

蛋白质免疫印渍法及其应用

王 汉 中

(中国科学院武汉病毒研究所)

提 要

本文系统地概括了蛋白质免疫印渍法的一般原理,概括了应用中常碰到的几个关键问题和解决方法,为电泳转移实验的设计提供一个客观标准,并重温了该技术在分子生物学、免疫学中的一些重要应用。

1975 年, Southern^[1] 首先报道了一种把 DNA 分子由琼脂糖凝胶中转移到硝化纤维素滤膜上,再用 ³²P 标记的 RNA 探针同膜上特异的 DNA 带杂交的检测方法。此后有人进一步把这种技术用于由聚丙烯酰胺凝胶中转移蛋白质,利用酶联免疫 (EIA) 方法进行检测。由于这种印渍是硝化纤维素膜对核酸或蛋白质的非特异吸附所致,以致存在着吸印效率低和实验周期长两个缺点。1979 年, Towin^[2] 报道了利用电泳技术把蛋白质转移到硝化纤维素膜上的方法。电泳转移后,蛋白质浓缩印渍在膜上,不产生扩散,再利用物理染色以及具有很高灵敏度的 FIA (荧光免疫分析)、EIA、RIA (放射免疫分析) 等方法检测,这样大大提高了印渍效率和缩短了实验周期。由此可见,免疫印渍法包括电泳转移和免疫化学检测两个过程。表 1 概述了这一方法的基本过程。

一、免疫印渍法的基本操作过程

现在已知道被各种类型凝胶分离的蛋白质都可以转移到适当的吸印膜上。电泳后,把凝胶放在转移缓冲液中平衡 30 分钟,然后把凝胶放在预先被转移缓冲液饱和的纱布或滤纸上,再把一张用转移缓冲液浸透的吸印膜放在凝胶的表面,排挤掉吸印膜和凝胶之间的所有气泡,再把第二块用转移缓冲液浸泡的纱布或滤纸放

在吸印膜的表面,用两块坚硬多孔的塑料板夹住胶和吸印膜。(为了更好地保护胶和吸印膜,在用多孔塑料板夹住之前,可用两块薄层海绵夹住胶和吸印膜)然后把这种夹心装置放在电泳槽内,同两电极之间的铂金丝保持平行,接通电泳,电泳几小时。其后即可按照表 1 中的 3—12 步骤操作完成最后的检测。

表 1 蛋白质免疫印渍法及其检测的一般过程

1. 在适当的电泳缓冲液中浸泡吸印膜(硝化纤维素膜)
2. 在电泳转移装置中完成蛋白质的转移
3. 取出吸印膜,空气干燥
4. 在含有非特异性蛋白质的溶液中浸泡吸印膜,完全封闭未结合有特异性蛋白的结合位点
5. 空气干燥封闭后的吸印膜
6. 用适当的缓冲液洗涤吸印膜
7. 加入第一抗体,与被吸印在膜上的特异性蛋白质反应
8. 空气干燥吸印膜
9. 用适当缓冲液洗涤吸印膜
10. 加入标记第二抗体,保证它和第一抗体结合
11. 用适当的缓冲液洗涤吸印膜
12. 用酶底物,或者放射自显影,或者闪烁计数或者荧光反应完成最后检测

