

技术与方法

免疫印迹检测人红细胞膜血型糖蛋白的方法学

卢义钦 刘俊凡

(湖南医科大学生化教研室,长沙)

提 要

用免疫印迹技术检测人红细胞膜血型糖蛋白(GP)比PAS试剂染色和BLOTTO法点样量少,区带清晰,异常GP的检出率较高,其放射自显影的影像反差好。本文还就该方法的可靠性,最适点样量的选择,血样的有效保存时间以及¹²⁵I-蛋白A的效价等方面进行了讨论。

人红细胞膜上含有四种主要的血型糖蛋白(GP),即 α , β , γ 和 δ GP^[1]。 α GP是M和N血型的抗原决定簇;而 δ GP则表达了Ss血型的生物学活性。近年来有关GP结构多态性的报道,扩大了人红细胞膜蛋白结构与功能相关的知识,疟原虫侵犯人红细胞膜的生化机制,也涉及GP的参与,并日益受到生物医学界的重视^[2,3]。七十年代初,陆续采用了PAGE后多种的处理方法以检测人红细胞膜GP,如用PAS试剂(过碘酸-Schiff试剂)染色^[4]、经乳过氧化物酶酶促的放射碘化反应再放射自显影^[5],以及山羊抗家兔IgG-辣根过氧化物酶(GAR-HRP)法^[6]等。本文作者近期用梯度凝胶电泳和免疫印迹技术检测人红细胞膜GP,操作较简便,结果亦稳定可靠。在建立该法时曾进行了一些方法学研究,兹扼述如下。

材 料 和 方 法

1. 药品和试剂

Na¹²⁵I和¹⁴C-蛋白质分子量标准物系Amersham公司出品,抗人 α GP抗血清与抗人 α GP的CNBr C肽(第82—131位氨基酸残基)抗血清按前法制备和鉴定^[7]。所用试剂

均为分析纯。

2. 红细胞溶血液的制备和免疫印迹

抽取空腹静脉血,肝素或柠檬酸盐-磷酸盐-葡萄糖(CPD)抗凝。正常人血样得自健康教育人员;Aotus猴(*Douroucoulis*)血样系美国NIH的Dr. Howard馈赠。红细胞溶血液的制备与保存,0.1% SDS-10—15%梯度凝胶(交联度2.63%—3.85%)电泳以及免疫印迹,均同前文^[8]。

3. GP(抗原)与被吸附抗血清的反应

(1) 抗人 α GP抗血清的吸附

取四支Ependorff小管,往前三管中各加50 μ l抗人 α GP抗血清和400 μ l磷酸盐缓冲的生理盐水(PBS),往第四管加50 μ l抗人 α GP抗血清和450 μ l PBS。全部置56 $^{\circ}$ C保温30分钟以灭活其血清补体。随即往前三管依次添加MM, NN及MN血型正常人的洗涤红细胞各50 μ l;第四管不加红细胞,作为抗血清对照管。将四支管送4 $^{\circ}$ C冷室旋转混匀过夜。翌晨8000转/分离心15分钟。吸出各管上清液,转移到另四支小管。除第四管外,往前三管再分别加入上列三种血型正常人的洗涤红细胞各50 μ l,旋转混匀4—5小时。离心,吸

出各管上清液, 分别加入 1% 牛血清清蛋白 (BSA) 10ml, 使与通过凝胶电泳已分离的三种血型红细胞 (与用于吸附反应的红细胞属同一正常人) 所含 GP 进行免疫印迹, 比较各组的放射自显影图谱。

