

介绍一种新的半干式免疫转渍法

李永兴 胡长征 王继文 李久蒂

(中国科学院植物研究所, 北京 100044)

关键词 电转渍, 抗体, 显色剂

蛋白质免疫转渍法 (Western blotting) 是十年发展起来的一种生化新技术^[1-3]。其原理是用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离待分析的蛋白质样品, 然后用转渍装置把蛋白质转移到硝酸纤维素膜 (NC 膜) 上, 再利用免疫检测法检出要分析的蛋白质区带。过去报道的大多是利用液相夹心式电转渍仪完成转渍的, 这种转渍法的缺点是转渍时间长, 缓冲液用量大, 转渍过程中要采取冷却措施。为克服这些缺点, 近年来又发展了一种半干式电转渍装置^[4,5]。这种新型的电转渍仪由两个板电极组成, 板电极由石墨板或涂铂金的钛板做成。板电极之间形成高强度的电场, 产生均一的强电流, 因此转渍效率高, 可以在 15min 到 2h 内完成转渍, 而且只需少量电极缓冲液, 不需要冷却措施。本文主要介绍这种半干式免疫转渍法。

材料与方 法

半干式电转渍仪 北京科普仪器厂生产的 KP-34 型电转渍槽^[4], 槽体由上下两块石墨板电极组成, 槽盖为阴极, 槽底为阳极。板电极之间由正负电极缓冲液浸透的 6 层滤纸作为离子库, 电泳胶和硝酸纤维素膜夹在滤纸之间。转渍过程由于电极与滤纸之间紧贴, 横过胶的电场强度是最大的, 因此转渍效率高, 特别是对大分子量的分子转渍效率增加。电源部分我们采用植物所生产的低电压高电流电泳脱色仪 (一般的电泳电源不适用)。

试剂

1. 转渍缓冲液 阳极缓冲液 I: 0.3 mol/L Tris,

20% 甲醇, 阳极缓冲液 II: 0.025 mol/L Tris, 20% 甲醇。阴极缓冲液: 0.04 mol/L 甘氨酸, 0.5 mmol/L Tris, 20% 甲醇。

2. 免疫检测缓冲液 TBS: 0.02 mol/L Tris, 0.5 mol/L NaCl 用 1 mol/L HCl 调至 7.5。TTBS: 0.2 ml Tween 20 溶于 400 ml TBS 中。封闭液: 0.5g 干酪素溶于 100 ml TBS。第一抗体溶液: 7 μ l 特异性抗血清 (例如抗固氮酶铁蛋白抗体) 溶于 10 ml 封闭液中。第二抗体溶液: 偶联过氧化物酶的羊抗兔 IgG 抗血清 10 μ l (北京生物制品所生产) 溶于 10 ml 封闭液中。显色液: 二氨基联苯胺 (3,3'-diamino benzidine) 2.5mg 溶于 10 ml TBS, 搅拌过夜。临用前加 5 μ l 30% H_2O_2 , 显色。

电泳及样品制备 吸取 5ml 菌液迅速用玻璃纤维滤纸 (Whatman GF/C 直径 4.25 cm Millipore 公司产品) 在磨砂玻璃漏斗上抽滤。立即把滤纸片投入液氮中固定, 然后滤纸在 100 $^{\circ}$ C SDS 样品缓冲液中加热 3min, 以裂解菌体。10000r/min 离心, 取上清液进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。SDS 电泳按 Laemmli 法操作^[6]。

半干式电转渍操作 用阳极缓冲液 I 浸透两张 (滤纸大小与电泳胶相同) 滤纸 (滤纸 I), 平铺于阳极石墨板上。取两张用阳极缓冲液 II 浸透的滤纸 (滤纸 II), 平铺于滤纸 I 上。取一张硝酸纤维素膜 (Cole-Parmer 公司产品。带手套用清洁的剪刀和镊子操作。硝酸纤维素膜的大小可根据需要剪裁。) 用阳极缓冲液浸透, (在转渍前 1h 进行) 平铺于滤纸 II 上。将电泳后的聚

体中的线粒体或微粒体与 2,4,6-三硝基甲苯 (TNT) 和 NADPH 作用产生的 TNT 自由基中间体。

该方法不仅能进行细胞、细胞器与药物作用的研究, 还能用于毒理学和有机反应动力学观察, 以及厌氧菌活动的研究。

参 考 文 献

1 Swartz HM 著, 《电子自旋共振的生物学应用》翻译组

译。电子自旋共振的生物学应用, 北京: 科学出版社, 1978: 118—123, 452—456

2 任建平等。见: 第二届全国自由基生物学及自由基医学学术会议论文摘要汇编, 重庆, 1989: 52

3 Mason RP. In: *Methods in enzymology*. Vol. 105, New York: Academic Press, 1985: 416—422

[本文于 1990 年 3 月 19 日收到,

6 月 14 日修回]

