

技术与方法

电转移中蛋白质的透膜现象
及其对蛋白质印迹结果的影响

董燕 张枫 梅柱中 刘斌 孙志贤*

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 探讨了电转移中蛋白质的透膜现象及其对蛋白质印迹结果的影响。采用抗凋亡抑制蛋白-Survivin 的抗体, 对细胞裂解液进行蛋白质印迹。与常规操作方法不同之处是: 在电转移的凝胶“三明治”中, 重叠放置两张硝酸纤维素膜。电转移后, 对两张膜同时进行免疫印迹。在特定的转移条件下, 两张膜的免疫印迹都出现了 Survivin 蛋白的特异印迹带, 证实了电转移中存在着蛋白质的透膜现象。转移时间、电流强度和蛋白质的分子量, 都是影响蛋白质透膜的相关因素。电转移中蛋白质的透膜, 可以产生“印迹复制失真”的效应, 从而最终影响蛋白质印迹定性和定量的结果。所得实验结果和结论, 揭示了蛋白质印迹技术方法学中一个需要加以充分关注的问题。对于科学掌握和应用该技术具有积极作用。

关键词 蛋白质, 电转移, 免疫印迹

学科分类号 R446.62

蛋白质印迹 (Western blot) 技术结合了凝胶电泳高分辨率和免疫反应高灵敏度、高特异性的优点, 是蛋白质性质和功能分析研究的有效方法。20 余年来, 这一技术方法在生命科学研究领域中得到广泛的应用。最近, 我们采用蛋白质印迹技术, 在对抗凋亡抑制蛋白-survivin 的单克隆抗体 (McAb) 进行鉴定时, 发现了电转移中蛋白质的透膜现象, 并因此导致了对某些抗体鉴定的假阴性结果。为此, 我们做了进一步的实验观察, 以求对上述现象能有比较全面、明确的认识。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与材料

抗 Survivin 蛋白 (C-19) 多克隆抗体为美国 Santa Cruz 公司产品, 抗重组 survivin 蛋白单克隆抗体 (McAb) 3D6 为自行制备^[1], 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗羊/鼠 IgG 为美国 Jackson 公司产品, 化学发光底物 (Super signal west pico) 及蛋白质定量试剂盒 (BCA) 为美国 Pierce 公司产品, 预染蛋白质 Marker 为 Bio-lab 公司产品, 0.45 μm 硝酸纤维素 (NC) 膜以及 Hoefer miniVE 垂直电泳转移装置系统为 Amersham pharmacia 生物技术公司产品。肿瘤细胞株 Molt-4、Jurkat、HeLa 为本室传代培养, 激活的人外周血淋巴细胞 (经含植物凝集素 (PHA) 5 mg/L、IL-2 400 U/ml、

10% 小牛血清的 1640 培养液体外培养)。

1.2 细胞裂解液的制备

按照文献 [2] 方法略做改动: 收集体外传代培养的细胞, 经 PBS 洗涤、离心后, 弃上清液, 按 $2 \times 10^7/\text{ml}$ 加入预冷的三去污剂裂解缓冲液, 4℃ 裂解细胞 30 min, 冰浴超声剪切 DNA, 12 000 r/min 低温离心收集裂解细胞上清液, 用 BCA 试剂盒进行蛋白质定量。

1.3 蛋白质印迹

将细胞裂解液样本进行 13% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE), 电泳后的凝胶对 NC 膜电转移 (转移缓冲液为 25 mmol/L Tris、192 mmol/L 甘氨酸、20% 甲醇, pH 8.3)。与常规方法的不同之处是: 在电转移的凝胶“三明治”中, 重叠放置两张 NC 膜。转移电流: 100~180 mA, 转移时间: 0.5~1.5 h。转移后, 按常规方法对两张 NC 膜同时进行固相免疫反应。一抗为抗 Survivin 多克隆抗体 (1: 800 稀释) 或 McAb 3D6 (1: 1000 稀释腹水), 二抗为 HRP 标记的抗羊/鼠 IgG (1: 2000~1: 3000 稀释), 化学发光底物显示免疫印迹结果。

* 通讯联系人。

Tel: 010-66931218, E-mail: sunzx@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2001-09-03, 接受日期: 2001-10-18

