

介绍一种新的电泳技术——蛋白质的硝酸纤维素纸转移电泳

朱运松 顾银良 朱正美 顾天爵

(上海第一医学院基础部生化教研室)

硝酸纤维素纸转移电泳首先应用于 DNA 片段的研究中,其原理是把琼脂糖凝胶电泳后分离的 DNA 各片段,再一次,转移到硝酸纤维素纸上,然后在纸片上进行 DNA-RNA 杂交等实验。由于 Southern^[1] 最先报道,转移过程又类似于把墨迹吸到吸墨纸上,故称 Southern Blot。此后 Alwine 等^[2] 又把它应用到 RNA 的研究上,称为 Northern Blot。Towbin 等^[3-5] 又扩展到蛋白质研究中,取名为 Western Blot。最近 Reinhart^[6] 等将等电聚焦电泳后的蛋白质转移到硝酸纤维素纸,称为 Eastern Blot。这种方法为蛋白质检测提供了方便,也扩大了凝胶电泳技术的应用范围。本文综合国外的报道,并结合

我国条件,介绍此项新电泳技术。

一、试剂与材料

1.试剂 丙烯酰胺、Tris、甲撑双丙烯酰胺、SDS (Emerk)、O-Dianisidine (BDH)、硝酸纤维素纸 (0.22 μ Millipore Co. 和上海医工院),驴抗兔 IgG 血清 (本院红旗药厂),辣根过氧化物酶 R_z = 3 (上海东风试剂厂),辣根过氧化物酶标驴抗兔 IgG 抗体、用过碘酸盐氧化法^[7] 自制,其他化学试剂都是分析纯。

凝胶电泳缓冲溶液 上槽液: 2.470 克硼酸、4.920 克 Tris、1 克 SDS,加水至 1,000 毫升。下槽液: 63.90 克 Tris 用 2NHCl 调至 pH9.18,

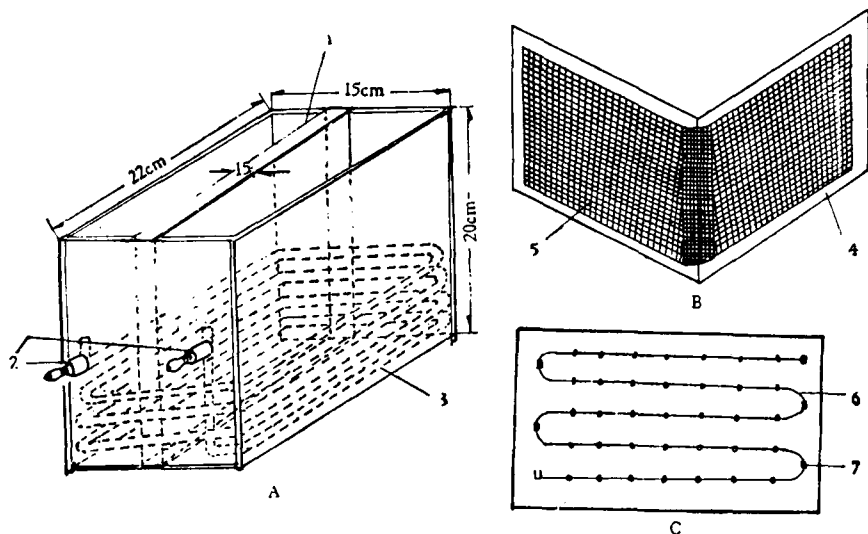


图 1 自制转移电泳槽

- A. 有机玻璃电泳槽, B. 塑料框架, C. 中隔板。
1. 中隔板, 2. 冷却水进出水口, 3. 冷却管, 4. 有机玻璃框, 5. 塑料网,
6. 白金电极丝, 7. 直径 3 mm 小孔。

加水至 1000 毫升。

转移电泳缓冲液 25mM Tris、191mM 甘氨酸、20% 乙醇或甲醇之水溶液。

过氧化物酶底物液 25 毫克联苯茴香胺 (O-Dianisidine) 先溶于 10 毫升甲醇,加硝酸纤维素纸洗涤液 (0.05 M 磷酸缓冲液 pH 7.4, 含 0.15 M NaCl, 0.3% Tween-20) 至 100 毫升, 再加 100 微升 3% H₂O₂。临用前配制。