丙烯酸凝胶(电泳后立即转渍, 不需缓冲液平衡)平铺于硝酸纤维素膜上。用阴极缓冲液浸透的两张滤纸平铺于凝胶上,(注意各层之间勿留气泡。)将阴极电极板轻轻盖上, 接通电源, 槽盖为负极, 槽底为正极。维持恒电流, 一般 $4 \times 10\text{cm}$ 的胶用 100mA 电流。室温下转渍 120min 。(胶面积小转渍时间可相应缩短。)

免疫检测^[1]

1. 封闭 将转渍后的硝酸纤维素膜放入含 0.5% 干酪素的 TBS 溶液中(在温水浴中溶解, 离心取上清液备用), 在室温下轻轻振荡 1h 。

2. 结合 将封闭后的硝酸纤维素膜转入第 1 抗体溶液, 在室温下轻轻振荡 1h , 或置于 4°C 冰箱中过夜。

3. 洗膜 硝酸纤维素膜用 TTBS 溶液洗 10min , 再用 TBS 洗两次, 每次 10min (在摇床上轻轻振荡)。

4. 偶联第二抗体: 把洗好的硝酸纤维素膜放入第二抗体溶液中, 偶联 1h 。

5. 洗膜: 重复第三步操作。

6. 显色: 把硝酸纤维素膜转入二氨基联苯胺溶液, 加入 $5\mu\text{l}$ H_2O , (30%) 开始显色。轻轻摇动器皿, $5-6\text{min}$ 后出现棕红色染色带。显色时避免见光。显色后硝酸纤维素膜用蒸馏水冲洗, 在空气中干燥后保存。显色过快或过慢应相应改变 1 抗或 2 抗的

用量。1 抗或 2 抗溶液用过后可保存在 -20°C 冰箱, 反复使用数次, 每次可适当添加 1 抗或 2 抗溶液。显色液的量可根据硝酸纤维素膜大小增减。

结果和讨论

用半干式电转渍仪转渍后的凝胶用考马斯亮蓝染色, 以检查转渍效果, 结果表明凝胶上没有染色带, 转渍效率可达 100% 。转渍后的硝酸纤维素膜用氨基黑染色呈现出清晰的染色带。图 1 (图版 IV) 为固氮酶铁蛋白免疫转渍图, 染色带清晰, 此方法是研究固氮酶活性调节的有力工具。

参考文献

- 1 Towbin H *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979; 76:4350
- 2 Burnette W N *et al.* *Anal Biochem*, 1981; 112:195
- 3 Towbin H *et al.* *J Immunol Meth*, 1984; 72:313
- 4 北京科普仪器厂, KP-34 型电转说明书
- 5 Rio-Rad Catalogue, 1989; 161-162
- 6 Laemmli U K. *Nature*, 1970; 227:280
- 7 Hawkes R *et al.* *Anal Biochem*, 1972; 119:142

[本文于 1990 年 3 月 12 日收到,

7 月 3 日修回]

(上接第 244 页)

吸光度变化 0.08 。批内、批间平均 CV 分别为 2.3% 和 4.9% 。回收率为 $96\%-99\%$ 。

讨论

1. SDS 质量很关键, 国产 SDS 杂质多效果不理想, 需重结晶处理。进口分装的 SDS 质量可靠。

2. BC 或 BD 溶液 6 小时内稳定, 其色泽应为黄色或略绿黄色, 若转为绿色或蓝色, 表明已污染应弃去。

3. BC (或 BD) 试剂一经加入, E 试剂应在 10min 内加入, 只有加入 E 试剂(含有柠檬酸钠)才能终止显色反应。若样品中仅无机磷存在时, E 溶液加入的时间长短对显色变化影响不大; 若有机磷存在时, E 溶液加入过迟 (12min 以后), 5mmol/L ATP 就会使有机磷释放出无机磷使其与剩余的钼酸作用, 导致吸光度增加, 如图 3 所示。

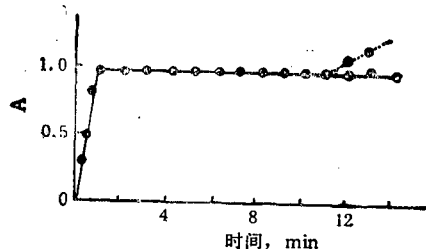


图3 t-A 曲线

4. 两种方法不受下列因素的干扰 4mmol/L

ATP、 1mol/L NaCl、 100mmol/L KCl、 1mol/L (NH_4), SO_4 , 100mmol/L Hepes, 100mmol/L Tris. 方法 1 不受 EDTA 影响, 方法 2 不受 MgCl_2 、甘油影响。

对蛋白质的耐受力:

方法 1 当蛋白浓度达 1mg/ml BSA、 12mg/ml 人血清蛋白、 2mg/ml 晶体蛋白时; 方法 2 当蛋白浓度达 20mg/ml BSA、 50mg/ml 人血清蛋白、 12mg/ml 晶体蛋白时, 检测结果均不受影响。

