

(3) 用抗被检蛋白抗体的抗体进行吸附, 这种方法用于下列两种情况: ①第一抗体的 FC 不能被葡萄球菌蛋白质 A 识别; ②对被检蛋白进行定量分析时。

操作过程:

(1) 将上述细胞裂解液等分放入两支微量离心管中, 用 NET - gel buffer 调节体积使其为 0.5ml, 向一个管中加被检蛋白的特异抗体, 向另一个管中加入无关的单克隆抗体。在 0℃ 下轻轻地摇动 1 小时。

NET - gel buffer:

50mmol/L Tris·Cl (pH7.5)

150mmol/L NaCl

0.1% NP - 40

1mmol/L EDTA (pH8.0)

0.25% 白明胶

0.02% 叠氮钠

抗体的用量取决于抗原的浓度及抗体的滴度。一般来说对转染的哺乳类细胞提取液进行免疫沉淀时, 需要 0.5 ~ 5 μ l 多克隆抗血清或 5 ~ 100 μ l 杂交瘤组织培养液或 0.1 ~ 1.0 μ l 腹水。如果抗体的用量过多, 则增加非特异性的背景。

用 NET - gel buffer 稀释细胞抽提液可降低非特异的背景, 但表面活性剂浓度过高则导致蛋白质的部分变性或降解。

(2) 如果被检蛋白抗体不能有效地与蛋白质 A 结合, 可加适当量的抗免疫球蛋白抗体, 并继续在 0℃ 下轻轻地摇动 1 小时。

(3) 向抗原 - 抗体混合液中加入蛋白质 A - Sepharose 于 4℃ 下轻轻地摇动 1 小时。

所需蛋白质 A - Sepharose 的量应作预试验来确定, 一般来说, 1ml 包装的已膨胀的蛋白质 A - Sepharose 至少能结合 20mg 的 IgG; 1ml 标准的 10% 悬浮的 *S. aureus* 细胞能结合 1mg 免疫球蛋白。

(4) 于 4℃ 下离心 1 分钟, 10 000r/min, 吸去上清液, 加 1ml 洗涤 buffer 重悬 Sepharose, 共洗 3 次, 前两次用 NET - gel buffer 洗, 最后用 10mmol/L Tris·Cl (pH7.5) 0.1% NP - 40 洗 1 次。

(5) 于 4℃ 下振荡 20 分钟, 离心 10 000r/min, 弃上清液。

(6) 向沉淀中加 30 μ l IX SDS gel - Loading buffer

IX SDS gel - Loading buffer:

50mmol/L Tris·Cl (pH6.8)

100mmol/L dithiothreitol

2% SDS

0.1% 溴酚蓝

10% 甘油

(7) 100℃ 加热 3 分钟, 离心, 10 000r/min, 收集上清液至一新管中。

(8) 标记蛋白质的放射自显影分析

将上述收集的上清液进行 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳; 干胶; 压片; 放射自显影。详细操作过程见本书其它有关章节。

13.4.3 Western 印迹检测表达蛋白质

Western Blotting 是 70 年代末 80 年代初, 在蛋白质凝胶电泳和固相免疫测定的基础上发展起来的, 它结合了凝胶电泳分辨力高和固相免疫测定的特异敏感等多种优点, 与免疫沉淀法比较, 这种方法无需对靶蛋白进行同位素标记。Western blotting 具有从混杂抗原中检测出特定抗原, 或从多克隆抗体中检测出单克隆抗体的优越性, 还可以对转移到固相膜上的蛋白质进行连续分析, 具有蛋白质反应均一性, 固

相膜保存时间长等优点,因此该技术被广泛地用于蛋白质研究,基础医学和临床医学的研究。

13.4.3.1 哺乳细胞的裂解

(1) 用 PBS 洗 2 次细胞,加 $1 \times$ SDS 加样缓冲液 (50mmol/L Tris·Cl pH6.8, 100mmol/L 二硫苏糖醇, 2% SDS, 0.1% 溴酚蓝, 10% 甘油) 至培养皿中,用橡胶刮子刮下细胞,由于染色体 DNA 的释放,使溶液变得很粘稠,将细胞裂解液吸入一微量离心管中。

