

国产混合纤维素膜为载体的点免疫结合试验

蒋作君 沈一平

(南京医学院)

提 要

应用国产混合纤维素膜为载体代替进口硝酸纤维素膜、以 Tween-20 作阻断剂代替昂贵的牛血清白蛋白进行点免疫结合试验。结果表明,国产混合纤维素膜可以保持点免疫结合试验固有的优点,且价廉、易买到; Tween-20 阻断未出现明显非特异性背景着色。这些改进有利于点免疫结合试验技术的推广。

点免疫结合试验 (Dot Immunobinding Assay)^[1] 又称 Dot-ELISA^[2] 或 AST (Antigen Spot Test)^[3], 它是近几年发展起来的一项免疫学检测新技术。迄今国内外文献所报道的点免疫结合试验均以硝酸纤维素膜(NC)为载体。由于国内生产 NC 的厂家极少,有的尚处于试制阶段,而进口 NC 价格昂贵,且预订后不能及时到货,故限制了这项新技术在国内的推广。我们试用国产混合纤维素膜为载体进行点免疫结合试验,取得了较为满意的结果。现将实验报告如下。

一、材料和方法

1. 混合纤维素膜(MC) 孔径 $0.22\mu\text{m}$, 系上海医学工业研究院产品。

2. 卫氏并殖吸虫囊蚴抗原(M-PB-Ag)
本实验室自制,浓度为 $500\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

3. 血清

(1) 感染卫氏并殖吸虫的大鼠血清(ris)
纯系 Wistar 大鼠经腹腔感染卫氏并殖吸虫囊蚴(100个囊蚴/鼠)后两个月,行鼠心脏穿刺采血分离血清。

(2) 卫氏并殖吸虫囊蚴抗原免疫的家兔血清(MIRS) 将 M-PB-Ag 以淋巴结内注射法免疫纯系新西兰家兔获免疫血清^[4]。

(3) 正常家兔血清(NRS)和正常大鼠血清(NrS) 本实验室自制。

4. 辣根过氧化物酶标记的金黄色葡萄球菌 A 蛋白(简称 A 蛋白) 工作浓度为 1:20, 系上海生物制品研究所产品。

5. 底物系统 参照王建一等法^[5]配制。

6. 几种缓冲液

(1) pH 7.2、 $0.01\text{mol}/\text{L}$ 磷酸盐缓冲液 (PBS) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.87g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.61g, NaCl 40.83g, 加蒸馏水至 1,500ml。

(2) pH7.4 PBS-Tween 20 KH_2PO_4 0.544g, Na_2HPO_4 2.27g, NaCl 16.72g, Tween 20 0.5ml, 加蒸馏水至 1,000ml。

(3) 三羟甲基氨基甲烷缓冲液 (TBS, pH 7.5) $1\text{mol}/\text{L}$ Tris 2.8ml, $1\text{mol}/\text{L}$ HCl 17.0ml, NaCl 7.5g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.02g, 加蒸馏水至 1,000ml。

7. 点免疫结合试验程序

(1) 将 MC 裁成所需要的尺寸,用铅笔轻轻画点,各点距离同酶标反应板孔距,亦可稍大些。

(2) 将 MC 浸在 PBS 中 30 分钟,取出后用滤纸压干。

(3) 用特制毛细滴管点 M-PB-Ag, 每点约 $2\mu\text{l}$, 蛋白含量为 $1\mu\text{g}$ 。

(4) 将 MC 置于 4°C 冰箱 5 分钟,再用 TBS 洗涤 5 分钟。

(5) 用阻断液(封闭液) PBS-Tween 20 温

育 MC 15 分钟, 室温, 轻微摇荡。取出后用滤纸压干。

(6) 将 MC 置于含水的培养皿中, MC 下面垫一块泡沫塑料。按设计每点分别加待检血清、对照血清及 PBS $2\mu\text{l}$ 。将培养皿放入 4°C 冰箱 15 分钟。