二、电泳转移条件及必须注意的几个问题

1. 电源及冷却系统

在电泳转移中电场强度 (V/cm^2) 是蛋白质转移的驱动力量。为得到最佳转移效果应尽量利用高电场强度。但高电场往往伴随着热量

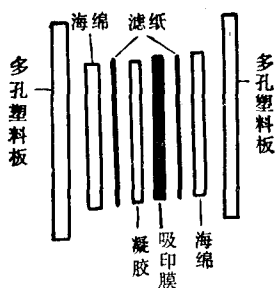


图 1 为电泳转移装置的模式图

的产生,过高的热量又直接影响蛋白质的转移效果,因此所能使用的电场强度实际上是有限的。可见在电泳转移时,尤其在快速转移或转移高分子蛋白质时,有效的冷却是不可少的。

2. 电泳转移的缓冲液

电泳转移缓冲液的选择依赖于凝胶的类型、吸印膜和被转移蛋白质的物理特性。电泳缓冲液的选择见表 2。

低离子强度的缓冲液能增加电场强度,因而可用高电压转移高分子蛋白质而不产生过量

热量,使其能在短时间内得到有效转移。例如用高电场转移肌球蛋白(200,000 道尔顿)3 小时,可使 60% 肌球蛋白从 10% 聚丙烯酰胺凝胶中转移到吸印膜上,而在一般条件下转移率仅为 10%。Tsang^[3]曾报道在高电子强度缓冲液中电泳转移时,能提高低分子量蛋白质对硝化纤维素膜的结合 [0.42 mol/L Tris-HCl, pH 9.2, 20% (V/V) 甲醇, 100V, 1.04A]。这可能是由于缓冲液中的高盐成份加强了蛋白质和硝化纤维素膜之间亲水性相互作用。

通常, Tris-缓冲液(醋酸, 甘氨酸, 硼酸)是最常用的缓冲液,因为这种缓冲液非常稳定,并使之能在高电场中电泳。磷酸缓冲液不常用,因为它会迅速的变质而使 pH 值和离子强度产生显著变化,在使用某些对 pH 值敏感的吸印膜时,(如 Zeta-探针尼龙膜和重氮化纤维素膜)这些变化会影响吸印膜的结合容量和重复性。在使用重氮化纤维素膜时,一般用硼酸钠缓冲液,但它同样有产生高电流和热量的问题。在

表 2 电泳转移缓冲液和电泳条件的选择

凝胶和蛋白质类型	缓冲液	吸印膜	所需电场强度的范围		
			低电场、不冷却长时间或电泳过夜	标准电场, 冷却或不冷却, 电泳 5 小时	高电场, 0—4℃, 电泳 30 分钟到 5 小时
O'Farrel 两相电泳 SDS-蛋白质 (Laemmli 体系)	25mmol/L Tris pH8.3 192mmol/L 甘氨酸 20% (V/V) 甲醇	硝化纤维素滤膜, DEAE-纤维膜	30V 0.1A	60V 0.21A	100V 0.36A 150V 0.55A 225V 0.85A
	25 mmol/L Tris pH8.3 192 mmol/L 甘氨酸 (不含甲醇)	Zeta-探针膜	30V 0.1A	60V 0.21A	100V 0.36A 150V 0.55A 225V 0.85A
	25 mmol/L 磷酸钠 pH 9.2	DBM DPT	15V 0.32A	50V 1.01A	70V 1.86A
	10mmol/L 硼酸钠	DBM DPT	15V 0.19A	50V 0.72A	70V 1.03A 90V 1.45A
琼脂糖凝胶聚丙烯酰胺凝胶 酸性或中性蛋白质	25mmol/L Tris pH8.3 192mmol/L 甘氨酸 (不含甲醇)	硝化纤维素滤膜 Zeta-探针膜 DEAE-纤维膜	30V 0.1A	60V 0.21A	100V 0.36A 150V 0.55A 225V 0.85A
	25 mmol/L 磷酸钠 pH 6.5	DBM DPT	15V 0.32A	40V 1.01A	70V 1.86A
	10mmol/L 硼酸钠 pH 9.2	DBM DPT	15V 0.19A	50V 0.72A	70V 1.03A 90V 1.45A
等电聚焦, 酸性尿素凝胶碱性蛋白质	0.7%醋酸	硝化纤维滤膜 Zeta-探针膜 DBM DPT	30V 0.16A	70V 0.49A	80V 0.83A