2. 电泳装置

(1) 稳压稳流电源 Pharmacia EPS 500/400 型

(2) 电泳槽

(a) 垂直平板电泳槽用于聚丙烯酰胺凝胶电泳。

(b) 转移电泳用有机玻璃自制的电泳槽,如图 1。可接一循环泵使阴极、阳极槽缓冲液交流,保持缓冲液温度在 4—6°C。

3. 微型振荡器 MM-1 型,江苏省南通县分析仪器厂。

二、方 法

1. 凝胶电泳 根据欧阳启楣等^[8]方法,蛋白质样品先经板状聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,也可加入尿素或 SDS。

2. 转移电泳

(1) 将与凝胶大小相同的硝酸纤维素纸浸入电极缓冲液约半小时。

(2) 取二张略大于凝胶板的滤纸、浸入已盛有 300 毫升电极缓冲液的方盘中、把电泳后的凝胶置于滤纸上,排尽滤纸与凝胶之间的气泡,把塑料框架平放桌上,上面垫一块略大一些的海绵,然后连同滤纸将凝胶板置于海绵上,凝胶向上。

(3) 在凝胶上面加 2—3 毫升电极缓冲液,把已润湿的硝酸纤维素纸覆盖在凝胶上。注意硝酸纤维素纸一经与凝胶接触,就不准移动,凝胶与纸之间不能有气泡。

(4) 硝酸纤维素纸上面覆盖二层润湿滤纸;驱除气泡后,再覆盖一层海绵垫;最后把塑料框架(图 1B)合上成为一多层“夹心饼”,如图 2。

有硝酸纤维素的一面要标上记号。

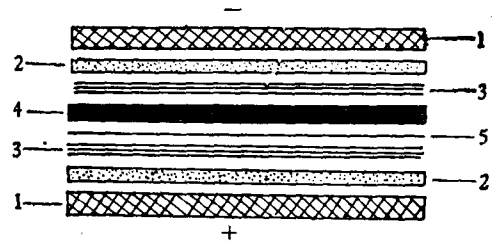


图 2 转移电泳操作示意图

1. 塑料框架 2. 海绵垫 3. 滤纸 4. 凝胶 5. 硝酸纤维素

(5) 把塑料框架夹紧后,插入转移电泳槽,有硝酸纤维素纸的一边朝正极,槽中加入电极缓冲液。电泳条件,视被转移蛋白质的性质而定,一般为 36—50 V,电泳 5—7 小时。

(6) 转移电泳结束后,取下硝酸纤维素纸,把接触凝胶的一面标上记号,用洗涤液(约 300 毫升)在微型振荡器上振荡洗涤 3 次,每次 10 分钟。

3. 蛋白质的检测

(1) 印度墨水(India Ink)染色 染色液为 100 毫升洗涤液与 200 微升印度墨水混合配成。将硝酸纤维素纸浸入染色液、放于微型振荡器上,在室温振荡 3 小时。取出用蒸馏水漂洗数次。

(2) 免疫酶标染色 取一塑料盘加入适当稀释 (20—200 倍) 的抗血清(第一抗体);将洗涤过的硝酸纤维素纸置于盘中,在 37°C 保温 2 小时。然后用上述洗涤液洗,每次 10 分钟,共三次。加入适当稀释度 (1:1000—1:4000) 辣根过氧化物酶标抗体(第二抗体)。在室温保温二小时,再用上述洗涤液洗,每次 10 分钟、共三次。加入过氧化物酶底物液,室温放置 5—15 分钟显色,最后用蒸馏水洗涤,以终止反应。如用直接酶标免疫法,则省去第一抗体保温的操作。

