

经验交流

一种检测聚丙烯酰胺凝胶中蛋白质免疫活性的方法*

赵晓瑜 静天玉

(河北大学生物工程研究所, 保定)

聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 已成为最有效的分离蛋白质手段。在免疫学研究中, 经常遇到的问题是从小聚丙烯酰胺凝胶中回收被分开的蛋白质组分, 然后测其免疫活性。从小聚丙烯酰胺凝胶中回收蛋白质的方法已有许多报道^[1-3], 其中以 Härtvig^[1] 的方法为最简便。该法以溴酚蓝为指示剂, 利用电泳系统本身使蛋白质反向电泳到甘油层。我们发现, 在操作中由于浓缩胶太软, 覆盖在胶面上的少量甘油层很难定量回收, 而增大甘油层又会使样品稀释; 此外, 如果同时回收多个样品, 由于电泳时间不可能完全一致, 有的样品会因电泳时间过长而丢失。本文在该法基础上, 用琼脂糖代替聚丙烯酰胺配制浓缩胶和支持胶, 将蛋白质以浓缩状态直接回收到琼脂糖凝胶中, 使操作更为简便, 回收率几乎达 100%。回收样品可直接用于免疫电泳。

材料及方法

一、聚丙烯酰胺圆盘电泳 按张龙翔等^[4]方法, 分离胶为 7.5%, 浓缩胶为 2.5%。样品为猪脾细胞浆提取物 (内含 B₂ 抗原——一种小 RNA-蛋白质复合物^[5]), 蛋白质浓度 4mg/ml, 加样量 40μl。电泳结束, 取出凝胶条, 用 pH6.7 的 0.125mol/L Tris-HCl 缓冲液冲洗后置于 0.1% 的溴酚蓝溶液中浸泡。对照胶条直接用考马斯亮蓝染色, 观察蛋白质组分分离情况。

二、电泳回收 将在 0.1% 溴酚蓝溶液中浸泡数分钟后的凝胶条取出, 切去溴酚蓝。然后将整个胶条按长度平均切成 10 份, 每份长约 0.5cm (或根据需要切取特定区带)。用洗耳球将各个凝胶段分别吸入预先润湿的玻璃管中间。吸去玻璃管内剩余水份。如图 1 所示, 在含有样品的凝胶段 (B 层) 上端浇注用 pH6.7、0.125mol/L Tris-HCl 缓冲液配制的 1% 低电渗琼脂糖 (A 层, 约 2cm 厚), 下端浇注用 pH8.3、0.005mol/L Tris-甘氨酸缓冲液配制的 1% 低电渗琼脂糖 (C 层, 充满玻璃管)。浇注前琼脂糖应冷至 60℃ 左右, 如样品热稳定性差, 可将玻璃管置 4℃ 冰箱内预冷。将浇注好的玻璃管分别装入原电泳槽内, 反向电

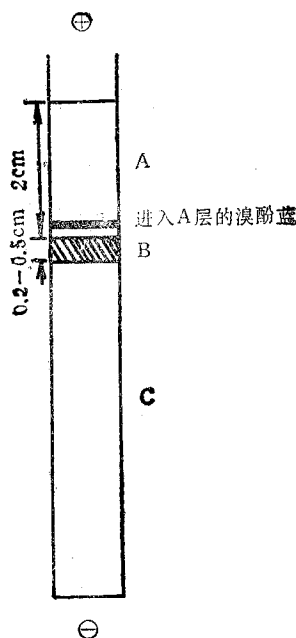


图 1 蛋白质电泳回收装置示意图

A. 1% 琼脂糖, Tris-HCl, pH6.7 B. 聚丙烯酰胺凝胶段 (含蛋白质样品) C. 1% 琼脂糖, Tris-甘氨酸, pH8.3 100V、电泳 1—1.5 小时

泳 (即上贮槽接正极, 下贮槽接负极)。当各管 B 层的溴酚蓝都进入 A 层, 电泳结束。用洗耳球自玻璃管一端将胶条吹出。切下 A 层的溴酚蓝段作为以下免疫电泳的样品胶。

三、对流免疫电泳 根据赵晓瑜等^[6]方法制备 1% 中电渗琼脂糖凝胶板 (用 0.025mol/L、pH8.6 巴比妥缓冲液配制)。将各样品胶平放于干净玻板上, 用凝胶打孔器垂直插入, 取其一部分嵌入抗原孔内。对应孔分别加 10μl 抗 B₂ 抗体 (病人血清)。电泳结束, 观察沉淀线。

* 国家自然科学基金资助课题

四、火箭电泳 将7ml 1% 低电渗琼脂糖(缓冲液同三)与20 μ l 抗R₀抗体混合,灌入5×8cm 双层玻板之间(内夹有2mm 厚的凹形框架),制成厚度均匀的凝胶板。在凝胶一侧距边缘1cm 处打一排孔(孔径3mm, 孔距4mm)。用上述方法从各样品胶上取样,依次放入孔内。近孔侧接负极,远孔侧接正极。电泳结束后,用生理盐水浸洗一昼夜。凉干,用考马斯亮蓝染色。