对碱性蛋白质进行转移时,经常采用稀的醋酸作电泳缓冲液。

3. 甲醇的使用

甲醇可使凝胶收缩,更重要的是使 SDS-蛋白质复合体中的 SDS 游离出来。甲醇对蛋白质的转移,蛋白质对吸印膜的亲合力以及被膜结合的蛋白质的复性范围有一定影响。甲醇能引起凝胶孔径的缩小,因而限制了大分子蛋白质的转移,也能引起蛋白质在凝胶中的沉淀。用甲醇除掉 SDS-蛋白质复合体中的 SDS 后,蛋白质分子变成中性或带有正电荷,那么具有碱性等电点的蛋白质在 Towbin 缓冲系统中转移时,仅有少数蛋白质分子被转移到吸印膜上。例如溶菌酶(14,000 道尔顿、pH11)用这种缓冲系统转移时,其转移效率比某些比它大得多的蛋白质分子的转移效率还要低。另外甲醇可使硝化纤维素膜对蛋白质的结合容量和亲合力得到加强。在转移没有用 SDS 处理的蛋白质时,如果电泳缓冲液中不加甲醇,虽然加快了蛋白质从凝胶中泳动出来的速度,但很少有蛋白质能结合到硝化纤维素膜上。同样用甲醇除掉 SDS 后,有助于转移到硝化纤维素膜上的蛋白质的洗脱和复性。可见甲醇在蛋白质的电泳转移中是非常重要的。但使用阳离子化尼龙膜时,其缓冲液中不应含有甲醇,代之以 0.1% SDS 可提高高分子量蛋白质的转移效率并克服所担心的蛋白质等电点沉淀问题。

4. 吸印膜的选择

目前,采用的各种吸印膜有硝化纤维素膜、重氮化纤维素膜(DBM、DPT)、阳离子化尼龙膜(Zeta-探针膜)和离子交换纸(DEAE)等。

电泳转移一种未知蛋白质时,首先考虑采用硝化纤维素膜,因为它对蛋白的结合容量非常高($80 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)。特异蛋白质转移到硝化纤维素膜上后,可简单和快速地封闭膜上未被结合的位点,使背景干扰大大地降低,该膜不需预先活化而直接用于电泳转移。但它也有些局限性,如果被转移蛋白质的分子量小于 20,000 道尔顿,在其后的洗涤过程中,小分子量蛋白质很

容易从膜上脱落^[4,5],因而降低了检测灵敏度。另外也不能在含有甲醇的缓冲液中转移经 SDS 变性的大分子量蛋白质;但在转移其他蛋白质时,如果除掉甲醇又会导致蛋白质对硝化纤维素滤膜结合能力的明显下降。结合有蛋白质的硝化纤维素滤膜可以用不同方法作两到三次检测,超过这个限度检测将是无效的。

重氮化纤维素膜在使用前必须活化^[6]。蛋白质分子共价结合到该膜上。在整个检测过程中能确保小分子量蛋白质的有效结合,并能用不同的方法反复检测。蛋白质共价结合这类膜的效率取决于 pH 值、温度和时间。如果在酸性或低温条件下,以及快速转移过程中,则要求膜上的反应基因更稳定。另外,重氮化纤维膜的表面高度组织化,对蛋白质的结合容量一般是较低的($25-30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)。在酶法检测中该膜不宜采用,因为被活化的纤维膜呈黄色,不能同有颜色的酶学反应产物形成鲜明对比。

Zeta-探针膜能有效地结合经 SDS 变性的蛋白质,结合容量高达 $480 \mu\text{g}/\text{cm}^2$,因此可用来检测浓度很低的样品。结合容量不受甲醇影响,所以在转移高分子量蛋白质时常采用 Zeta-探针膜。对小分子量蛋白质同样能有效地结合。在洗涤过程中被结合的蛋白质分子十分稳定,不易脱落。该膜结合容量大,因此须用高浓度的封闭物封闭膜上未结合特异蛋白质的位点。Zeta-探针膜也能进行 EIA 和 RIA。

由于 DEAE-膜用缓冲液浸泡后很容易破碎,因而在分析工作中很少采用。但很多酶转移到该膜上后仍保持很高的活性,这样可直接在膜上进行快速的酶分析。表 3 概括了各种吸印膜的优缺点。

三、各种检测方法

在蛋白质免疫印渍实验中,常用的几种敏感的检测方法有 EIA、FIA、RIA、蛋白 A 或种属特异性的第二抗体检测以及各种物理染色方法,最近又报道了一种免疫金(Immunogold)法。以下简要介绍各种方法的用途、灵敏度和优缺点。