2 结果和讨论

2.1 电转移中 survivin 蛋白的透膜现象

图 1 是抗 Survivin 蛋白多克隆抗体对 Molt-4 肿瘤细胞裂解液的蛋白质印迹结果. 第一张 NC 膜 (直接覆盖在凝胶上) 的免疫印迹, 可见 16.5 ku Survivin 蛋白的特异印迹带 (图 1a); 第二张 NC 膜 (覆盖在第一张 NC 膜上) 的免疫印迹, 也同样重叠出现了 Survivin 蛋白的特异印迹带 (图 1b). 由此可知, 在电转移的过程中, Survivin 蛋白无疑是透过了第一张 NC 膜以后, 才有可能被吸附在第二张 NC 膜上, 并与特异性抗体发生结合反应. 证明电转移中确实存在着 Survivin 蛋白的透膜.

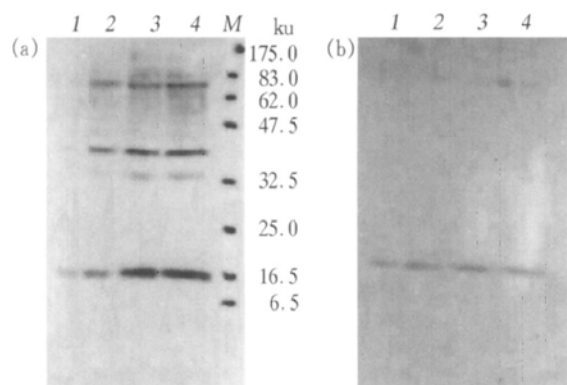


Fig. 1 Western blotting analysis of Molt-4 cell lysate with polyclonal antibody against survivin

(a) Western blotting result of first NC membrane, b: Western blotting result of second NC membrane. electric current: 110 mA, transfer time: 1 h, primary antibody: survivin polyclonal antibody, loading protein in lane 1 ~ 4 are 10, 20, 30 and 40 μ g respectively, M: protein marker.

为了了解电转移中蛋白质的透膜是否为一共性现象? 我们另外采用了国产电泳转移装置 (北京六一仪器厂) 以及不同性质的进口 PVDF 膜、尼龙膜和国产 0.2 μ m NC 膜进行了电转移和免疫印迹, 都得出了与图 1 类似的结果 (结果未列出). 因此说明, 电转移中蛋白质的透膜现象, 与转移装置本身及上述膜材料的性质无关.

Towbin 等^[3]在 1979 年首先创立了将蛋白质从电泳凝胶电转移到 NC 膜上的技术. 当时, 他采用对电转移时第二张 NC 膜染色的方法, 对蛋白质是否发生透膜的问题进行了探讨. Towbin 所得出的结论是: 如果超过 0.15 μ g/ mm^2 NC 膜的吸附容量, 则可见到“过载”蛋白质的透膜. 在我们的实验结果中, 即使是上样蛋白质量少至仅 10 μ g (对

于蛋白质印迹实验, 通常建议细胞裂解液上样的蛋白质量 > 30 μ g) 的泳道, 也同样发生了 Survivin 蛋白的透膜. 因此, 我们认为: 不仅仅是“过载”的蛋白质才会发生透膜, 蛋白质含量不是蛋白质透膜的唯一因素. 已有的文献报道, 蛋白质与 NC 膜之间不是共价结合, 但具体的结合原理尚不十分清楚, 可能与疏水作用有关^[4]. 根据我们的实验结果推测, NC 膜对蛋白质的吸附是一种非共价的可逆结合, 在电场的作用下, 被转移至 NC 膜上的蛋白质, 在继续向阳极方向迁移中穿过了 NC 膜.

2.2 蛋白质透膜的影响因素

2.2.1 转移时间的影响:

图 2 是不同转移时间条件下, McAb 3D6 对 Molt-4 肿瘤细胞裂解液的蛋白质印迹结果. 需要说明的是, McAb 3D6 除了能够结合 16.5 ku 的 Survivin 蛋白以外, 还与约 50 ku 的未知蛋白发生强交叉反应 (可能是由于不同肽段中存在着相同抗原决定簇的原因). 我们正好利用 McAb 3D6 的这一反应特性, 观察了不同转移时间条件下, 蛋白质透膜而导致免疫印迹图谱动态变化的多重信息.

