

经 验 交 流

一种快速鉴定硝酸纤维素纸上蛋白质的简便方法

赵永芳 朱 勤

(武汉大学生物系)

自从 Southern 核酸印迹法^[1]和 Towbin 等蛋白质印迹法^[2]报道以来,因为它灵敏度高、特异性强、试剂用量少、结果容易保存,得到了广泛的应用^[3-5]。蛋白质(包括脂多糖和膜蛋白抗原等)印迹法一般是样品先通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(或其它凝胶电泳)进行分离,随后将胶条上蛋白质借助电泳或吸附方法转移到硝酸纤维素(NC)纸上。NC 纸上的特异性蛋白质用专一试剂即可检测。这一过程顺利完成至少需 48 小时。实践表明,用此常规印迹法程序摸索欲检测的特殊蛋白质的适宜试验条件(如确定恰当蛋白质抗原或 I 抗、II 抗的浓度;选择合适的染色时间;如何消除背景颜色等),既费材料,又费时间。为此笔者参照文献[6],设计了一种快速检测 NC 纸上膜抗原蛋白质的省材料、省时间、效果好的简便方法。现将采用该法摸索印度墨水法、I 抗法和 II 抗法检测 NC 纸上蛋白质的某些影响因子的试验结果介绍如下:

材 料 和 方 法

材料 辣根过氧化物酶标记的兔抗人 IgG 抗体(HRP-IgG)。人表皮细胞和异常人血清由武汉市一医院皮肤科中心实验室提供。

HRP-IgG 用 PBS-T (含 0.15M NaCl、0.02% NaN₃ 和 0.3% 吐温 20 的 0.025M 磷酸盐缓冲液, pH7.4) 溶液稀释。病人血清用 PBS-BSA (含 0.15M NaCl、0.02% NaN₃、3% 牛血清白蛋白和 0.05% 吐温 20 的 0.025M 磷酸盐缓冲液,在沸水中煮 2 分钟,使 BSA 变性)溶

液稀释。

联苯茴香胺染色液 3ml 联苯茴香胺甲醇溶液(50mg 联苯茴香胺溶于 10ml 甲醇中,隔天使用)加 27ml PBS-T 溶液和 35 μ l 3% 双氧水(用前配制)。

硝酸纤维素(NC)纸为法国产品。

方法 1. 点样: 取大小适中的 NC 纸(如 0.5 × 4cm)在 PBS 溶液中浸泡 30 分钟后,放在滤纸上,65℃ 烘干。转至玻板上,用毛细管点 1 μ l 样品(直径约 2mm)。随后又放在滤纸上,65℃ 烘 5 分钟,取出置 4℃ 冰箱冷却 15 分钟。

2. 样点的检测: (1)印度墨水染色法: 参照 Hancock^[7] 方法。将点上样品的 NC 纸在 PBS-T 溶液中浸泡 15 分钟(37℃),转入每毫升 PBS-T 溶液含 0.15 μ l 印度墨水的溶液中,置摇床(20℃)上振荡 4—6 小时,待样点清晰后,取出 NC 纸用蒸馏水冲洗几次,转入滤纸上烘干即可长期保存。(2)Elisa 染色法: I. 直接法(I 抗法): 点入血清样品的 NC 纸置 50ml PBS-T 溶液漂洗 15 分钟,转入 2.5ml 稀释倍数不同的 HRP-IgG 溶液中,在摇床(20℃)上反应一定时间,移至 50ml PBS 溶液中(37℃),手摇振荡漂洗 5 分钟后,改用 PBS-T 溶液(37℃)手摇振荡漂洗二次(每次 50ml, 5 分钟)。此后,将其放进 20ml 染色液中(8—10℃)约 5 分钟,把显出棕色斑点的 NC 纸立即取出,用蒸馏水冲洗干净,置 4℃ 水溶液保存; II. 间接法(II 抗法): 点入表皮细胞膜糖蛋白样品(制备方法另文报道)的 NC 纸泡在 PBS-BSA 溶

液(37℃)振荡 15 分钟后,转入 2.5ml 稀释倍数不同的病人血清溶液中,摇床(20℃)振荡一定时间后,用 PBS 和 PBS-T 溶液分别漂洗,置稀释 50 倍的 HRP-IgG 溶液中,以下操作同直接法。