(2) 沸水煮 5~10 分钟。

(3) 用超声波打碎染色体 DNA,直至溶液不粘为止。

(4) 室温下离心 10 分钟, 10 000r/min, 取上清液至 1 个新的离心管中。

(5) 如果条件允许,测定蛋白质的浓度。

Western blotting 检测蛋白的敏感性为 1~5ng, 0.75mm 厚的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶的一个孔大约能上 100 μ g 的总蛋白。所以,只要被检蛋白占总蛋白量的 1/10⁵,即可被检测出来。如果所分析的样品为未知时,应同时作阳性对照。

(6) 对上述细胞抽提液进行 SDS-PAGE 分析 (详细步骤见有关章节)。

13.4.3.2 蛋白质的电转移

很多膜可作为蛋白质电转移的固相支持物,如重氮化纤维素膜 (DTP, DBMO), 离子交换纸 (DE-AE-纤维素), 阳离子化尼龙膜等,但目前在 Western 印迹中,最常用的还是硝酸纤维素膜 (NC 膜),它与蛋白质以共价键结合,其结合与疏水作用有关,结合能力为 80 μ g/cm²,与其它膜相比,不要预先活化,对转移物质生物活性影响较小,能应用多种阳离子染料染色,非特异性的显色浅,来源较方便、价格也较低。但转移的小分子蛋白洗涤过程中易于丢失,应予以注意。

操作过程:

(1) 剪 6 块 3MM 滤纸和一块硝酸纤维素膜,其大小应与 SDS-凝胶的大小相同。如果纸或膜比凝胶大,在转移过程中会形成短路。这将影响蛋白质的转移。

注意:当用手触摸胶,3MM 滤纸及纤维素膜时均应戴手套,因为皮肤上的油和分泌物会影响蛋白质从胶上转移到膜上。

(2) 将剪好的 3MM 滤纸及纤维素膜在转移缓冲液中浸泡 3~5 分钟。

转移缓冲液: 48mmol/L Tris·Cl

39mmol/L 甘氨酸

0.037% SDS

配制 1 000ml 转移缓冲液 (pH8.3): 取 2.9g 甘氨酸, 5.8g Tris, 0.37g SDS, 加水至 1 000ml。

(3) 按下列过程安装转移装置:

1) 将塑料支架平放在含有转移缓冲液的托盘中,在塑料支架上放一块海绵。

2) 将 3 块 3MM 滤纸对齐放在海绵上,依次放置纤维素膜、凝胶。另外 3 块 3MM 滤纸及海绵。在放置每一层时,均要去除它们之间的气泡,若有气泡残留,则影响转移效果。

3) 最后用塑料支架夹紧上述各层,放入电转移槽内,注意纤维素膜一侧靠正极,胶一侧靠负极:

(4) 接通电源,电压 40V 电流 0.17~0.2A,转移 1.5~6 小时,转移时间可根据靶蛋白的大小来定,蛋白质分子量小则需时短,蛋白质分子量大需时长。

(5) 转移结束后,取出塑料支架,依次去掉各层,用铅笔在膜的上缘作好标记,切下其中一个孔所对应膜的 1/2,用氨基黑染色 30 秒,10% 乙酸脱色,检查转移是否完全;也可将转移后的凝胶作考马斯亮蓝染色来检查转移效果。