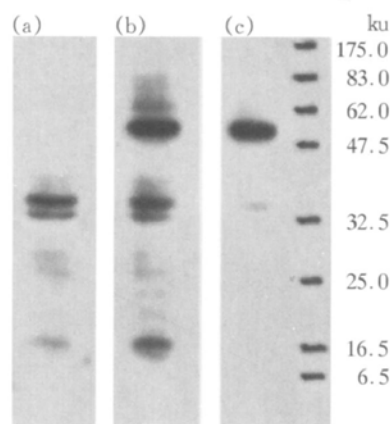


Fig. 2 Length of electrophoretic time affected Western blotting

(a), (b) and (c) corresponding to 0.5, 1 and 1.5 h under the same electrophoretic transfer conditions. electric current: 110 mA, loading protein: 20 μ g, primary antibody: McAb 3D6 to survivin.

从图 2 可以看到: Survivin 蛋白的特异印迹带由弱到强、再到消失的动态变化. 在转移时间最长的 1.5 h (图 2c), Survivin 蛋白的特异印迹带完全消失, 也就意味着 Survivin 蛋白发生了完全的透膜丢失, 从而导致了蛋白质印迹的假阴性结果. 此前, 曾因相似的情况, 我们也得到 McAb 鉴定的假阴性结果. 在发现电转移中存在蛋白质的透膜现象之

后, 当我们把转移时间由 2 h 缩短到约 40 min, 原来蛋白质印迹为阴性反应的 3 株 McAb, 都得到了阳性反应结果. 由此证明, 转移时间是影响蛋白质透膜程度以及蛋白质印迹结果的重要因素.

另外的实验还显示: 在转移 0.5 h 时, 虽然凝胶中蛋白质转移的程度尚不完全, 但已经开始发生了少量 Survivin 蛋白的透膜 (结果未列出). 这提示我们: 蛋白质透膜是伴随转移的持续过程. 曾有观点认为: 延长电转移时间是获得蛋白质充分转移的最简单的方法. 而从蛋白质透膜的角度来看, 这种观点是片面的.

2.2.2 蛋白质分子质量的影响: 从图 2 可以得到的另一个信息是: 蛋白质分子质量与蛋白质转移速率及透膜速率的关系. 转移 0.5 h, 已有部分 16.5 ku Survivin 蛋白转移到了膜上, 而由于蛋白质分子质量与转移速率成负相关, 所以, 约 50 ku 的免疫交叉反应蛋白转移相对缓慢, 尚未能出现在膜上 (图 2a); 转移 1.0 h, Survivin 蛋白特异印迹带的强度有所增加, 同时, 免疫交叉反应蛋白也已经转移到了膜上 (图 2b); 转移 1.5 h, 此前已经转移到 NC 膜上的 Survivin 蛋白, 因持续迁移而完全透膜丢失, 而约 50 ku 的免疫交叉反应蛋白仍然保持在膜上 (图 2c). 由此说明, 蛋白质的透膜速率与转移速率一样, 同蛋白质分子质量的大小呈负相关. 这个结论提示我们, 采用蛋白质印迹分析低分子质量蛋白质时, 转移时间的控制尤为重要. 关于蛋白质与 NC 膜之间的亲和力是否与其分子质量的大小有关, 我们尚不能得出明确结论. 但有文献报道, 转移的低分子质量蛋白质在洗膜过程中易于丢失^[5].

2.2.3 电流强度的影响:

图 3 是不同转移电流条件下, McAb 3D6 对 Molt-4 肿瘤细胞裂解液的蛋白质印迹结果. 在同一转移时间条件下, 由于转移电流强度的不同, 蛋白质印迹的结果出现了明显差别. 图 3b 与图 3a 相比, Survivin 蛋白的特异印迹带消失. 不难推测, 由于较高的转移电流, 加快了 Survivin 蛋白的透膜速率, 导致了 Survivin 蛋白的完全透膜丢失. 由此证明: 转移电流的高低, 与蛋白质的透膜速率成正相关. 采用较高的转移电流, 容易造成低分子量蛋白质的完全透膜丢失.

我们知道, 蛋白质是以电场为驱动力进行电泳和定向转移的, 从本质上说, 电转移就是一种改变方向和支持物的电泳. 所以, 不难理解, 凡是与蛋

白质电泳迁移率相关的影响因素, 也都是蛋白质转移和透膜的影响因素. 这些因素通过影响蛋白质的透膜速率和程度而最终影响蛋白质印迹的结果.