(2) 抗人 α GP 的 C 肽抗血清的吸附同上处理, 仅免去 56°C 保温步骤。

结果与讨论

1. 本法与其他方法的比较

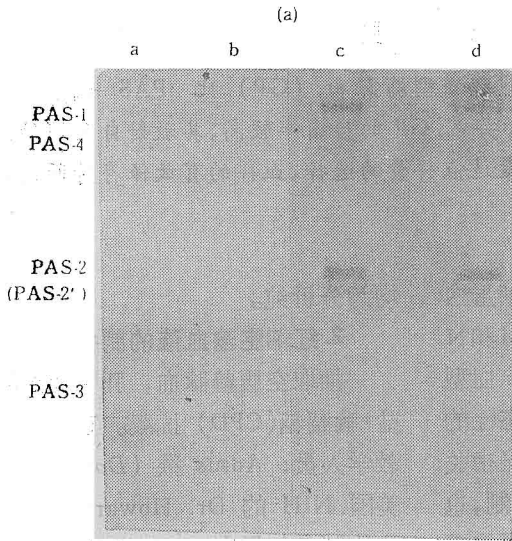


图 1(a) 红细胞 GP 的 PAS 染色图谱

a 行——正常人 (MM 血型) 红细胞溶血液;
b 行——Aotus 猴红细胞溶血液;
c, d 行——同一正常人的红细胞膜。

(1) 与 PAS 试剂染色比较

在一块凝胶板的两侧分两组点样。由图 1a 所示, 在 PAS 染色组, 正常人和 Aotus 猴红细胞溶血液 (a, b 行) 即令高达 30 μ l (相当于压积红细胞 1 μ l), 也只有前者的一条 PAS-1 区带隐约可见, 其他区带均未染出; 正常人红细胞膜制品 (c, d 行) 点样 35 μ l, 则可显示 PAS-1, 2, 3 和 2' 四条区带 (前三者分别相当于本法的区带 1, 4 和 6)。PAS-4 区带未显出。比较图 1b 的本法结果, 正常人红细胞溶血液虽仅点

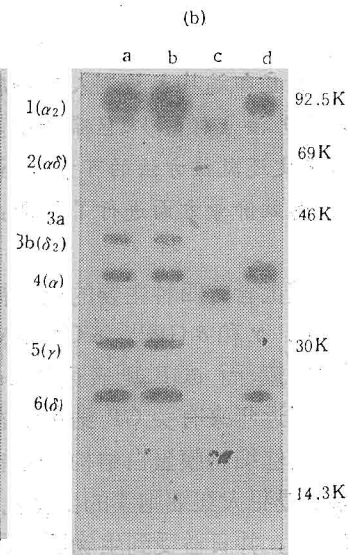


图 1(b) 红细胞 GP 的免疫印迹图谱

a, b 行——同 (a) a 行;
c 行——同 (a) b 行;
d 行——同 (a) c, d 行。

样 10 μ l (相当于压积红细胞 0.32 μ l), 却见有 7 条清晰区带 (区带 1, 2, 3a, 3b, 4—6 等)。相同点样量的 Aotus 猴红细胞显示了迥异于人特征的 GP 图谱 [(b), c 行], 即区带 1 和 2 强度锐减, 此两者与区带 4 的迁移率均加快, 其区带 3b 和 5, 6 皆缺如。正常人红细胞膜 [(b), d 行] 未见区带 3a 和 5。由此可知, 无论就方法的灵敏度、图谱的清晰和 GP 的检出率来权衡, 本法均优于 PAS 染色。

(2) 与“BLOTTO”法比较

1984 年 Johnson 等采用干奶粉阻断非特异吸附反应, 据称获得较好效果, 命名为“改进

的牛乳转渍技术 (简称 BLOTTO)^[9]。我们用同一正常人的红细胞溶血液按该法和本文方法同时操作, 发现前者放射自显影图谱的背景较模糊, 影像反差弱。

2. 本法的可靠性

(1) 检查所用抗血清

1) GP 与吸附后的抗人 α GP 抗血清反应 (图 2)

在 (a) 组及 (e) 组 (对照组), 均可见惯常的 7 条区带, 而在 (b), (c) 和 (d) 三组, 其区带 3b (δ_2 GP) 和 6 (δ GP) 皆缺如。 α GP 链由 131 个氨基酸组成, CNBr 裂解可从两个蛋

