抗体文库.

d. 据有关文献报道，从两种混合的杂交瘤细胞中获得的 PCR 产物互不干扰，这就是说，从免疫 B 淋巴细胞中获得的单链抗体基因片段完全等同于同一 B 细胞的杂交瘤来源的产物. 这样，细胞内 RT-PCR 技术可以应用于全套抗体库的建立.

参 考 文 献

1 Embleton M J, Gorochov G, Jones P T *et al*. Nucl Acids Res, 1992; **20** (15): 3831

2 Sarantopoulos S, Kao C-Y Y, Den W *et al*. J Immunol, 1994; **152**: 5344

3 Orlandi R, Gussow D H, Jones P T *et al*. Proc Natl Acad Sci USA, 1989; **86** (5): 3833

4 Haase A T, Retzel E F, Staskus K A. Proc Natl Acad Sci USA, 1990; **87** (7): 4971

5 Bagasra O, Hauptman S P, Lischner H W *et al*. N Engl J Med, 1992; **326** (21): 1385

In-Cell Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (In-cell RT-PCR): Amplifying the Reverse Transcripted Immunoglobulin Heavy Chain Gene Fragment within Hybridoma Cells.

Li Changlong, Wang Shu, Jiang Lei, Li Jianzhai (*Biochemistry Laboratory, Beijing Institute of Geriatrics, Ministry of Public Health, Beijing* 100730, China); Zhao Mancang (*Department of Clinical Laboratory Medicine, Shijiazhuang Air Force Hospital, Shijiazhuang* 050081, China).

Abstract General reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) is a complicated process with low efficiency. And high quality mRNA is required and the mRNA is easily destroyed by RNase. The hybridoma cells were fixed with 10% formaldehyde solution in normal saline and permeabilised by 0.5% Nonidet P-40 in water. After the mRNA was reversely transcribed to cDNA and the cDNA was amplified by polymerase chain reaction (PCR), a specific heavy chain variable region gene (VH) of immunoglobulin with length of about 350 bp, being consistent with the product amplified by normal RT-PCR, was obtained. This technique could be applied to prepare specific structure gene fragments, to link and amplify chimeric protein genes and to construct human antibody libraries.

Key words in-cell reverse transcription polymerase chain reaction (in-cell RT-PCR), heavy chain variable region gene (VH), permeabilization

一种转移非特异性蛋白带的染色方法

夏另朝 李金照 陈 燕

(中国科学院生物物理研究所，北京 100101)

摘要 考马斯亮蓝是常用的聚丙烯酰胺凝胶蛋白电泳的染料，利用硝酸纤维素膜 (NCF) 对染料的吸附作用，将低浓度的考马斯亮蓝 (0.025%) 染色液直接对 NCF 上的转移蛋白带进行染色，经实验反复验证. 它是一种较好的 NCF 上转移非特异性蛋白带的染色方法.

关键词 PAG 电泳，硝酸纤维素滤纸 (NCF)，蛋白转移，酶标抗体

收稿日期：1994-08-23，修回日期：1994-10-12

硝酸纤维素滤纸（NCF）上的蛋白条带的显色方法有用印度墨水进行非特异性染色[1]，还有 Torbin 等[2]的对特异性蛋白的印迹法. 前者是用印度墨水作为蛋白质的吸附剂来进行染色，而印迹法是通过酶标抗体与抗原蛋白进行特异性结合而显色，如过氧化物酶标免疫球蛋白 G（HRP-IgG）法. 但如果转移到 NCF 上的蛋白不具备某种抗原性，就不能被显色. 印度墨水对高浓度复合蛋白（如血清蛋白）的显色效果较好，而转移到 NCF 上的 PAG 电泳蛋白带由于蛋白浓度较低，至今没有找到一个很好的显示蛋白带的方法，给蛋白迁移率的计算和样品分子量的测定带来困难. 在实验中，我们发现考马斯亮蓝能够对 NCF 上的蛋白进行染色，只是浓度与通常染聚丙烯酰胺电泳蛋白带的浓度不一样，这种方法操作简单，对 NCF 上的微量单种蛋白的染色效果较好，现将实验方法和结果介绍如下：

1 材料与染色

将标准分子量蛋白（磷酸化酶 B；牛血清白蛋白；肌动蛋白；碳酸酐酶；烟草花叶病毒外壳蛋白）和样品蛋白（如金色葡萄球菌蛋白 A 与胰岛素原融合基因的大肠杆菌表达产物）在 14%的聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳. 电泳后迅速剥离凝胶，用电转移的方法将凝胶上的蛋白转移到 NCF 上，蛋白转移的方向是从负极到正极. 转移后，将标准蛋白和样品蛋白分别所在的 NCF 用刀片切开，样品蛋白用酶标法进行显色，标准蛋白直接用考马斯亮蓝 G-250 染色. 染液成分为：0.025%考马斯亮蓝、4.0% CH_3OH、1.0% CH_3COOH，用双蒸水配制. 将凉干后的含有标准蛋白的 NCF 直接放入考马斯亮蓝染液中，室温小心摇动，边摇边看，5～10 min 后，当 NCF 渐渐变蓝，而且隐约可以看见蛋白带时，立即转入脱色液中脱色. 脱色液成分为：40% CH_3OH、10% CH_3COOH，用双蒸水配制. 脱色 1～2 h，直到蛋白带清晰可见为止. 凉干，保存.

2 结果与讨论

如图 1 所示，*a* 列是标准蛋白经考马斯亮蓝 G-250 染色后的结果，*b* 列为样品蛋白经酶标法显色的结果，染色效果比较好. 在计算未知蛋白分子量时，将染色的含有标准分子量蛋白的 NCF 和显色的含有未知分子量的蛋白的 NCF 按刀片切开位置拼接起来对照分析，就能计算出未知分子量蛋白的分子量，方法简单. 经上述染色液和甲醇脱色液处理的 NCF 不收缩、不变形，结果准确，较真实地反映了未知蛋白的分子量，而且染色带不褪色，便于长期保存. 脱色液可以用乙醇代替甲醇，只是脱色时间稍长，但可以解决甲醇的毒性问题. 从重复实验所得结果来看，该方法稳定可靠. 我们认为考马斯亮蓝直接染色方法较好地解决了硝酸纤维素滤纸（NCF）上的非特异性蛋白的显示问题.

图 1 分子量标准蛋白和样品蛋白的蛋白质印迹图

a 列是分子量标准蛋白的考马斯亮蓝染色，*b* 列为两个样品蛋白的酶标法显色.

参 考 文 献

1 赵永芳，朱 勤. 生物化学与生物物理进展，1986；(5)：75

2 Torbin H, Staehelin T, Gordon J. Proc Natl Acad Sci USA, 1979; **76**: 4350

（下转封三，Continued on inside back cover）

(上接第 383 页, Continued from page 383)

A Method of Staining Non-Specific Protein Bands of Western Blot. Xia Lingchao, Li Jinzhao, Chen Yan (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing* 100101, China).

Abstract Coomassie blue is a routine dye of polyacrylamide gel electrophoresis. With the adsorption of dye to nitrocellular filter, substantively stain the protein bands on NCF with low concentration coomassie blue (0.025%) solution, through repeated tests, it proves to be an available method for staining non-specific protein bands of Western blot on NCF.

Key words PAG electrophoresis, nitrocellular filter (NCF), Western blot, enzyme-labelled antibody