF MS 也发现了类似结果: BSA 经过 SDS-PAGE 回收后分子质量小了 400~500 u, 原因尚有待于进一步研究.

本实验参考了从 SDS-PAGE 回收蛋白质做电喷雾质谱 (electrospray ionization mass spectrometry) 的方法^[3], 但在 SDS-PAGE 后的染色以及电洗脱等方法上作了一些改动: 在电洗脱方法上, 我们用的是高盐阻断法, 它是利用蛋白质在低盐溶液中电泳速度快, 在高盐溶液中电泳速度慢的特点, 使其在低盐时迁移出 PAGE 胶, 而在高盐区段截收. 它的优点是速度快, 洗脱后的体积小, 操作也较容易. 我们用的是考马斯亮蓝法染色, 考虑到这种方法是目前用得最多的 PAGE 染色方法之一. 它与铜染法相比, 虽然速度慢一些, 但是结果直观, 保存时间长, 操作容易, 不需要太多的技巧. 另外, 用考马斯亮蓝染色后, 也方便了电洗脱, 因为考马斯亮蓝结合在蛋白质上, 作为一种标记物, 可以很直观地监测到电洗脱的进程, 防止洗脱不完全和电泳时间过长而使蛋白质走过高盐区. 虽然考马斯亮蓝染料与蛋白质结合得比较紧密, 但丙酮沉淀法也可使它们分开.

在脱盐时, 如果直接用纯水作稀释液, 会发生蛋白质聚合沉淀的现象, 所以稀释液中加了一定量的 SDS 防止蛋白质聚合, 只是在丙酮沉淀时, 才除掉 SDS.

参 考 文 献

- 1 Stults J T. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS). *Current Opinion in Structural Biology*, 1995, 5 (5): 691~698
- 2 Shoji M, Kato M, Hashizume, S. Electrophoretic recovery of proteins from polyacrylamide gel. *J Chromatography A*, 1995, 698 (1): 145~162
- 3 Maire M L, Deschamps S, Moller J V, *et al.* Electrospray ionization mass spectrometry on hydrophobic peptides electroeluted from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis application to the topology of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase. *Analytical Biochemistry*, 1993, 214 (1): 50~57

A Method of Recovering Protein from Dodecyl Sulfate polyacrylamide Gel for Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. PAN Xiao-Yu, ZHAO Hui, HU Mei-Hao (*National Laboratory of Protein Engineering and Plant Genetic Engineering, College of Life Sciences, Beijing University, Beijing 100871, China*).

Abstract The purpose of the experiment is to use pro-urokinase as a model to find a way of recovering proteins from SDS-PAGE gel for MALDI-TOF MS. The recovering method includes steps of electroelution, desalting and SDS removal. Discontinuous conductivity gradient method for electroelution,

centrifugation ultrafiltration for desalting and cold acetone method was used for SDS removal. The result shows that the method is feasible at least for some proteins (e. g. pro-urokinase and bovine serum

albumin).

Key words pro-urokinase, SDS-PAGE, matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-TOF)

一种简易的免疫 PCR 方法的建立

徐平西 肖华胜 鞠 躬

(第四军医大学神经科学研究所, 西安 710032)

摘要 免疫 PCR 为一种高敏感度检测抗原的新技术, 操作程序大多沿袭 ELISA 方法. 用戊二醛作连接剂, 将蛋白质高效率包被在普通 PCR 管内壁, 使免疫及 PCR 反应用普通 PCR 仪得以在管中连贯地进行. 实验结果表明, 标准曲线的线性关系好, 与 ELISA 方法比较敏感度高出约 10^5 . 这一改良法的建立, 可望促进免疫 PCR 的普及应用.

关键词 免疫 PCR, 包被, 戊二醛, PCR 管

学科分类号 O523

免疫 PCR 由 Sano 等^[1]首创, 本质上是一种以 PCR 代替酶反应来放大显示抗原抗体结合率的改进型 ELISA. 其突出的特点是指数级的扩增效率带来了极高的敏感度, 能检出浓度低至 2 ng/L 的抗原物质^[2], 为现行任何一种免疫定量方法所不及. 然而由于操作技术和设备上的问题, 限制了这一技术在普通实验室中的应用.

目前, 在免疫 PCR 的操作流程中抗原抗体的结合反应操作与 ELISA 相同, 在塑料 ELISA 平板上进行; 而后半程的 PCR 操作则有两种途径: a. 将平板孔内结合的报告 DNA 模板精确地转移至 PCR 管反应体系中, 再插入普通 PCR 仪^[3]; b. 将平板直接置于 PCR 仪中进行扩增反应, 但这需要专用平板 PCR 仪器^[4]. 显然前者繁琐, 后者昂贵. 本文介绍了一种利用普通 PCR 管进行全程操作, 以普通 PCR 仪进行扩增反应的新方法, 并成功地检测了去肾上腺大鼠垂体前叶中 IL-6 的微量变化.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂: 牛血清白蛋白组分 V (华美生化试剂公司); 吐温-20、鲑鱼精 DNA (美国 Sigma 公司); 过氧化酶底物 2, 2'-连氮-双-(3-乙基苯并噻唑啉磺酸) (ABTS, 加拿大 Sangon 公司); 25% 戊二醛 (美国 Structure probe 公司).

1.1.2 抗原抗体: 牛 S-100 蛋白标准品、小鼠抗

牛 S-100 蛋白 β 亚基单克隆抗体、生物素化羊抗兔 Ig 抗体、链霉卵白素、(HRPO)-酶连卵白素 (美国 Sigma 公司); 小鼠抗人 IL-6 多克隆抗体 (军事医学科学院沈倍奋教授赠送); 兔抗牛 S-100 蛋白多克隆抗体 (美国 DAKO 公司).

1.2 仪器

PCR 扩增仪 PTC-150 (美国 PE 公司); 凝胶成像系统 GDS-8000 (英国 UVP 公司); 超声破碎仪 Soniprep 150 (日本 SANYO 公司).

1.3 方法

1.3.1 样品提取液的制备: 雄性 SD 大鼠 (上海产) 10 只, 体重 (200 ± 20) g. 随机分成两组: 一组为正常对照; 一组为处理组, 行肾上腺切除术, 术后 4 d 取垂体前叶和血清. 将每只垂体样品置于 100 μ l 的 1% Triton X-100 0.05 mol/L PBS (pH 7.4), 匀浆后以 10 kHz 5 s $\times$ 3 超声破碎, 离心 10 000 r/min, 10 min, 取上清紫外分光光度法定量. 稀释提取液使蛋白质浓度达到 1 g/L. 另取血清样品作 1 000 倍稀释备用.

1.3.2 ELISA 夹心法: 参照常规方法^[5]将牛 S-100 蛋白质标准品用稀释液 (PBS 含 1% BSA) 从 1 mg/L 浓度始, 10 倍稀释 7 次, 依次加入孔中进行抗原抗体操作. 显色用 ABTS 为过氧化酶底物, 反应 15 min 终止后在 ELISA 光密度仪上测定 A 值.