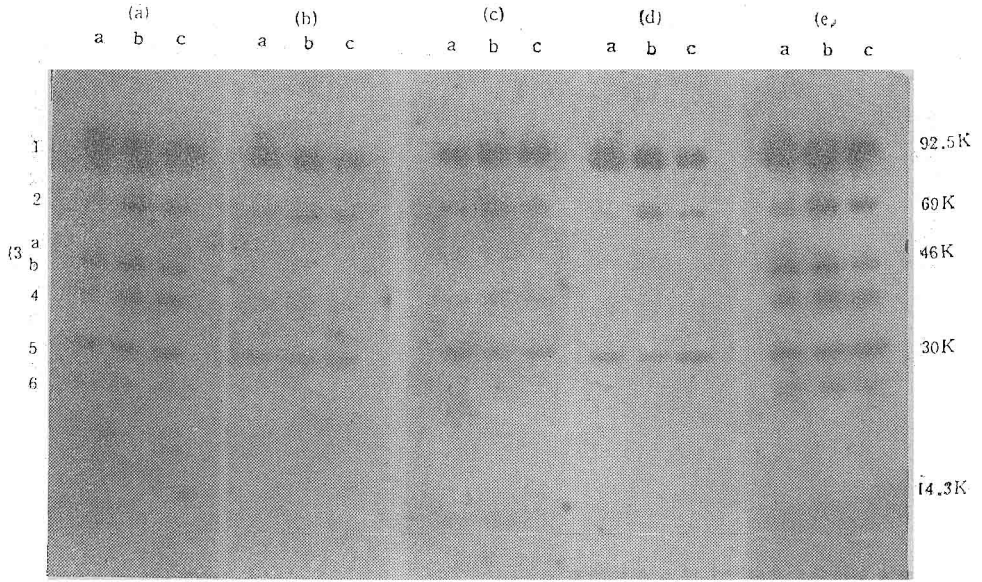


图2 正常人红细胞 GP 与吸附后抗人 α GP 抗血清的相互反应

分行点样的 a, b, c 行分别为 MM, NN 和 MN 血型人红细胞溶血液。(a) 为抗 GP 抗血清(本法常规操作); (b), (c) 和 (d) 分别为被 MM, NN 和 MN 红细胞吸附后的抗 GP 抗血清; (e) 为抗 GP 抗血清 + 50 μ l PBS。

氨酸残基处断开,得 N 端 A 肽(1—8 位)、B 肽(9—81 位)和 C 肽(82—131 位)。本法所用抗人 α GP 抗血清属一种多克隆抗体,含有多种 IgG 分子,能与 A 和 C 肽起反应,但不能与 B 肽反应^[8]。MM, NN 和 MN 血型正常人的红细胞膜上携有 GP 抗原决定簇,能和参与 A 肽反应的那些 IgG 分子发生吸附,而由于 α GP 的 C 末端深藏于红细胞液内,因此参与 C 肽反应的 IgG 分子将剩留在抗血清中。它们可同 α GP 以及具有与其 C 末端相似结构的一切其他 GP 起反应,惟不能与 δ GP 反应,因 δ GP 缺乏与 α GP 相似的 C 末端结构。所以图 2(b)—(d) 三组均未见有区带 3b 和 6。结合 ELISA 及交叉反应等鉴定结果^[10],均证明所制备的抗人 α GP 抗血清的特异性较强。

2) GP 与吸附后的抗 C 肽抗血清反应

在 (a)—(e) 五组, δ GP 的两条区带(3b 和 6) 均缺如(图略)。这是因为从正常人三种血型红细胞膜上伸出的抗原决定簇在 α GP 的 A 肽范畴,它们不会被抗 C 肽的 IgG 分子所吸附,故红细胞吸附后的抗 C 肽抗血清保留了其原有的免疫特性,可与 α 及 γ GP 起反应,而不

能与 δ GP 反应^[8]。

(2) 检查供对照用的免疫前家兔血清(图 3a)

它与 MN 血型 GP 纯品(a 行)反应时未显示任何区带,而与 MM, NN 和 MN 血型正常人红细胞反应时则均在区带 5 处见有一极淡染的区带,其强度与 En(a-) 血型红细胞(缺乏 α 及 δ GP 的变种 GP) 的结果相同^[8]。

(3) 检查 ¹²⁵I-蛋白 A(图 3b) 如不经抗人 α GP 抗血清处理,用同一 MN 血型正常人的红细胞溶血液单独与 ¹²⁵I-蛋白 A 起反应,未显示 GP 的任何区带,证明本法操作中无 ¹²⁵I-蛋白 A 产生的假阳性区带。

3. 最适点样量的选择(图 4)

取一名 MN 血型正常人的新制红细胞溶血液分 5 组点样,每组两行。点样量按序递增,使每 10 μ l 中分别含有相当于原压积红细胞 0.08, 0.16, 0.32, 0.48 和 0.64 μ l。比较各组即知, a, a' 和 b, b' 行因点样量太少,图谱不清晰或区带显示不全; c, c' 行的 7 条 GP 区带全部呈现,且较清晰;由于 d, d' 和 e, e' 行的点样量加大,在区带 3b 与 4 之间又出现一新区带 4', 原 3a

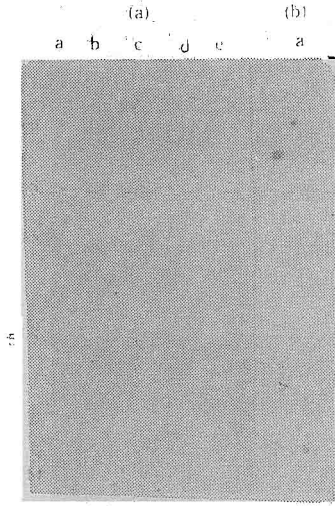


图3 对家兔免疫前血清及¹²⁵I-蛋白A的检查

- (a) 免疫前家兔血清(1:200)+¹²⁵I-蛋白A a行——MN血型GP纯品; b, c和d, e行——分别为NN, MM和MN血型正常人红细胞溶血液。
 (b) 0.05mol/L Tris-HCl-0.15mol/L NaCl(pH 7.6)缓冲液+¹²⁵I-蛋白A
 a行——同一正常人 [(a): d, e行]