三、结 果

1. 转移后蛋白质的检测 图 3 为人肝细胞膜的蛋白电泳图谱。由于印度墨水染色灵敏度高,因此条带数目及清晰度胜过未转移的凝胶图谱(用考马斯兰染色)。

图4是兔 γ -球蛋白粗制品的转移电泳、用辣根过氧化物酶标记的抗兔IgG抗体进行酶标免疫法染色、样品中蛋白质含量只有0.5微克而图像还是十分清楚。

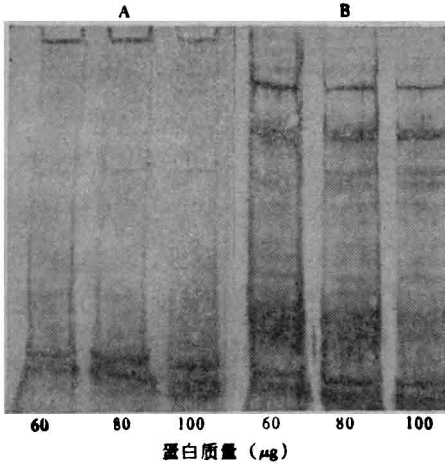


图3 肝细胞膜蛋白的转移电泳

A. 转移前的 PAGE 凝胶图谱(考马斯亮兰染色)
 B. 转移到硝酸纤维素上图谱(印度墨水染色)
 样品肝细胞膜悬液,用 0.01M Tris-HCl pH 7.4 缓冲液稀释成 8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (60 μl), 加样品处理液(6% SDS、5M 尿素、0.01M Tris-HCl pH 7.4 缓冲液) 20 μl 、100 $^{\circ}\text{C}$ 加热 3 分钟,然后加 10 μl 甘油溴酚兰液。在 4-6 $^{\circ}\text{C}$ 、36 V 转移电泳 7 小时。

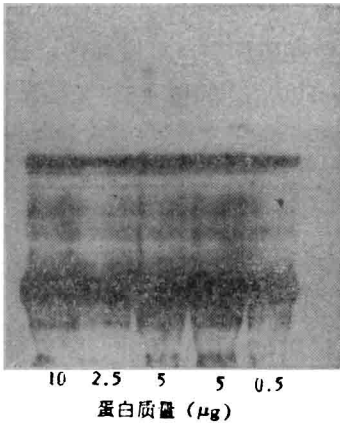


图4 兔 γ -球蛋白转移电泳酶标免疫染色

SDS-3.4-20% 聚丙烯梯度凝胶电泳条件同前,转移电泳 50 V、4 小时、4-6 $^{\circ}\text{C}$ 。

2. 转移电泳时间与转移效率关系 血清蛋白实验结果表明,转移时间为 3 小时,效果极不理想,仅有小分子蛋白质部分转移;经 7 小时和 12 小时转移后,电泳谱区带清晰,与未转移前凝胶银染色一致,残留在凝胶上的蛋白量已

很少。

3. 国产与进口硝酸纤维纸的比较 几乎得到一样清晰的区带。国产纸价廉、易得,便于推广。

四、讨论

尿素或 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳经转移电泳后,仍保持其高分辨率,凝胶中的蛋白质区带能精确地复制,近于定量地转移到硝酸纤维素上^[2,3]。Towbin 等^[3]用同位素标记核糖体蛋白,经转移后,回收率达 79-125%。本实验得到类似的结果。但是,对于转移电泳的条件和转移时间,文献报道尚不一致^[3,9,12]。事实上蛋白质的转移速率取决于蛋白质的分子量和性质,因此,转移时间的长短与转移电泳的电压所分离蛋白质的性质和分子量等因素均有关系。

转移电泳中蛋白质样品的用量取决于检测方法的灵敏度。用印度墨水染色、血清蛋白质检出量大于 20 微克,一般用 40 微克左右的样品,可得到较满意的结果;若用更灵敏的检测方法,如酶标免疫法可检测到毫微克的蛋白量^[3]。

利用蛋白质生物活性来显色的方法,必须注意处理样品的条件。文献记载加热温度不宜超过 65 $^{\circ}\text{C}$,时间不超过 15 分钟;如在 100 $^{\circ}\text{C}$ 加热,时间就要缩短些。SDS 的最终浓度要低于 2.5%。加巯基乙醇时更要慎重,不然可能使蛋白质分子生物活性难于恢复。

转移电泳用的纸除硝酸纤维纸外,还有重氮纸^[5],后者与蛋白质共价结合,结合牢固,结合量大,但操作较复杂。前者以非共价键吸附蛋白质,对 RNA 及某些蛋白质不吸附^[3],但较方便,背景值较低^[10],且国内有商品供应,效果达到国外进口的纸。

转移电泳的优点在于可将蛋白质吸附在硝酸纤维素上而为固定相。这样就带来许多有利条件:(1)可在纸上进行放射自显影和其他染色,省去了在凝胶上染色和制成干片的许多麻烦,且便于保存,既省时,又方便。(2)易除去 SDS、巯基乙醇等干扰物质,使蛋白质恢复天然构象和生物活性,这样就可使在凝胶上很难

