

经验交流

用于免疫印迹法的生物素化标准分子量蛋白质的制备

徐晓平 陈志华 苏 新

(军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京 100850)

关键词 生物素, 标准分子量蛋白质, 免疫印迹法

免疫印迹技术目前已被广泛应用。确定抗原分子量通常使用标准分子量蛋白电泳并转移至 NC 膜, 切下相应条带用氨基黑等染料染色, 不但费时, 敏感性低, 而且在染色和脱色时易引起 NC 膜的皱缩。1986 年 Della-Penna 等报告用生物素化蛋白作为蛋白质印迹 (Western blots) 的分子量标准品^[1]。目前国外已有商品出售, 但价格较贵。本文利用国产低分子量标准蛋白质和自制 N-羟基琥珀酰亚胺生物素酯制备生物素化蛋白取得满意结果。

1 实验方法

1.1 生物素标记标准分子量蛋白质 低分子量标准蛋白质购自中科院生化所东风生化试剂厂。每支标准蛋白样品 (200 μ g) 加入 0.1mol/L NaHCO₃ 200 μ l 溶解。N-羟基琥珀酰亚胺生物素酯^[2] 1mg 溶解于 1ml 二甲基甲酰胺中, 取 2.5 μ l 加入溶解好的蛋白溶液中, 室温反应 5h, 用 0.01mol/L pH7.2 PB 透析 2d, 分装冻存待用。

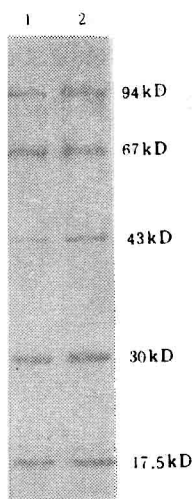


图 1 标准分子量蛋白 SDS-PAGE (考马斯亮蓝染色)

1: 非生物素化标准分子量蛋白 2: 生物素化标准分子量蛋白

1.2 SDS-PAGE 和电转移 按文献 [3] 方法进行。

1.3 生物素化标准分子量蛋白的检测 无需单独染色, 与所检测抗原同时染色。转移后用 1.5% 酪蛋白封闭 NC 膜, 加入相应一抗作用后可用 2 种方法检出: a. 生物素标记二抗作用后加 Avidin-HRP^[3]; b. 在 HRP-二抗溶液中加入 20 μ g/ml Avidin-HRP; 底物显色。

2 结果与讨论

2.1 生物素化标准分子量的迁移率 图 1 为 SDS-PAGE 用考马斯亮蓝染色, 可见生物素化蛋白的迁移率无明显改变。原因是生物素分子量小, 并且在反应时控制了生物素与蛋白的比值, 仅使部份氨基结合了生物素, 其分子量的改变没有影响在 SDS-PAGE 中的迁移率。

2.2 生物素化标准分子量的免疫印迹试验 图 2 显示虽然 17500 分子量的烟草花叶病毒外壳蛋白区带较弱, 但 5 μ g 蛋白样品完全可以显示清晰的区带。

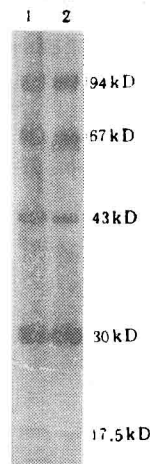


图 2 生物素化标准分子量蛋白的蛋白质印迹图

1. 10 μ g 总蛋白 2. 5 μ g 总蛋白

收稿日期: 1991-03-28

修回日期: 1991-06-28

本法检出敏感度可达 $2.5\mu\text{g}$, 与文献报告一致^[1]。在蛋白质印迹实验中, 用生物素化标准蛋白作分子量标准, 使用 $5\mu\text{g}$ 样品时每次均能得到清晰的区带, 可完全代替一般标准分子量蛋白。

综上所述, 生物素化蛋白用于免疫印迹试验有很多优点, 操作简便, 条带清晰, 便于比较。制备生物素化标准分子量蛋白质一般实验室均可进行, 所用试剂国内外均有商品出售, 自制成本不到国外商品的 1/10,

