

蛋白质印渍术的广泛应用*

范培昌 刘家英

(华东师范大学生物系, 上海 200062)

摘要 结合自身研究工作, 综述了近5 a (年) 来蛋白质印渍术广泛应用于蛋白质和肽序列自动分析、临床诊断药盒、超微量分离分析、抗体生产等方面的进展。

关键词 印渍技术, 蛋白质, 序列分析, 临床应用, 电泳与层析

印渍术已成为当代生命科学各领域进行理论与应用研究必不可少的常规技术^[1], 也是当代发展最快、创新最多的新技术之一。近年, 印渍术不仅在自身所用装置、方法、用纸等方面有了新的改进和发展, 它还渗透到诸如蛋白质序列分析术、单抗生产术、毛细柱制备层析和制备毛细管电泳技术、PCR 技术等新一代生化技术中。在应用研究方面, 最引人注目的要数近年新上市, 用点印渍术 (dot blotting; 俗称膜法) 检出各种疾病的近10种临床诊断药盒。它们异军突起, 冲击并最终将可能取代大部分现用微滴板的酶联免疫吸附法 (ELISA) 诊断药盒市场。

1 印渍术在蛋白质序列自动分析中的应用

早在1985年, 就有人在常规印渍纸 (NC 纸、ZB 膜等) 上进行蛋白质序列测定, 后因其不耐有机溶剂而放弃。1986年, Aebersold 等人提出改用胺类修饰过的玻璃纤维片 (glass-fiber sheet), 又因其特异性不高、表面取代难等缺点而不够理想。直到1987年, Matsudaira^[2]采用了聚亚乙烯二氟 (PVDF) 膜, 才克服了蛋白质序列分析用印渍纸的各种缺点。1988年, Xu 和 Shively^[3]以及 Moos 小组^[4], 把 PVDF 膜衬以一种类特氟隆的多聚物, 使之无论在机械强度还是化学惰性等方面都适于蛋白质测序, 才使印渍术正式成为当代蛋白质序列分析术中重要的组成部分。现在, 人们只需把含有欲测序蛋

白质的混合样品, 经常规 SDS/PAGE 分离成单一区带, 然后印渍于 PVDF 膜, 再经考马斯亮蓝染色, 剪下欲测序之区带, 就可直接送入市售属于吸附式或气相式的蛋白质 N 端测序仪, 即能读出蛋白质或肽 N 端数十个氨基酸残基的序列。最近, 这类测序所需印渍纸上的蛋白质量已减少到100 pmol, 还可用于半胱氨酸残基和糖基化残基的定位^[5]。而且, 测序方法与测序仪等也因印渍术的改进而有了新的发展。例如最近, Rein 和 Speicher^[6]提出了电印渍于 PVDF 上的蛋白质可用一种具双相反应柱的高效测序仪来提高灵敏度。当然, 有关蛋白质全序列的全自动检出目前尚未成功。

2 印渍术在临床诊断药盒中的应用

众所周知, 迄今至少已有近百种用 ELISA 法设计的, 诊断各种疾病的临床诊断市售药盒。由于此法灵敏度高、选择性好而深受用户欢迎。但是, 这类药盒多采用96孔聚苯乙烯微滴板作为包被抗原或抗体的固定化介质, 每人份检出所需包被单抗和酶标单抗量要以百微升计, 致使成本较高。即使厂方已为用户包被好的所谓“快速、精装型”, 检出时间也要2 h。操作时, 因孔穴较小, 即使把96孔板翻过来, 穴内液体都难流出, 因而加样、洗涤、加酶标抗体等步骤, 需在桌边甩打才能除净穴内液体。这样的操作, 既容易污染环境, 又使操作人员倍感辛苦。为