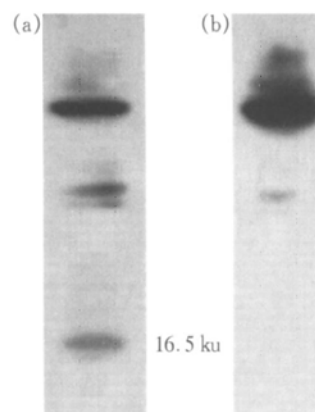


Fig. 3 Electric current affected the result of Western blotting

(a) current 100 mA; (b) current 180 mA. transfer time: 1 h, loading protein: 20 μ g, primary antibody: McAb 3D6 to survivin.

2.3 蛋白质透膜对蛋白质印迹结果的影响

图 4 是 McAb 3D6 对不同细胞裂解液的蛋白质印迹结果, 检测的目的是了解 Survivin 蛋白在不同细胞中的表达情况. 如果仅从第一张 NC 膜的免疫印迹结果 (图 4a) 来看, 得到的结论是: Jurkat 细胞为 Survivin 蛋白表达阳性, 而 HeLa 细胞与活化的淋巴细胞为 Survivin 蛋白表达阴性. 但是, 第二张 NC 膜的免疫印迹结果 (图 4b) 则显示: 三种细胞 Survivin 蛋白的表达均为阳性, 且以活化淋巴细胞的表达程度较高. 通过两张膜的相互印证, 无可置疑, 第一张 NC 膜上 Jurkat 细胞的 Survivin 蛋白发生了大部分透膜丢失, 而 HeLa 和活化淋巴细胞

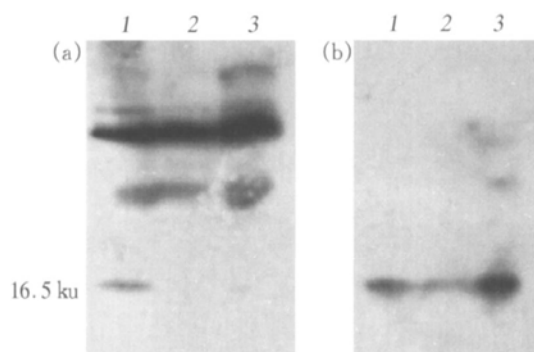


Fig. 4 The effects of protein blowthrough in Western blotting analysis

(a) Western blotting result of the first NC membrane; (b) Western blotting result of the second NC membrane. Lane 1 ~ 3 are corresponding to cell lysate of Jurkat cell, HeLa cell and activated peripheral blood lymphocyte. Each lane contained about $3 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ cells, transfer time: 1 h, current: 110 mA, primary antibody: McAb 3D6.

胞的 Survivin 蛋白则完全透膜丢失. 由于转移中蛋白质的透膜, 对蛋白质印迹定性与定量的结果都产生了显著的影响.

最近, 我们查阅了 Towbin 和 Burnette^[6]在最初创建和改进蛋白质印迹技术时的文献报道, 他们在考察电转移的蛋白质印迹是否具有复制真实性的问题时, 分别采用了分离的鸡肝核糖体亚基蛋白和 C¹⁴标记的蛋白质 Marker 做为实验样本, 通过观察, 得出“蛋白质印迹具有复制忠实性”的结论. 但是, 值得注意的是: Towbin 所用核糖体亚基蛋白样本, 是属于相对分子质量范围较均一的低分子质量蛋白质, 所以能够在 1 h 内, 将这些蛋白质比较均速地转移到 NC 膜上, 加之染色观察方法灵敏度的限制, 因而没能发现较长转移时间产生的蛋白质透膜效应. Burnette 所用 ¹⁴C 标记的蛋白质 Marker, 虽然具有较广泛的分子质量范围 (12.3~97.4 ku), 并进行了 22~24 h 的长时间转移 (因为发现 1 h 无法将较高分子质量的蛋白质 Marker 转移完全), 但由于每种蛋白质 Marker 的含量远远高于通常细胞裂解液样本中被检靶蛋白的含量, 因此, 透膜丢失的蛋白质 Marker 仅为上样蛋白质 Marker 的一部分, 凝胶中尚有足量的蛋白质 Marker 能够持续不断转移补充到 NC 膜上去, 以至没有发生某种蛋白质 Marker 的完全透膜丢失. 正如我们的实验所见, 经免疫印迹证实 Survivin 蛋白已经完全透膜丢失的 NC 膜上, 却仍然可以清楚地看到相同分子质量的预染蛋白 Marker 的存在. 实际上, Towbin 和 Burnette 在当时已经发现, 印迹膜上蛋白质的含量存在一定的误差. 特别是 Burnette 曾观察到: 在转移后 0.45 μ m 的 NC 膜上, 12.5 ku 低分子质量蛋白质 Marker 的含量, 比在其他孔径的 NC 膜上少 20%~30%. 但是, 他们没有进一步去考察和解释其原因. 鉴于他们所用实验样本材料的局限性, 其结论并不能符合所有实验样本的情况. 由此, 也给了我们另外一个启示: 即样本中被检靶蛋白的含量越少, 转移时该蛋白质因透膜而发生完全丢失的几率越大. 所以, 对转移条件的控制越需严格.