表 3 各种用于蛋白质电泳转移吸印膜的优缺点

吸印膜类型	结合容量 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	优 点	缺 点
硝化纤维素滤膜	30—100	1. 不要求活化 2. 能用物理染色检测蛋白质 3. 能用 RIA、EIA、FIA 等方法检测 4. 具有非常高的检测灵敏度	1. 不能用多种探针进行反复检测
Zeta-探针膜 (阳离子化的尼龙膜)	480	1. 不要求活化 2. 高容量 3. 利用不同探针可检测 10 次之多	1. 要求高浓度的封闭物以消除高背景 2. 不能利用阳离子染料染色蛋白质(如考马斯亮蓝、氨基黑等)
DBM-纤维膜 DPT-纤维膜 (重氮化纤维膜)	15—30	1. 共价结合, 不易脱落 2. 检测后, 能除掉探针	1. 不稳定, 要求预先活化 2. 不能进行 EIA、FIA 或蛋白质染色 3. 仅有少数转移缓冲液能完成这种转移
DEAE-纤维膜	115	1. 在高盐溶液中能回收蛋白质 2. 能染色	1. 易碎, 不易操作

1. EIA 和 RIA

目前, EIA 和 RIA 已得到广泛地运用, 因为这两种方法灵敏度高、结果精确。例如利用高比活的 [^{125}I] 探针检测吸印膜上的免疫球蛋白, 其灵敏度可达 1 微微克水平^[7]。但影响 RIA 检测灵敏度的因素很多, 诸如试剂的纯度、浓度、和被同位素标记的抗体或抗原的特异性比活、反应时间、背景控制以及脉冲信号显示时间。RIA 要求用含有强烈去污剂的洗涤液以便控制非特异性放射信号的背景水平, 但强去污剂又往往把被结合的蛋白质从吸印膜上洗脱下来, 因而减弱了最终的阳性信号。在放射自显影期间, 长时间的曝光会增加阳性信号强度, 但随之也会增加背景的水平, 因此阳性信号和背景干扰之间的比例并没有得到改善。

EIA 比 RIA 具有更多的优点。这种方法快速而敏感, 在整个反应完成后, 两小时内即可以观察结果。用碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶的抗体标记物作检测试剂时, 可检出 10—20 微微克的特异性抗原。EIA 的背景水平的洗涤容易控制, 通常洗涤 10 分钟就足以去掉非特异性反应。在 EIA 中所使用的温和去污剂和洗涤条件也有利于保留膜上被结合的蛋白质, 提高阳性检出率。EIA 还可在同一个吸印点上用不

同的酶或不同的底物作多次检测^[8]。

EIA 中最常用的酶是辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶。辣根过氧化物酶具有经济、稳定和操作方便等优点。常用的底物是 3,3'-二氨基联苯胺(棕色反应产物)、4-氯-1-萘酚(紫色反应产物)、3-氨基-9-乙基咔唑(红色反应产物)。用辣根过氧化物酶检测的灵敏度比碱性磷酸酶低, 这是由于长时间的反应过程使辣根过氧化物酶的底物失效。但后者比前者昂贵。在 EIA 中多数底物对人体有害, 应避免直接接触。

2. 蛋白 A 或种属特异性的第二抗体

从金黄色葡萄球菌中产生的蛋白 A 可作为多种哺乳动物种属 IgG 的检测试剂。它能结合到免疫球蛋白的 Fc 片段上。用蛋白 A 标记的第一抗体直接检测吸印膜上的样品, 可达 5ng 的检测水平, 用它标记的第二抗体间接地检测, 其灵敏度可达 0.05ng。但蛋白 A 不能识别所有类型的 IgG 或所有的 IgG 亚型, 这是影响其检测灵敏度的主要因素。如果吸印膜上蛋白带太多, 选用蛋白 A 作检测试剂是不可取的。这类类似于银染色聚丙烯酰胺凝胶一样, 检测灵敏度太高, 结果往往混乱以致无法区别。

3. 免疫金检测法

最近有人^[9]报道利用抗体和胶体金标记物

检测蛋白质的方法。此方法不但灵敏度高,可检出 0.5ng 的蛋白质,而且反应迅速,不要求底物。仅是将吸印有蛋白质的膜同抗体-胶体金标记物一起保温 30—60 分钟,若膜上有相应抗原的话,即可出现微红—粉红色沉淀带。随后再用银染色,其灵敏度可达 0.1ng 水平。

4. 物理染色检测

一些常用于蛋白质检测的物理染色法同样适用于吸印后的蛋白质检测。如用氨基黑染色吸印有蛋白质的硝化纤维素膜其检测灵敏度可达 30ng。由于考马斯兰 G-250 不易从硝化纤维素膜上脱色,因此不宜作染色检测。ponceau S 和快绿染色的灵敏度稍低于氨基黑,但它们可以在用 EIA 检测后再进行染色。最近 Hamcock^[10]利用印度墨水染色可检测 $\geq 10\text{ng/带}$ 的水平。但在使用 Zeta-探针膜时,均不能利用上述各种染色方法。