及3b两条区带逐被挤压成一条粗带(见e, e'行)。当同抗人 α GP C肽抗血清反应, 区带4'可被深染, 提示它可能是 α GP与其他GP的聚合物, 而与 δ GP无关。因此, 点样量过多会妨碍实验结果的正确解释, 点样量太少又影响图谱清晰度。点样以0.32 μ l红细胞/10 μ l最适当。

4. 血样的有效保存时间(图5)

将正常人红细胞溶血液分装小管, -20 $^{\circ}$ C冻存, 半年内经本法多次检查, 其GP图谱无改变, 实验的重现性好。图5为三个当天新制血样同冻存16周后的结果对比, 后者中有两个血样属前组的两名同一正常人。

5. ¹²⁵I-蛋白A的效价

用Packard公司544型液闪分光光度计测定, ¹²⁵I-蛋白A的放射活性如达到约10—12 μ Ci/ μ g蛋白A或5—7 $\times 10^6$ cpm/10 μ l, 每次免疫印迹投用10—15 μ l, 即可获满意的放射自显影。但用国内生产的¹²⁵I标记时常达不到此要求, 其放射活性约低40—60%, 可适当增加实验投用剂量。置标记的蛋白A于铅屏管中

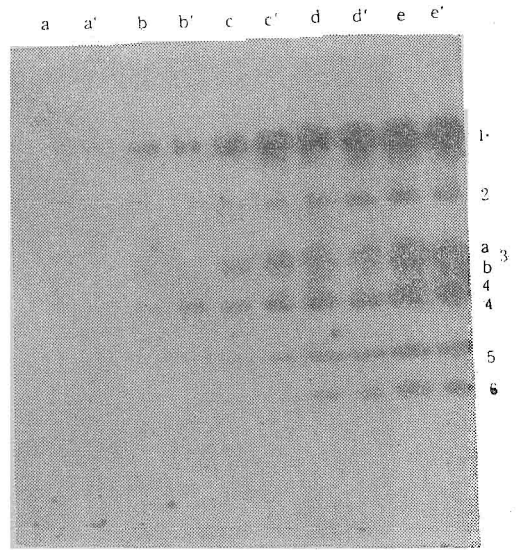


图4 点样量对GP免疫印迹图谱的影响

- aa', bb', cc', dd', 和ee'各行的点样量, 分别含0.08, 0.16, 0.32, 0.48和0.64 μ l红细胞/10 μ l

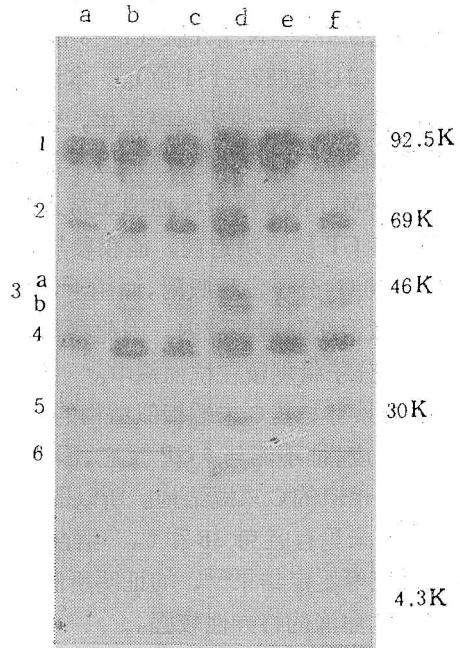


图5 人红细胞溶血液的冻存时间对其GP免疫印迹图谱的影响

- a, b, c行 当日抽取血样的检测;
 d, e, f行 冻存16周后的溶血液

(4 $^{\circ}$ C), 一般可保存2—3个月。若其放射活性衰变50%以上, 宜再制备新标记蛋白A。

检测人红细胞膜GP的方法, 早年采用乳

过氧化物酶催化的放射碘化法^[5], 可显示 7 条区带 (α_2 , $\alpha\delta$, δ_2 , α , β , γ 和 δ), 而且影像清晰。但其操作步骤较多, 需转速 40000g 的超速离心机, 有时放射自显影长达 27 天^[11]。及后, 大多常用 PAS 试剂染色或 GAR-HRP 检测法^[6]。前法不够灵敏, 所需点样量大, 人红细胞溶血液 30 μ l 仅显出 GP 的个别区带, 改用红细胞膜点样 35 μ l, 始获满意结果。一般 PAS 染色只见有五条区带, 有时 PAS-4 区带不清楚 (详图 1)。后一方法, 作者等也曾多次试用, 它虽勿需同位素标记, 但图谱中会出现少数非特异性区带。此外, 两法还存有一共同缺点, 即显色后无论凝胶或印迹的硝酸纤维素膜均须避光保存, 而且在进行图谱摄影时, 其 GP 区带的淡红色 (PAS 试剂) 或紫灰色 (GAR-HRP 法) 将给反差造成一定困难。

结合本文实验结果, 我们认为免疫印迹是检测人红细胞膜 GP 的一种简易而实用的方法。因为除转渍仪 (Transblotter) 和 ¹²⁵I-蛋白 A 外, 所需设备药品均属一般生化实验室常用。每次测定只需洗涤红细胞 0.025—0.05ml。红细胞溶血液可在 -20 $^{\circ}$ C 长时间冻存, 重现性仍好。方法的特异性较高, 可反映人类和非人灵

(上接第 63 页)

的。由于室内的灰尘、气流及温差等因素, 随光路的延伸光稳定度将有所下降。考虑到这一点, 我们在系统中对激光强度的变化进行了补偿, 从而进一步提高了实验数据的可信性, 并相应地降低了对激光器和实验室条件的要求。而且组成实验曲线的每一实验点还经过了十次平均, 有利于提高实验曲线的信噪比。