进行的同位素标记抗体和酶标抗体法能在纸上实现,灵敏地检测出极微量的抗原^[3]。通过转移电泳技术,把聚丙烯酰胺凝胶电泳高分辨率和放射性标记和酶标免疫法的高灵敏度结合起来,产生了一种新的酶标免疫转移电泳,这种方法已用于检测血吸虫病人血清中的极微量抗体^[10,11]等。使转移电泳技术可能成为临床诊断的有力工具。事实上,转移电泳可应用于一切依赖于形成蛋白质-配体复合物的分析检测。

参 考 文 献

[1] Southern, E. M.: *J. Mol. Biol.*; **98**, 503, 1975.
 [2] Alwine, J. C. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **74**, 53, 1977.

[3] Towbin, H. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **76**, 4350, 1979.
 [4] Brain, Bowen, et al.: *Nucleic Acid Res.*, **8**, 1, 1980.
 [5] Sleweg, E. J. et al.: *Nucleic Acid Res.*, **8**, 299, 1980.
 [6] Reinhart, M. P. et al.: *Anal. Biochem.*, **123**, 229, 1982.
 [7] 余贺等:《临床免疫技术》,上海科技出版社,206,1982。
 [8] 欧阳启耀等:《上海第一医学院学报》, **9**, 433, 1982。
 [9] Burnette, W. N.: *Anal. Biochem.*, **112**, 195, 1981.
 [10] Victor C. W. Tsang, 未发表资料。
 [11] 傅奇,朱运松等:《中华医学杂志》, **64**(2), 75, 1984。
 [12] Bittner, M. et al.: *Anal. Biochem.*, **102**, 459, 1980.

[本文于1983年9月22日收到]

测定酶活性的电化学方法及其影响因素

范培昌 单志芳 郭志勤

(华东师范大学生物系,上海)

作者曾用固定化细胞技术分离了人红细胞膜表面蛋白质^[1]。为了能快速、准确、自动连续地测定固定化红细胞膜中乙酰胆碱酯酶(AchE)等各酶的活性,设计组装了一架酶活性电化学测定装置。本文报道试用该装置作测定胆碱酯酶(ChE)纯品的实验结果。

早在1962年, Kramer 等人就报道了一种半微量测定 AchE, ChE, 以及各种硫代胆碱酯的电化学方法^[2]。以后又将该仪器应用于测定高毒性有机磷化物^[3], 葡萄糖氧化酶^[4]、黄嘌呤氧化酶^[5], 以及过氧化物酶与过氧化氢酶类^[6]。并设计了能酶反应连续分析的装置^[7]。在此基础上我们设计组装了酶活性电化学测定装置。

材 料 与 方 法

1. 材料 ChE 系 Psuodo 生产的冻干品, 含量为4单位/毫克。硫代乙酰胆碱碘化物(AcSChI)系上海试剂一厂产品, 纯度98%。其它试剂均用8兆无离子水配制。

2. 仪器设计与组装 用实验室现有设备按图1设计组装而成。整机外貌如图2。需要说明的是:(1)所有电子元件组装在一起,用有机玻璃制成外壳以防触电(即图2之11)。此部分除附有电极、电源、电压表和记录仪的接线柱,以及微安表外,尚附有分别调节恒电流与记录笔所处位置的可变电阻 W_1 和 W_2 。(2)附有

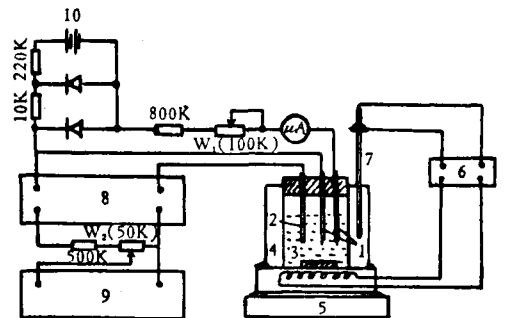


图1 测定酶活性的电化学装置线路设计及组装示意图

1. 铂对电极 2. 饱和甘汞电极 3. 反应池 4. 恒温浴外套
 5. 681型磁力加热搅拌器 6. 晶体管继电器 7. 接触温度计
 8. p1-8型直流数字电压表 9. 笔录式记录仪 10. 直流稳压电源(由DY-1型电泳仪之电源替代,输出135V)。