

蛋白质印迹法的应用

叶明 周济兰 赵永芳*

(湖北省肿瘤研究所, 武汉)

提 要

本文介绍了蛋白质印迹法的新近应用。并希望这一方法能启发人们的思想,使其应用更迅速、更完善地扩展到生物学科各个方面。

聚丙烯酰胺凝胶电泳是分子生物学、生物化学和细胞生物学中最广泛应用的分析和制备工具。特别是二维聚丙烯酰胺凝胶电泳的应用,能使上千种多肽的复杂样品有效地分离。与此同时,人们也建立了许多灵敏的检测和鉴定凝胶中特异性酶、抗原、糖蛋白、激素受体或其它蛋白质与蛋白质相互作用的方法和技术。但是,要清楚地将凝胶中的某一个蛋白质与其已知的生物学功能联系起来,在凝胶电泳中仍然存在着许多难以克服的困难。首先,它必须保证蛋白质在凝胶电泳时不变性,保留其特异的生物学活性,或者在电泳之前将欲检测的蛋白质共价结合到可检测的配基上,或能使变性的蛋白质复性。同时,电泳后的凝胶必须反复洗涤和多次保温,不仅费时,而且操作难度大。此外,高浓度凝胶或梯度胶由于孔径小或孔径不均匀,大分子探针很难进入。用于鉴定的试剂价格昂贵,消耗量大。但这些弊病运用蛋白质印迹法基本上可得到解决。

所谓印迹,即把大分子物质从凝胶上转移到固定基质上的过程,根据被转移的大分子类别,有 DNA 印迹, RNA 印迹和蛋白质印迹。继之,将印迹物与其配体温育,这一过程称为复盖。在使用探针检出固定基质上的活性带之前,用非特异性的非反应活性分子封锁固定基质上未吸附蛋白质的区域,以消除背景,这在印迹术中称为淬灭。蛋白质印迹的全过程包括凝胶的平衡、印迹、淬灭、亲和结合,探针检出等步骤。有关印迹法的原理^[1],影响印迹的因素等技术问题^[2,3],已有详细的文献报道。本文侧重介绍蛋白质印迹法的应用方面。

特异性抗原的免疫检测 蛋白质印迹法在这方面的应用是极为广泛的。Keith^[4]等将骨髓瘤 IgA 由 50% 以上的多聚体组成)在合成的琼脂糖-聚酰胺凝胶上电泳、转移到硝酸纤维素膜 (NC) 上,用 ¹²⁵I 标记的羊抗人 IgA 的抗体温育,用放射自显影术能方便地检测出 IgA 单体、二聚体、三聚体和四聚体。他们又将病人和正常人血清电泳,印迹,一抗用兔 IgG 温育,二抗用 ¹²⁵I 标记的羊抗兔 IgG 抗体温育,用自显影术检测出病人血清中存在着随机的 IgA 多聚体风湿因子,而正常人血清中则没有。

激素受体的检测 Fernandez-Pol^[5]利用激素 (EGF) 复盖已转移的人表皮癌细胞膜样品,验明了表皮生长因子的受体。具体做法是,首先制备人表皮癌细胞 [A-431] 膜,进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,已被分离的膜样品电泳印迹到 DBM 纸上,经淬灭,与表皮生长因子作用,最后以放射性标记的抗表皮生长因子的抗体为探针,检测出相应的受体,其分子量为 150 KDa。

单克隆抗体的亲和纯化 Olmsted^[6]利用蛋白质印迹得到了纯化的单克隆抗体。多肽进行 SDS-PAGE,印迹到 DPT 纸上,用含多克隆抗体的血清温育,含抗原抗体复合物的单一带从 DTP 纸上剪下来,用低 pH2.8 的缓冲液洗涤单克隆抗体。洗脱的探针可用作免疫化学定位。有关洗脱 NC 膜上蛋白质的研究, Parekh^[7]已报道,用溶在 pH8.9、0.1M 醋酸铵溶液的 50% 吡啶或 40% 乙腈作洗脱剂,在 37℃ 温育 30 分钟,各种蛋白质都能有效地从 NC 上

* 武汉大学生物系。

洗脱下来。冷冻干燥除去挥发性的洗脱剂,蛋白质仍保留其生物活性。

细胞与蛋白质之间的相互作用 Hayman^[8]利用蛋白质印迹证明了特异性的完整细胞与多肽之间的相互作用。他们将人血浆进行 SDS-PAGE,印迹到 NC 上,与正常鼠肾细胞温育,肾细胞能特异地结合到多肽上,细胞用氨基黑 10B 染色,发现细胞是定位在两条分离的蛋白带上,一条是纤维连接蛋白,一条是新发现的 70KDa 蛋白质。