使用本法的适宜条件

一、印度墨水染色鉴定 NC 纸上蛋白质的适宜条件

试验表明,印度墨水对 NC 纸上蛋白质样品染色效果受墨水浓度、染色的时间和温度等影响。当墨水浓度为 $0.15\mu\text{l/ml}$ 时,置摇床上 20°C 振荡 4 小时,即可显出印迹谱带或样点(图 1)。如果浓度 $<0.15\mu\text{l/ml}$,或温度 $<20^\circ\text{C}$ 时,显出颜色需要 4 小时以上,而且有可能显不出斑点,或者显出的斑点模糊。如果浓度 $>0.15\mu\text{l/ml}$ (即 $1\mu\text{l/ml}$),虽可以显出色斑,但背景较深。染色过程如不振荡或振荡过慢时,会有部分微小染料颗粒被吸附在 NC 纸上,使背景产生“鬼脸”,不利于提高谱带分辨率。如温度过高(65°C),染色时间可以缩短,但染色很不均匀。另外为提高染色效果,染色墨水宜用时现配。本试验所用的印度墨水浓度与文献报道不完全相同,这或许是由于笔者用的墨水存放时间过长。

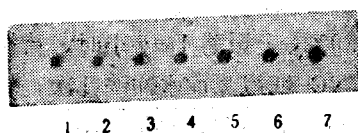


图 1 印度墨水对 NC 纸上血清样品的染色图谱

点样量: $1\mu\text{l}$; 样品浓度: 1.1/70; 2.1/60; 3.1/50; 4.1/40; 5.1/30; 6.1/20; 7.1/10。

二、直接染色法鉴定 NC 上蛋白质抗原的适宜条件

试验表明,适宜的 HRP-IgG 浓度(稀释 50 倍)下, 20°C , 在染色液中反应 15、30 和 45 分钟,都可显出样点(图 2)。从图 2 看出,以反应 45 分钟样点最清晰。若延长到 1 小时乃至 2 小时,颜色深度基本无变化。当蛋白质抗原样品点在烘干的 NC 纸上,不经过 65°C 短时间烘

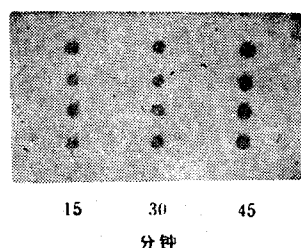


图 2 HRP-IgG 与抗原 IgG 反应时间的比较

样品浓度: 自上而下分别为 1/40, 1/80, 1/160, 1/320

干时,样点会扩散,灵敏度降低,背景不清晰。这可能是不经烘干,样品在 NC 纸上因吸附不牢而扩散造成的。按笔者的短时间烘干、低温度放 15 分钟的程序进行,染色效果既好,又不影响抗原与抗体的结合力。然而对用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离的抗原,又经 12 小时电泳转移到 NC 纸上后,因吸附牢固,所以染色前烘与不烘结果一样。背景颜色的消除有助于提高分辨力。一般用 PBS-T 溶液来消除,但也可以用 PBS-PSA 溶液。前者价廉,后者降低样品的灵敏度。所以直接染色法使用前者较多。

三、间接染色法鉴定 NC 纸上膜抗原的适宜条件

试验表明,稀释 50 倍的血清溶液, 20°C 反应 3 小时,染色效果最佳。参照文献[6],对背景颜色是采用变性的 PBS-PSA 溶液处理,效果较好。若此溶液不变性时,则背景颜色加深。这可能是因为国产 PSA 中有某种物质与 HRP-IgG 反应引起的。PBS-PSA 灭活时间超过 3 分钟则变得粘稠,流动性差。这对 NC 纸处理和膜抗原与抗体的反应是不利的。

四、本法的可靠性

按照上述方法,能在极短时间内摸索出常规印迹法的适宜条件。采用这些适宜条件进行印迹法试验,结果基本上是满意的。例如为了证明膜抗原是否具有 IgG 抗体,曾两次提取膜抗原(浓度不同)点样于 NC 纸上,并以 1/320 血清为对照,病人血清为 I 抗, HRP-IgG 为 II 抗进行试验,其结果较好(图 3)。从图 3b 看出在 10^8 细胞膜抗原抽提液(上端样点)中似乎含