(7) 用 PBS 洗涤 MC 4 次, 每次 3 分钟, 轻微摇荡。取出后用滤纸压干。

(8) 每点加 A 蛋白液 $2\mu\text{l}$, 室温, 40 分钟。

(9) 洗涤 MC, 见第 7 步。

(10) 每点加底物液 $50\mu\text{l}$ 。1 分钟后用蒸馏水洗涤 MC 终止反应。MC 经滤纸压干后, 即可摄影或暗处保存。

二、结果和讨论

点免疫结合试验结果表明, 待检血清 MIRS 和 ris 均呈阳性反应(棕黄色点), 对照血清 NRS 和 NrS 均为阴性。对照 PBS 有两点出现轻微的背景干扰, 可能系阻断不匀致使微量 A 蛋白非特异吸附于 MC 所致(图)。在这以后的实验中, 我们延长 PBS-Tween 20 阻断时间至 30 分钟并避免气泡(Tween 20 易产生气泡)对 MC 的影响, 消除了上述背景干扰。

在本实验中, 每点用的抗原仅 $1\mu\text{g}$, 所用的

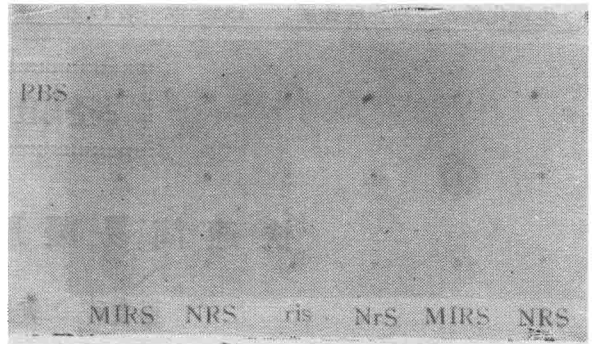


图 国产 MC 为载体的点免疫结合试验

血清及 A 蛋白均为 $2\mu\text{l}$ 。阻断液用 PBS-Tween 20, 未用昂贵的牛血清白蛋白或小牛血清。整个实验在 3 小时内完成。值得提出的是, 实验过程中宜始终用镊子操作, 裁剪 MC 时宜带乳胶手套, 避免用手直接接触及 MC。

此文蒙本院赵慰先教授审阅, 谨致谢忱。

参 考 文 献

- [1] Hawkes, R et al.: *Anal. Biochem.*, 1982, **119**, 142.
- [2] Kumar, S. et al.: *J. Immunol. Methods*, 1985 **83**, 125.
- [3] Herbrink, P. et al.: *J. Immunol. Methods*, 1982, **48**, 293.
- [4] 蒋作君: 《上海免疫学杂志》, 1987, **7**(3), 154.
- [5] 王建一等: 《免疫学快报》, 1987, **7**(1), 25.

[本文于 1987 年 5 月 15 日收到]

(上接第 158 页)

表 2 聚丙烯酰胺凝胶板不同温度干燥所需时间

温 度	45—55 $^{\circ}\text{C}$	30 $^{\circ}\text{C}$	13—15 $^{\circ}\text{C}$
时 间	2—3 小时	17 小时	2 天

SDS 凝胶电泳以及聚焦和 SDS 双向凝胶电泳后的凝胶板用此法干燥, 同样得到满意的结果。

5. 干燥后的凝胶板取下之前, 需用另一块玻璃板压住凝胶板的表面, 然后小心地打开玻璃板背面的玻璃纸, 轻轻地取下“夹心式”凝胶干片。这样可以防止因表面受力不均匀而突然翘起造成凝胶干片撕裂。

四、注意事项

1. 脱色液中甲醇含量不能低于 10%, 乙酸含量不能高于 7%, 否则凝胶板在干燥过程中易产生裂纹。

2. 为避免玻璃纸与凝胶板之间产生气泡, 包胶的全部过程需在水中进行的。

3. 两层玻璃纸需铺平, 在对向折叠时不能太松, 也不能太紧。否则干燥后的凝胶片不平整有皱折, 或会粘在玻璃板上(特别是温度较高时)取不下来。

4. 玻璃板表面要干净, 切忌破损的凝胶颗粒或碎渣残留在表面, 否则玻璃板与玻璃纸会粘住, 影响干燥后的凝胶片脱离玻璃板。

参 考 文 献

- [1] Giulian, G. G. et al.: *Anal. Biochem.*, 1983, **129**, 277.
- [2] 王育东: 《生物化学与生物物理进展》, 1986, (6), 70.

[本文于 1987 年 4 月 24 日收到]