四、如何获得最佳检测效果

要在免疫印渍实验获得最佳结果,除了选择最敏感的检测方法外,还应注意以下各种因素,在操作过程中这些因素是容易被人为改变的。

1. 非结合位点的封闭

在蛋白质免疫印渍检测中常用的封闭试剂有:白明胶、牛血清白蛋白、酪蛋白、血红蛋白、卵清蛋白、动物血清、脱脂奶粉和无离子去污剂(Tween-20)等。单独使用 Tween-20 是简单和有效的。用 Tween-20 处理后再用牛血清白蛋白进行封闭效果更好。选择那一种封闭物应根据实验材料和实验方法来确定。例如牛血清白蛋白、动物血清和脱脂奶粉作封闭物时,可能含有引起交叉反应的免疫球蛋白,或者含有可同外源凝素探针伴刀豆球蛋白 A 起反应的物质。用蛋白 A 检测时,必须预先除掉血清的免疫球蛋白,否则血清不能使用。血红蛋白含有内源过氧化物酶活性,所以用辣根过氧化物酶-抗体连接物检测时不能利用血红蛋白作封闭物。白明胶在低温下能自动凝结,在高温下又能封闭特异性蛋白质的吸印点从而遮蔽了抗

原-抗体相互作用,所以一般不用白明胶作封闭物。任何封闭物的过量使用往往是有害的。

2. 抗体和检测系统

为了克服非特异性反应,应尽量采用最大稀释度但仍能产生阳性反应的高纯度抗体。抗体越纯,产生的特异性越高、灵敏度也就越高。双抗体系统具有灵敏度高,操作简单等优点,为许多实验室所喜用。

3. 去污剂的使用和洗涤过程

通常在洗涤吸印膜时其洗涤液中都应加入 0.05% Tween-20,否则会出现非特异性的水合作用。RIA 常用强去污剂,如 NP-40、SDS、Triton X-100、但它们也可能干扰探针和特异蛋白质的结合,应小心操作。

4. 高背景、非特异性及检测假象问题

免疫印渍法和其检测技术是十分灵敏的,所以探针对接膜或对非特异蛋白的非特异吸附是该技术存在的最大问题。探针和蛋白质的非特异性吸附可分为三种类型。

a. 吸印膜上的总体背景太高

如果吸印膜上的非特异性位点未被完全封闭将导致吸印膜上存在很多“光点”,在加入第一或第二抗体时,这些抗体会非特异地吸附在“光点”上,造成高背景的假阳性现象。因此,用适当的封闭物完全封闭吸印膜上的“光点”是极其重要的。此外,封闭物被特异性蛋白污染也能造成这种假阳性现象。

b. 抗体不纯造成的非特异性检测

抗体不纯也会造成蛋白质吸印膜的高背景染色,因此第一抗体在使用前应除掉非免疫球蛋白的其他成份,最好用相应抗原亲和层析柱分离第一抗体。第二抗体可用免疫球蛋白亲和层析柱予以纯化。

c. 由第二抗体造成的“无意义”检测

克服这类高背景染色是很麻烦的。这种非特异染色是由于第二抗体和蛋白吸印点周围其他成份之间的物理吸附作用所造成的。可不加入第一抗体而直接用第二抗体标记物处理可检出这种物理吸附作用。在加入第二抗体前,先把吸印有特异蛋白质的膜在含有牛血清白蛋白

的缓冲液中处理 30 分钟,再用 Tween-20 处理 10 分钟,可有效地消除这类非特异高背景染色。

过量使用第一或第二抗体也能产生高背景染色,应使用能产生阳性结果的最高稀释度的抗体。除了封闭反应和最后显色外,其他各步骤都应使用去污剂。在吸印膜上的所有抗体-抗原反应都应使用载体蛋白(牛血清白蛋白)以便把亲水的相互作用减少到最低程度。