4 由于漂白后到打开光电倍增管进行数据采集的延迟时间是由计算机产生的, 有足够高的精度, 保证了时间测量的精确度。而这一因素对于扩散系数的准确性有着极为重要的意义。关于这一点, 我们以前^[7]曾讨论过。

5 在程序设计中考虑了人机会话、手动控

长类动物红细胞 GP 的电泳行为差异^[12], 并能检出人红细胞的各种 GP 变种^[8], 区带清晰。其放射自显影易于保存和翻印成照片。本法的实验流程不太长, 耗费亦不高。

本文的部分工作是作者在美国纽约爱因斯坦医学院生化系及内科血液病研究室访问期间完成, 曾得到 Blumenfeld, O. O. 和 Nagel, R. L. 两教授的支持和指导, 谨此致谢。

参 考 文 献

- [1] Anstee, D. J.: *Semin. Hematol.*, 1981, 18, 13.
- [2] Blumenfeld, O. O. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978, 75, 2727.
- [3] 卢义钦等: 《生命的化学》, 1986, 6(5), 6.
- [4] Steck, T. L. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1974, 249, 2135.
- [5] Boxer, D. H. et al.: *Biochem. J.*, 1974, 137, 531.
- [6] Towbin, H. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, 76, 4350.
- [7] Blumenfeld, O. O. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1986, 261, 5544.
- [8] Lu, Y. Q. et al.: *Blood*, 1987, 69, 618.
- [9] Johnson, D. A. et al.: *Gene Anal. Techn.*, 1984, 1, 3.
- [10] 刘俊凡等: 《中国免疫学杂志》, 1988 (待发表)。
- [11] Vengelen-Tyler, V. et al.: *Transfusion*, 1981, 21, 1.
- [12] Lu, Y. Q., Liu, J. F. et al.: *Biochem. Genet.*, 1987, 25, 477.

[本文于 1988 年 1 月 20 日收到]

制以及在给出实验数据的同时, 还给出实验曲线、理论拟合曲线, 这对使用、维护实验系统提供了很大的方便。

参 考 文 献

- [1] Axelrod, D. et al.: *Biophys. J.*, 1976, 16, 1055.
- [2] Peters, R.: *Cell Bio. Int. Rep.*, 1981, 5, 733.
- [3] 张孔华等: 《细胞生物学杂志》, 1982, 4(3), 33.
- [4] 孙伟利: 《实验生物学报》, 1982, 15, 209.
- [5] 顾国彦等: 《实验生物学报》, 1983, 16, 467.
- [6] 徐成汤等: 《实验生物学报》, 1984, 17, 471.
- [7] 徐成汤等: 《细胞生物学杂志》, 1985, 7(4), 166.
- [8] Jacobson, K. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1976, 433, 215.

[本文于 1987 年 12 月 15 日收到]