经济实用, 有推广价值。

参 考 文 献

- 1 Della-Penna D, Christoffersen R E, Bennett A B. *Anal Biochem*, 1986; 152: 329
- 2 初连瑞, 孔祥英, 陈志华等. 军事医学科学院院刊, 1986; 10(1): 50
- 3 金灵, 苏新. 生物化学与生物物理进展, 1989; 16(2): 148

薄层凝胶等电聚焦电泳的快速简便制胶方法

武 廷 章

(安徽大学生物系, 合肥 230039)

关键词 薄层凝胶, 等电聚焦, 电泳, 制胶方法

在薄层凝胶等电聚焦电泳技术中, 制胶可谓是关键的一步。如果制胶失败, 将造成时间上的浪费和经济上的损失(凝胶中所用的两性电解质载体——安福林的价格较昂贵)。如果制成的凝胶薄厚不匀或无支撑物, 将会直接影响实验结果或给实验操作带来麻烦。我们针对这种情况, 结合实验教学, 摸索出一种快速、简便而效果较好的制胶方法。现简要介绍如下。

1 器 材 准 备

1.1 制胶模具: 用北京六一仪器厂生产的 DYY-III36 型薄层等电聚焦电泳槽所配备的制胶模具。其中包括两块长 23.5 cm, 宽 10 cm, 厚 2 mm 的平板玻璃和一个内框长 22 cm, 宽 8.5 cm, 厚 0.5 mm 的橡胶垫片框。

1.2 两张长 23.5 cm, 宽 10 cm 的胶片, 用可复印的投影胶片制作。此胶片一面亲水, 另一面疏水, 各地市场均有售。

1.3 另备大铁文具夹 6 个。

2 制 胶

2.1 配制 $T = 7.5\%$, $C = 3\%$, $\text{pH } 3.5-9.5$ 的聚丙烯酰胺凝胶溶液 15 ml (其中 T 为胶浓度, C 为交联度)。

2.2 架制胶室: 把制胶模具和胶片用无离子水清洗好, 晾干。先取一块平板玻璃平放在实验台面上; 再放上一张胶片, 并使亲水面向上。然后, 把橡胶垫片框平面朝下放在胶片上(四周保持均衡)。继而, 把一张胶片卡在橡胶垫片框四周的凹槽内, 并使亲水面向

上; 最后, 把另一块平板玻璃覆盖在此胶片上。把放好的胶室细心地竖起; 四周用文具夹夹好, 长边夹两个, 宽边夹一个。同时使橡胶垫片框灌胶处朝上, 垂直地横架在平稳的实验台面上即可。这样就在两张胶片之间形成一个长 22 cm, 宽 8.5 cm, 厚 0.5 mm 的均匀胶室。

2.3 灌胶: 把配好的 15 ml 聚丙烯酰胺凝胶溶液 ($T = 7.5\%$, $C = 3\%$, $\text{pH } 3.5-9.5$) 吸入一支带针头的注射器中(针头不能太粗, 否则插不进胶室)。针头通过橡胶垫片框灌胶处插入胶室底部, 把凝胶溶液缓慢地注入胶室, 在室温下凝固 2 h 即可。

2.4 剥胶: 先去掉文具夹, 并轻轻地剥开卡在橡胶垫片框四周凹槽内的玻板和胶片(因该胶片疏水面向着凝胶, 所以, 很易剥开)。再依次取下橡胶垫片框和另一块玻板。最后, 剩下的就是载有薄层凝胶的胶片(因该胶片的亲水面向着凝胶; 所以, 薄层凝胶能很好地固着其上)。这样就制成一块很好的薄层凝胶。

此薄层凝胶制作方法和其它常用方法比较具有以下优点: (1) 简单易行, 成功率高, 省时省材料; 尤其适合大专院校学生实验。(2) 制成的凝胶薄厚均匀, 不会有气泡产生。(3) 因在胶室的两面各用了一张胶片, 且一面是胶片的亲水面, 另一面是胶片的疏水面, 所以, 剥胶方便, 不会损伤凝胶。(4) 因有胶片做支撑物, 所以凝胶便于染色, 固定和清洗。(5) 凝胶可在空气中较快地自然干燥, 不需保存液和胶膜包裹。干燥后的凝胶片可供电泳图谱的扫描和照像等用; 并可作为实验资料长期保存。