五、蛋白质免疫印渍法在实际中的应用

1. 被吸印蛋白质的复性

很多在含有 SDS 凝胶中转移的蛋白质能重新恢复部分或全部天然结构。这是由于转移缓冲液中的甲醇去掉蛋白质中 SDS 的结果。有三种方法可有效地促使蛋白质复性:1. 电泳转移前在含有尿素的缓冲液中处理 SDS-凝胶,2. 降低温度在没有还原剂的条件下用 SDS 处理蛋白质样品使其部分变性,3. 用尿素或者去污剂直接处理吸印膜本身。

2. 抗原决定部位 (Epitope) 的图谱和结构功能域的分析

在蛋白质结构的研究中抗原决定部位的图谱分析是非常有用的^[11,12]。蛋白质免疫印渍法可用于分析蛋白质抗原上抗体结合位点的线形序列。用化学法或者酶法水解蛋白质分子,用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳或者两相凝胶电泳分离被水解的多肽。电泳后把这些多肽转移到硝化纤维素膜上,用一组针对抗有关蛋白质上不同抗原决定簇的特异性单克隆抗体同膜上被吸印的多肽反应。利用几种不同水解方法制备不同的多肽,同样进行电泳转移和免疫染色,结果得到特殊多肽和抗体对这些多肽结合之间的相互关系的实验数据,可以排列出多肽的序列,并根据蛋白质完整分子的一级结构确定相应抗原决定簇的位置。

3. 肿瘤细胞表面和膜抗原的鉴定

由于肿瘤表面抗原在肿瘤膜表面是极少

的,很难被抽提出来,即使被抽提出来,也会遭抽提条件的破坏,以致利用免疫沉淀技术是很难进行这类检测的。近来,很多研究者已成功利用蛋白质免疫印渍技术鉴定出许多肿瘤细胞的表面抗原。例如 Dubois^[13] 等利用该技术和酶联抗体探针检测出人工培养的人恶性黑色素瘤细胞表面抗原。Colcher^[14] 利用单克隆抗体鉴定出人乳腺癌相关抗原。

4. 其他方面的利用

McLellan^[15] 等利用蛋白质免疫印渍技术把 17 种不同的酶从一块聚丙烯酰胺凝胶板上转移到 DEAE 纤维素膜上,利用它们对底物的催化活性鉴定出这 17 种酶。这一实验证明这种技术能在短时间内完成同功酶的分析。Olmsted 等^[16] 利用蛋白免疫印渍技术从吸印点提纯特异性抗体的方法。把特异抗原转移到硝化纤维素膜,然后把该膜同混杂的抗体反应,使特异抗体和抗原相结合,再用解离剂从吸印点上洗脱下特异抗体。

参 考 文 献

- [1] Southern, E. M.: *J. Mol. Biol.*, 1975, **98**, 503.
- [2] Towin, H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, **76**, 4350.
- [3] Tsang, V. C. W.: *Enzyme mediated immunoassays* (Eds. T. T. Ngo and H. M. Jenhoff), Plenum Publ. Co. NY, 1985.
- [4] Greshoni, J. M.: *Anal. Biochem.*, 1982, **124**, 396.
- [5] Lin, W.: *Anal. Biochem.*, 1983, **128**, 302.
- [6] Symington, J.: In *Two-dimensional Gels Electrophoresis of Proteins: Methods and Applications* (Eds. J. E. Celis and R. Bravo), Academic Press, NY, 1984, 127.
- [7] Towbin, H.: *J. Immunol. Meth.*, 1984, **72**, 313.
- [8] Geysen, J.: *Electrophoresis*, 1984, **5**, 129.
- [9] Hsu, Y. H.: *Anal. Biochem.*, 1984, **142**, 221.
- [10] Rohringer, R.: *Anal. Biochem.*, 1985, **144**, 118.
- [11] Glenney, J. R.: *J. Mol. Biol.*, 1983, **167**, 275.
- [12] Russell, D. W.: *Cell*, 1984, **37**, 577.
- [13] Dubois, D. B.: *J. Immunol. Meth.*, 1983, **63**, 7.
- [14] Colcher, D. L.: *Immunodiagnosics*, Alan R. Liss Inc., NY, 1983, 215.
- [15] McLellan, T.: *Biomemb. Genet.*, 1981, **19**, 648.
- [16] Olmsted, J. b.: *J. Biol. Chem.*, 1981, **256**, 11955.

[本文于 1987 年 7 月 7 日收到]