结果与讨论

图2是猪脾细胞浆提取物 PAGE 及回收样品的免疫电泳图谱。可以看到,在 PAGE 图上具有R₀抗原活性的组分分布在距溴酚蓝端 2/10—6/10 处,而且

活性强弱不一,说明R₀抗原具有非均一性。此结果与文献报道^[7]及凝胶过滤分析结果(未发表)一致。

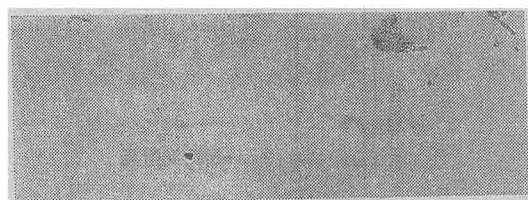
在电泳回收装置中,C 层仅仅起支持作用,其浓度不必精确^[13],A 层为大孔胶。本文在A 层和C 层用琼脂糖代替聚丙烯酰胺,这不仅能起上述作用,而且在整个电泳系统中仍保持凝胶层、缓冲液离子成分、电位梯度及 pH 等不连续条件,因而具有同样的样品浓缩作用,其电泳现象完全类似于 PAGE。当溴酚蓝全部进入A 层后,样品层厚度维持2—3mm。

电泳结束后,利用考马斯亮蓝对各B 层凝胶染色,检查蛋白质回收情况,发现仅溴酚蓝远端有少量剩余蛋白质,这可能与该凝胶段中蛋白质荷电量少或分子量过大有关。如果将B 层凝胶段厚度由0.5cm 减小到0.2cm,则看不到有剩余蛋白质存在。

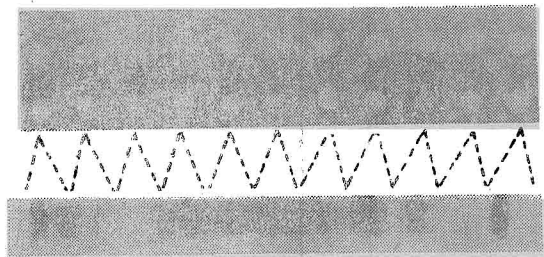
由于琼脂糖易于灌胶、取胶和切胶,因此本法操作非常简便,样品不易丢失,并可直接用于对流免疫及火箭电泳,测定样品中各蛋白质组分的免疫活性。

样品经 PAGE 后,也可以用天然印迹法(Native Blot)^[19]检查各组分的免疫活性,但该法需要一套专用材料和试剂并操作复杂。

火箭电泳



对流免疫电泳



聚丙烯酰胺凝胶电泳

溴酚蓝

图2 猪脾细胞浆提取物电泳图谱

PAGE: 100V, 电泳3—4小时

对流免疫电泳: 电泳液为0.05mol/L 巴比妥缓冲液, 20V, 电泳1.5小时。

火箭电泳: 电泳液为0.025mol/L 巴比妥缓冲液, 10V, 4℃ 下电泳12—14小时

参考文献

- [1] Ib Mendel-Hartvig: *Anal. Biochem.*, 1982, **121**, 215.
- [2] M.Otto et al.: *Anal. Biochem.*, 1981, **111**, 111.
- [3] 于立平、季坤之:《生物化学与生物物理进展》, 1985, 6, 76.
- [4] Anthony T.Andrews: *Electrophoresis*, Clarendon Press, Oxford, 1981, 136—137.
- [5] Stephens, R. J.: *Anal. Biochem.*, 1975, **65**, 369.
- [6] 张龙翔等:《生化实验方法和技术》, 高等教育出版社, 北京, 1981, 95—105.
- [7] Hajime Yamagata et al.: *J. Clin. Invest.*, 1984, **74**, 625.
- [8] 赵晓瑜等:《中华皮肤科杂志》, 1988, **1**, 58.
- [9] Michael P.Reinhart et al.: *Anal. Biochem.*, 1982, **123**, 229.

[本文于1988年8月20日收到]

订刊信息

请订阅1990年《茶叶文摘》

《茶叶文摘》(双月刊,逢双月24号出版)是国家科委和新闻出版总署批准的刊物,向国内外公开发行人,国内统一刊号 CN33-1116, 发行代号 32-89, 本刊由浙江省报刊发行局发行。凡需订阅者,可到当地邮政局订阅。本刊每册定价1.00元,全年计6.00元。

本刊的文献来源于500余种国内外茶叶期刊和综合性期刊,以及20余种检索工具等。年报道量1000余条并附年度主题索引。

【《茶叶文摘》编辑部,杭州云栖路1号,邮政编码: 310008】