从图 2 还可看出, 由于不同分子质量蛋白质转移速率和透膜速率的差别, 实际上, 很难将分子质

量差别范围大的细胞裂解液蛋白同时转移并完全保留在 NC 膜上. 从这个角度来说, 蛋白质透膜可以导致印迹复制的失真, 进而最终影响蛋白质印迹定性与定量的结果.

综上所述, 由于电转移的蛋白质同时存在转移速率和透膜速率两个变量的交互作用, 必然产生复杂的动力学后果. 这提示我们, 根据具体实验目的去适当控制电转移的条件, 是蛋白质印迹技术中不可忽视的重要因素.

本文通过实验观察, 证实了电转移中存在着蛋白质的透膜现象, 并对照分析了蛋白质透膜的多种影响因素及其对蛋白质印迹结果的影响, 揭示出蛋白质印迹技术方法学中一个需要加以充分关注的问题, 对于该技术的科学掌握和应用具有积极的作用. 当然, 我们更期待着能够发现既使用简便、而又不存在转移时蛋白质透膜现象的印迹材料. 倘若如此, 将会使蛋白质印迹技术发挥更加完美的应用价值.

参 考 文 献

- 1 董燕, 梅柱中, 刘斌, 等. 抗凋亡抑制蛋白-survivin 单克隆抗体的制备. 免疫学杂志, 2001, 17 (4): 308~311
Dong Y, Mei Z Z, Liu B, et al. J Immunol, 2001, 17 (4): 308~311
- 2 J. 萨姆克拉克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯著. 金冬雁, 梨孟枫译. 分子克隆实验指南. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1992. 870~873
Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992. 870~873
- 3 Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76 (9): 4350~4354
- 4 张龙祥, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术. 第二版. 北京: 高等教育出版社, 1997. 403~405
Zhang L X, Zhang T F, Li L Y. Method and Technology of Biochemical Experiment. 2nd. Beijing: Higher Education Press, 1997. 403~405
- 5 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术. 北京: 高等教育出版社, 1993. 403~404
Lu S D. Contemporary Experimental Methods in Molecular Biology. Beijing: Higher Education Press, 1993. 403~404
- 6 Burnette W N. "Western blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Anal Biochem, 1981, 112: 195~203

Protein Blowthrough in Electrophoretic Transfer and Its Effects on Western Blotting

DONG Yan, ZHANG Feng, MEI Zhu-Zhong, LIU Bin, SUN Zhi-Xian*

(*Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China*)

Abstract To elucidate the phenomenon of protein blowthrough in electrophoretic transfer and its effects on Western blotting. Using survivin antibody (a novel inhibitor of apoptosis protein), several kinds of cancer cell lysate were analyzed by Western blotting. Comparing with the traditional transfer method, two pieces of nitrocellular membranes were applied in the transfer “sandwich”. Then these two membranes were analyzed by Western blotting under same conditions. In some electrophoretic transfer circumstances, the specific Western blotting band corresponding to survivin were detected in both of them. This revealed the phenomenon of protein blowthrough in electrophoretic transfer. The length of transfer time, electric current and the molecular mass of targeted protein all affected the effects of protein blowthrough. Protein blowthrough will lead to “blotting distortion” and affect the result of quantitative analysis and qualitative analysis in Western blotting. The result revealed an important problem which required to pay more attention to in Western blotting. And it will make some help for scientifically mastering and using this technique.

Key words protein, electrophoretic transfer, Western blotting

* Corresponding author. Tel: 86-10-66931218, E-mail: sunzx@nic.bmi.ac.cn

Received: September 3, 2001 Accepted: October 18, 2001