* 文中所列自身研究工作成果得到国家自然科学基金资助。

收稿日期: 1994-08-30, 修回日期: 1994-12-09

解决微滴板药盒的这些缺点, 采用点印渍原理设计的临床诊断药盒开始问世. 迄今, 已有数种国产及进口印渍法诊断药盒上市, 包括: hCG、HBsAg、HIV-1、HCV、AFP、血吸虫循环抗原^[7]等. 这些点印渍法药盒检测操作只需 10 min、单抗用量只需几微升或数十微升, 而灵敏度与选择性又和原 ELISA 法近似, 甚至更好, 因而很受用户欢迎. 需要指出的是, 目前上市的这种印渍法药盒, 还只是第一代产品. 综观近来有关文献, 检出灵敏度已大为提高. 例如, Canas 等人采用 Millipore 生产的 Immobilon-AV 印渍纸, 可以检出原来难以用免疫印渍法检出的小肽 (26 肽), 且最小检出值为 2 pmol; Engenia 等人最近创造的酶标底物液, 使蛋白质检出最小值达 47 pg. (Engler-Blum 等人^[8]报道的用地高辛标记 RNA 的 DNA 印渍法, 使 DNA 的最小检出值已达 1.5 fg). 我组^[9]也在改造国产 NC 和 ZB 印渍纸、酶标底物固化等方面取得一定进展, 部分已成商品上市销售. 此外, 我组把薄层层析技术组合于印渍术中, 试制成功 2 min 即知怀孕与否的 hCG 检测试条, 产品也已转让并上市.

3 印渍术在生物化学物质超微量分离中的应用

近年来, 生化技术领域正在推广毛细管聚丙烯酰胺凝胶电泳 (c-PAGE) 和毛细柱高效液相层析 (c-HPLC). 这两种新一代超微量分析技术因上样量极少, 分离后产物只达 pg 级而难以回收, 致使只能用于分析而不能用于制备. 1992 年, Eriksson 等人^[10]把印渍术引入 c-PAGE 而解决了这一难题. 正如图 1 所示, 这是把一卷转动着的印渍纸, 放在毛细管与电泳槽之间, 因该槽一侧对着毛细管的位置开有一小孔, 使电极液能沿此小孔湿润紧贴此孔并转动着的印渍纸, 又同时使电流能经紧贴印渍纸的毛细管和另侧电极槽相通. 这样一来, 由 c-PAGE 分离的各种物质, 将被电场先后迁移出毛细管并被固定化于印渍纸上而被回收. 其后, 印渍纸上的物质就可如常规的免疫印渍术那样操作或洗

脱.

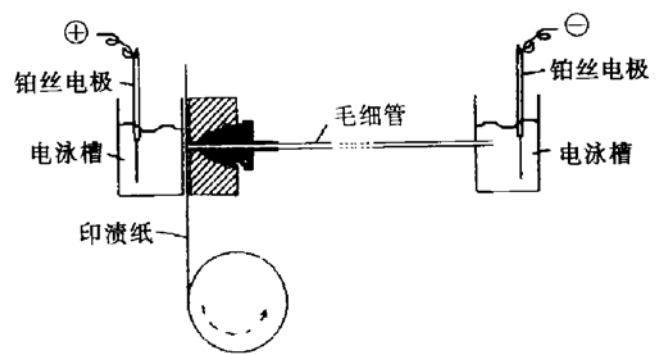


图1 制备 c-PAGE 示意图

这一成果很快又被应用于 c-HPLC 中. 1993 年, Murata 等人^[11]设计了用印渍纸回收毛细柱层析分离物的新装置 (图 2), 使得印渍纸上分离物的位置能和紫外检出峰同步标示, 取得了同时定量与回收分离物的双重功效. 可以预言, 据此原理设计的新一代全自动 c-HPLC 仪不久必会面世.