蛋白质与蛋白质之间的相互作用 最近我们从北方产的花豆中提取了高活性的凝集素。按文献^[9]法把甲状腺球蛋白偶联到 Sepharose 4B 上作为亲和层析的配基,粗提取液经柱层折后得到三个组分 A、B、C。为了证明这三个组分中的哪一组分与甲状腺球蛋白有专一亲和性,我们将这三个组分同时进行 SDS-PAGE,转移到 NC 上,NC 分别与辣根过氧化物酶标记的甲状腺球蛋白反应,再用底物发展染色。结果是组分 A、B 均不显色,只有 C 显示一条清晰的带。由此证明与甲状腺球蛋白特异结合的凝集素活性部分在组分 C 中。凝集反应测定, C 的效价也是最高的。

糖蛋白的糖链结构分析 糖蛋白的糖链结构常用的分析方法有气、液色谱法和质谱分光光度法。但这些方法在应用中常常受到限制,因为需要昂贵的仪器和大量的样品。Shigeko^[10]建立了一种快速、简便的在硝酸纤维素膜上分析糖蛋白-N 连结糖链的方法。将已知寡糖链结构的糖蛋白(如高峰淀粉酶 A、卵清蛋白、胎球蛋白和铁转递蛋白)进行 SDS-PAGE,印迹到硝酸纤维素膜上,也可直接将样点在 NC 膜上^[11],用多种经辣根过氧化物酶标记的凝集素反应,通过酶与底物反应之颜色作比较测定。由于各种凝集素糖的专一性不同,它与不同糖链结构的糖蛋白的反应也就不同。有的呈阳性反应,有的呈阴性反应。由此将四种不同结构的 N-连结寡糖链区别开来。以此为依据,用同样方法,经比较分析,即可对被检糖蛋白的 N-连

结糖链结构作出鉴别。此法简单,也可使用粗制样品,其限制是只能定性而不能定量。

临床诊断 蛋白质印迹法不仅广泛应用于生物化学、免疫学领域的基础理论研究中,而且正在迅速地扩展到应用学科方面,如临床上对疾病和癌症的检测。最近又有人^[12]取人的小细胞肺癌细胞株 NCI-H₁₂₈、肝癌 7402,肺腺癌 A₅₄₉,血友病 HL₆₀ 及正常人肺组织培养物细胞各 1×10^6 个,经生理盐水洗涤,加入细胞溶解液,离心后的上清经 SDS-PAGE 板电泳,转移至 NC 膜上。与 IF₇ 单抗液温育,用 ABC 免疫酶染色法检测,结果发现在小细胞肺癌细胞株 NCI-H₁₂₈ 中出现一条特异染色带,其它种类细胞均无条带出现。我们在肺癌早期诊断的研究中,也曾将肺癌患者和正常人的血清进行 SDS-PAGE,转移至 NC 膜上,用辣根过氧化物酶标记的 ConA 检测,发现在低分子量区域有一条谱带与正常人有较明显的差异。肺癌患者多一条谱带。此带是否为癌患者血清中的特异性成份,正在深入研究之中。

蛋白质印迹法的应用以上仅列举少数几例,许多新颖的应用愈来愈多。此法虽是近十年来才创立的一种新方法,但由于设备简单,操作方便,特异性试剂用量少,结果容易保存等优点,易被人们能接受。特别是近几年,国内学者将此法与免疫酶法、同位素标记法、荧光化合物标记法相结合,使其应用逐渐趋于普及化。

参 考 文 献

- [1] Jonathan, MG et al.: *Anal. Biochem.*, 1983, **15**, 1.
- [2] 范培昌:《生物化学与生物物理进展》,1986, (5), 2.
- [3] 李方和等:《国外医学免疫学分册》,1987, 2, 84.
- [4] Keith, BE et al.: *Anal. Biochem.*, 1984, **140**, 208.
- [5] Fernandez-Pol, JA.: *FEBS Lett.*, 1982, **143**, 86.
- [6] Olmsted, JB.: *J. Biol. Chem.*, 1981, **256**, 11955.
- [7] Parekh, BS. et al.: *Anal. Biochem.*, 1985, **148**, 1, 87.
- [8] Hayman, EG. et al.: *J. Cell Biol.*, 1982, **95**, 20.
- [9] Jay, G. et al.: *Nucleic Acid Res.*, 1978, **5**, 2223.
- [10] Shigeko, KO et al.: *Anal. Biochem.*, 1985, **147**, 222.
- [11] 赵永芳等:《生物化学与生物物理进展》,1986, (5), 75.
- [12] 励雁峰等:《上海免疫学杂志》,1987, **7**(3), 152.

[本文于 1987 年 4 月 2 日收到]