总之, 与使用 ATP 再生系统分析 ATPase 相比, 测定酶反应体系中释放的无机磷含量无需高纯度的 ATP 和复杂的外加酶系(丙酮酸激酶、乳酸脱氢酶等), 是一种简便的分析方法, 加上本法所特有的高灵敏度, 不受有机磷水解及高浓度蛋白质的影响, 故特别适用于蛋白含量高, ATP 酶活性低的晶体组织 Na^+ 、 K^+ -ATPase 的检测。

参考文献

- 1 Pullman M E *et al.* *J Biol Chem*, 1960; 235:3322
- 2 徐友涵, 倪基德. 生物化学与生物物理进展, 1985; (5): 57
- 3 Fiske C H, Subbarrow Y. *J Biol Chem*, 1925; 66: 357
- 4 Baginski E S *et al.* *Clin Chim Acta*, 1960; 5:834
- 5 Zigler S J *et al.* *Trends Biochem Sci*, 1981; 6:133
- 6 Chifflet S *et al.* *Analytical Biochemistry*, 1988; 168:1

[本文于 1990 年 4 月 25 日收到,

9 月 9 日修回]

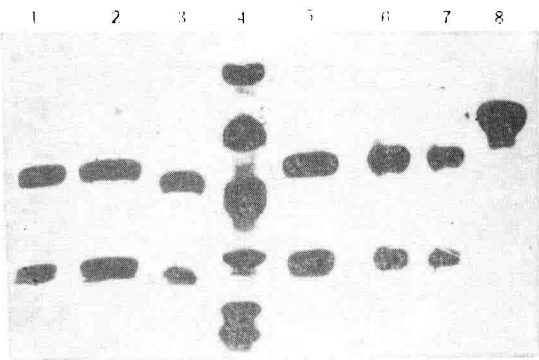


图 2 纯化 IgG 的 SDS-PAGE 图

1 羊抗人癌源铁蛋白抗血清 IgG，辛酸法提取；2 羊抗人癌源铁蛋白抗血清 IgG，亲和层析法提取；3 兔抗人癌源铁蛋白抗血清 IgG，辛酸法提取；4 标准蛋白，分子量由上至下依次按分子量大小的排列分别为 94000,67000,43000,30000,20000,14400；5 正常羊血清 IgG，辛酸法提取；6,7 驴抗兔抗血清 IgG，辛酸法提取；8白蛋白

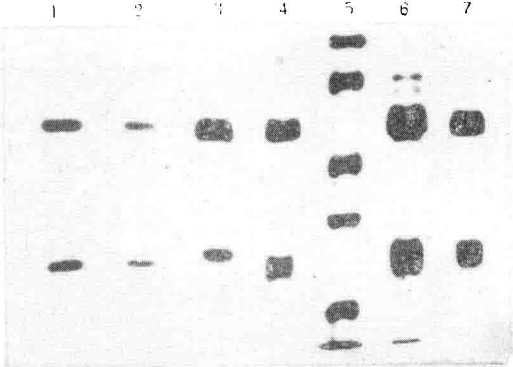


图 3 纯化 IgG 的 SDS-PAGE 图

1 正常小鼠血清 IgG，硫酸铵法提取；2 正常羊血清 IgG，硫酸铵法提取；3 正常羊血清 IgG，辛酸法提取；4 正常猪血清 IgG，辛酸法提取；5 标准蛋白(同图 2)；6 猪抗人癌源铁蛋白抗血清 IgG，辛酸法提取(不纯)；7 猪抗人癌源铁蛋白抗血清 IgG，辛酸法提取(增加辛酸用量)

王 会等：“一种测定多个目的基因扩增的简易方法——差异 PCR 扩增法”一文的图 1

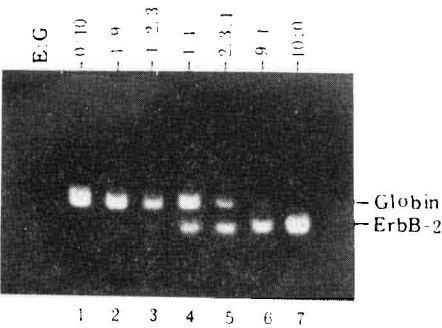


图 1 C-erbB-2/HER-2 和人类珠蛋白基因 γ -IVS-II 经 PCR 扩增后的聚丙烯酰胺凝胶电泳图上方所示为 PCR 扩增前两种带有目的基因质粒 pCER204 与 pUC-2 γ - β 的重量比(单位: ng)

李永兴等：“介绍一种新的半干式免疫转渍法”一文的图 1

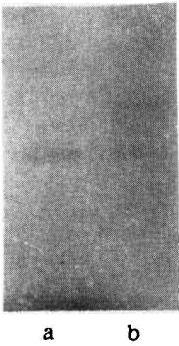


图 1 固氮螺菌 (*Azospirillum brasilense*) 粗提物的免疫转渍图

用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离粗提物,抗固氮酶铁蛋白为第一抗体
a. 加 NH_4^+ 前细胞粗提物
b. 加 NH_4^+ 后细胞粗提物