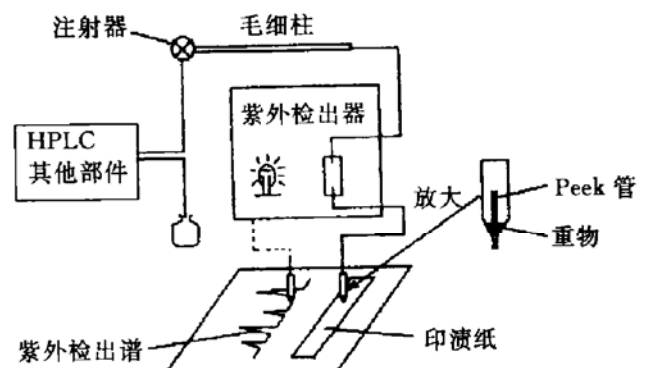


图2 制备 c-HPLC 示意图

4 印渍术在抗体生产中的应用

本人^[1]曾介绍过印渍术用于常规单抗生产中筛选与鉴定, 近代更创立了大量样品的筛选方法^[12]. 此外, 与此有关而引人注目的进展是一类称为合成肽的免疫印渍术. 众所周知, 常规生产单抗技术所得单抗, 往往有多个抗原表位, 这就降低了用此单抗检出样品中与之相关抗原的选择性. 现在, 由于 DNA 序列快速分析技术的建立, 使得由 cDNA 序列推知蛋白质序列

的数目越来越多。另外,由于全自动肽合成仪的问世,使人们能按已知序列,选择蛋白质中任一肽段,用肽合成仪人工合成,故名合成肽。人们自然会想到,用此合成肽免疫动物就能得到针对此肽段的抗体,因肽段只由6~35个氨基酸残基组成,所产生的抗体往往只有单个抗原表位,用它去检测此肽段的相关抗原必然具有最佳效果。作者近年来也对此作了研究^[13]。我们按照人红细胞膜带3蛋白 cDNA 推知的氨基酸序列,取其C端最后16残基用肽合成仪予以合成。把此合成肽一分为二,一份用戊二醛和牛血清白蛋白交联后免疫小鼠;另一份被固定于PVDF印渍纸上。最后,用此印渍纸直接从免疫鼠血清中亲和吸附并洗脱下针对此16肽的抗体。经分析确证,由此法所得带3蛋白抗体只有一个抗原表位,故我们暂命名为针对带3蛋白的单表位抗体(monoepitopic antibody)。我们相信这种小规模简便生产单表位抗体的方法,能被应用于许多理论研究中。

5 印渍术的进展及应用前景

印渍术的进展很多,篇幅所限,这里只作简要叙述。

在印渍装置方面,除了又创造了小袋印渍(pocket blotting)、真空印渍(vacuum blotting)、无重力下行式毛细管印渍法等装置外,最受人欢迎的是半干式电印渍(semidry electroblotting)装置。迄今,除了已有市售商品外,近来又报道了一种可容纳4种印渍缓冲液的半干式电印渍系统^[14]。此系统能够定量印渍一些溶解度差、分子量大小差别巨大、蛋白质种类复杂的样品。我们相信这类印渍体系将是今后电印渍的发展趋向。

在印渍纸方面,除了仍广泛使用各种孔径和印渍容量的NC纸和ZB膜外,也有一些新品上市。如前已提及的PVDF膜,已有两种亚类:常规的属吸附膜,如商品Immobilon-P;非常规的属共价结合膜,如商品Immobilon-AV。原有的ZB膜也发展为3种亚类:属物理吸附膜的如商品Hybond N;属阳离子吸附膜的如商

品Hybond N⁺,以及属共价结合的所谓活化ZB膜。此外,已获专利,属共价结合纸的氰尿酸氯活化纸(简称CCA纸)也正在推广中。值得提出的是,Yom和Bremel^[15]用常规复印纸作为印渍纸,也能用免疫印渍术成功地定量检出牛 α S1-酪蛋白。

用印渍术进行生化检测,进展十分迅速。例如:用⁵⁴Fe检出肝、肾、肠等组织抽提液的PAGE谱上铁结合蛋白^[16];用放射性磷脂检出印渍谱上磷脂结合蛋白^[17];用Cr³⁺化学诱发DNA-蛋白质复合物之形成,再用印渍法检出,使当代与基因调控有关的DNA结合蛋白类的研究,既快速、简便、又有效;用含有NP-40的缓冲液使印渍纸上已变性的蛋白激酶恢复活性,并自动磷酸化^[18];用70℃高温印渍,使G蛋白 γ 亚单位的检出灵敏度比常法提高20倍^[19];在常规印渍缓冲液中增加2 mmol CaCl₂,可提高钙调蛋白检出灵敏度20倍^[20];利用不变性酸性凝胶可有效印渍并检出碱性蛋白质等等。