(下转第 42 页)

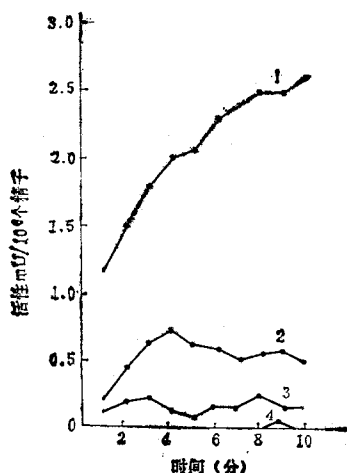


图 1

1. 人精子顶体酶活性 ($n = 10$),
PVP-棉酚混合液中顶体酶活性;
2. 棉酚浓度 6mg/ml 时;
3. 棉酚浓度 12mg/ml 时;
4. 棉酚浓度 25mg/ml 时。

使精子在女性生殖道内活动加强,并迅速与卵细胞融合,当顶体酶的活性被抑制时,受精过程即不可能。现已有不少报道旨在寻找顶体酶抑制剂,以达到控制生育的目的^[4]。

棉酚能迅速使精子制动,已被推荐可作为

一个阴道避孕药。据报道 PVP-棉酚体外使精子制动的有效浓度是 40mg/ml^[5],而本实验表明,PVP-棉酚浓度为 25mg/ml 时,顶体酶活性全部被抑制,因此在试用 PVP-棉酚作为阴道避孕药时,似应参照抑制顶体酶活性的浓度为标准,既可减少用药量,又能保证达到避孕效果。

参 考 文 献

- [1] 周元聪,王守真:《生理科学进展》,13(3),252,1982。
- [2] 薛社普等:《男用节育药棉酚的实验研究》(第一版),人民卫生出版社,北京, p 183, 1983。
- [3] Polakaski, K. L. and Zaneveld, L. J. O.: *Human Reproductive Medicine*, Vol. 1: *Techniques of Human Andrology* (the first edition, E. S. E. Hafez ed), Elsevier/North-Holland, Biomedical press, P280, 1977。
- [4] 张燕林等:《生殖与避孕》,4(3),9,1984。
- [5] Waller, D. P. et al.: *Contraception*, 22(2), P183, 1980。
- [6] Tobias, P. S. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 74, 434, 1977。
- [7] Schill, W. B. et al.: *Fertil. & Steril.*, 25(8), 708, 1974。
- [8] Bhattacharyya, A. K. et al.: *Fertil. & Steril.*, 30(1), 70, 1978。

[本文于 1986 年 2 月 7 日收到]

(上接第76页)

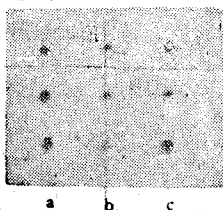


图 3 膜抗原检测图示

- a 膜抗原 (10^6 细胞抽提液), I 抗为病人血清, II 抗为 HRP-IgG。
- b 膜抗原 [10^6 (上端) 和 10^6 (下端) 细胞抽提液] 直接与 HRP-IgG 反应
- c 对照, 以血清为样品直接与 HRP-IgG 反应

有微量的免疫球蛋白,而在 10^6 细胞膜抗原抽提液(下端样点)中则很难测出。但是当把膜抗原经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,再用电泳转移到 NC 纸上按正常印迹程序与 HRP-IgG 反应时,结果并未出现谱带。然而与病人

血清反应后,再与 HRP-IgG 反应时,则可清晰地显出 7—8 条谱带。这表明血清中含有抗膜抗原的多种抗体组份(详见另文)。

参 考 文 献

- [1] Southern, E. M.: *J. Mol. Biol.*, 98: 503—517 1975。
- [2] Towbin, H. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 76: 4350—4354, 1979。
- [3] Gershoni, J. M.: *Anal. Biochem.*, 131: 1—15 1983。
- [4] Bradbury, W. C.: *Ibid.*, 137: 129—133 1984。
- [5] Reid, J. H.: *FEMS Microbiology letters.*, 30: 289—293, 1985。
- [6] MyLien Dao: *J. Immunol. Methods.*, 82: 225—231 1985。
- [7] Hancock, K.: *Anal. Biochem.*, 133: 157—162, 1983。

[本文于 1986 年 1 月 31 日收到]