在新的印渍方法研究方面,值得重视的有日本Nagano等人^[21]提出的,在印渍纸上培养细菌,再把它用于cDNA克隆的巧妙方法;Kost等人^[22]用低强度超声波(1 MHz; 2.5 W/cm²)振荡3 min,就能使蛋白质从凝胶转到印渍纸上;Hunger等人^[23]把一种“接触拷贝法(contact-copy procedure)”引入印渍术,能连续定量测定来自蛋白质印渍的抗原;Pont-Lezica和Varher更是别出心裁设计出一种把植物组织切面直接按印到印渍纸上,使富含半胱氨酸的蛋白质能特异性显色,并因此称之为“组织印刷术(tissue printing)”。

参 考 文 献

- 1 范培昌. 生物大分子印渍技术与应用, 上海: 上海科技文献出版社, 1989: 1~289
- 2 Matsudaira P. J Biol Chem, 1987; **262**: 10036
- 3 Xu Q, Shively J E. Anal Biochem, 1988; **170**: 19
- 4 Moos M. Anal Biochem, 1988; **253**: 6005
- 5 Atherton D, Fernander J, Mische S M. Anal Biochem, 1993; **212**: 98

- 6 Rein D F, Speicher D W. *Anal Biochem*, 1994; **216**: 213
- 7 许阿莲, 周晓音, Harn D A. *生物化学与生物物理进展*, 1992; **19** (1): 41
- 8 Engler-Blum G, Meier M, Frank J *et al.* *Anal Biochem*, 1993; **210**: 235
- 9 范培昌, 刘家英. 第二届全国生物分析化学学术会议论文集. 重庆, 1994: 103~106
- 10 Eriksson K-O, Palm A, Hjerten S. *Anal Biochem*, 1992; **201**: 211
- 11 Murata H, Takao T, Anahara S *et al.* *Anal Biochem*, 1993; **210**: 206
- 12 Kapfhammer J P. *Anal Biochem*, 1991; **193**: 197
- 13 梁晓方, 范培昌. 第五届全国生物膜学术会议论文摘要集. 海口, 1993: 314
- 14 Lauriere M. *Anal Biochem*, 1993; **212**: 206
- 15 Yom H-C, Bremel R D. *Anal Biochem*, 1992; **200**: 249
- 16 Chen Y, Drysdale J. *Anal Biochem*, 1993; **212**: 47
- 17 Weber G, Schwamberger G, Ferber E. *Anal Biochem*, 1993; **209**: 251
- 18 Shackelford D A, Zivin J A. *Anal Biochem*, 1993; **211**: 131
- 19 Robishaw J D, Balcueva E A. *Anal Biochem*, 1993; **208**: 283
- 20 McKeon T A, Lyman M L. *Anal Biochem*, 1991; **193**: 125
- 21 Nagano Y, Matsuno M, Sasaki Y. *Anal Biochem*, 1993; **211**: 197
- 22 Kost J, Liu L-S, Ferreira J *et al.* *Anal Biochem*, 1994;

216: 27

- 23 Hunger H-D, Schmidt G, Flachmeier C. *Anal Biochem*, 1994; **217**: 98

The Broad Applications of Protein Blotting.

Fan Peichang, Liu Jiaying (*Department of Biology, East China Normal University, Shanghai 200062, China*).

Abstract The research on the protein blotting was fruitful during the past few years. This review summarizes the literature relating to the application of protein blotting in the fields as following: solid-phase sequence analysis of proteins, clinical differential diagnosis of various virulence antigens or antibodies in human serum or urine, capillary column chromatography and preparative capillary electrophoresis of macromolecular biomaterials, purification of monoclonal antibodies or monoepitopic antibodies, and detection of proteins and enzymes using various antibodies or ligands.

Key words blotting, protein, sequence analysis of protein, clinical differential diagnosis

更 正

“线粒体参与氧自由基代谢的功能”一文(1995, 22 (2): 180)的英文摘要第9行“……while that from the substrate side……”. 应改为“……while that from the oxygen side……”. 以上错误是作者造成的, 敬请原谅.

[徐建兴]