(6) 将其余的纤维素膜放在一张干净的 3MM 滤纸上,室温下干燥 30~60 分钟。

干燥可使蛋白质更牢固地结合在膜上,但是干燥也可能会导致蛋白质的更进一步变性从而影响其免疫反应性。

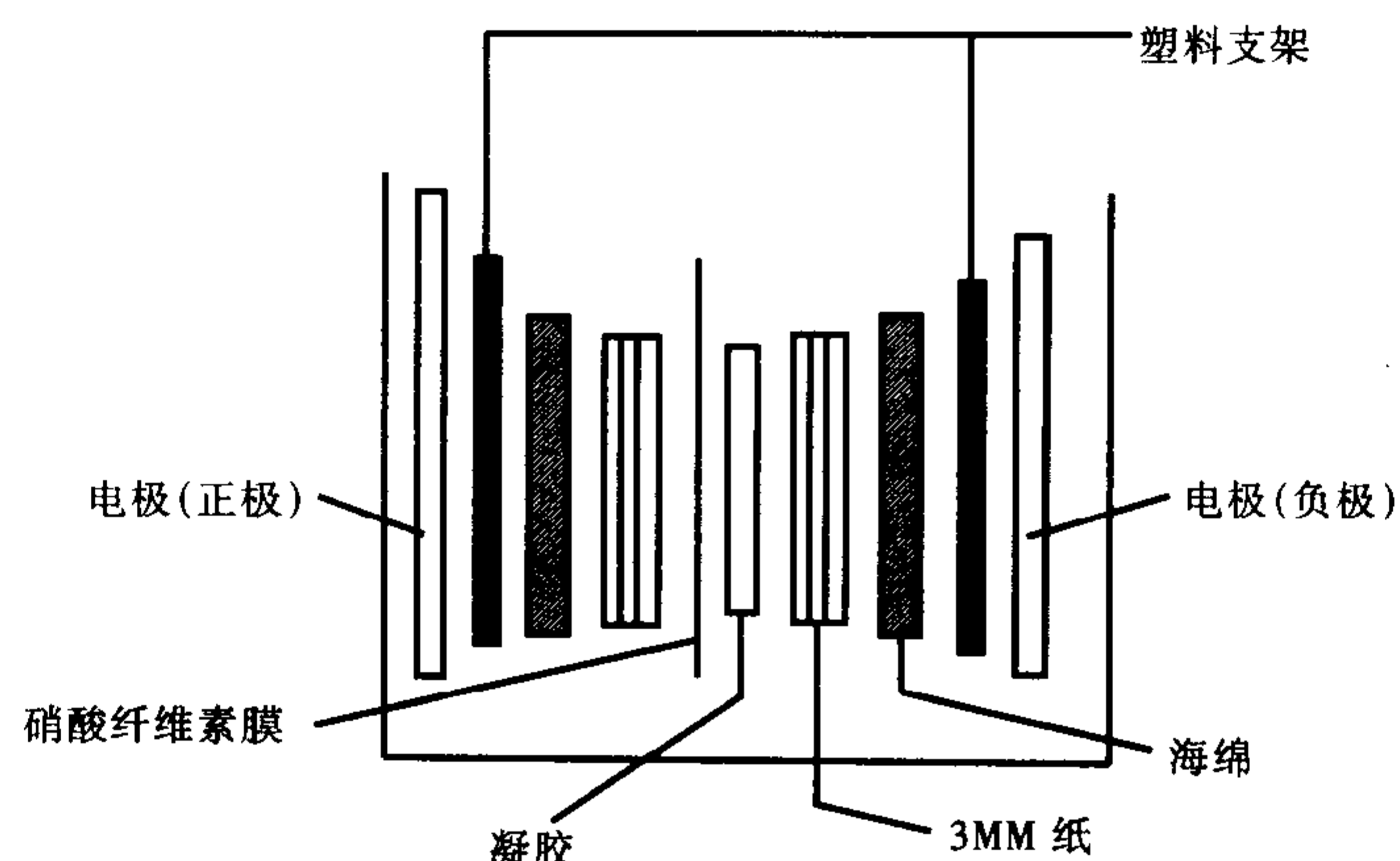


图 13-5 电转移装置示意图

13.4.3.3 封闭

免疫试剂中作为探针的蛋白质（抗体）如同电转移中蛋白质能结合到硝酸纤维素膜上一样，也能结合到纤维素膜上。Western blotting 的敏感性取决于对一些无关蛋白质的潜在结合位点的封闭。一般用去脂奶粉封闭最好，也可用血清白蛋白。

将硝酸纤维素膜放在一平皿中，加封闭液（其量以浸过膜即可）。室温下轻轻振荡 2~3 小时。

封闭液：1% (W/V) 去脂奶粉，溶于 PBS 中

0.01% antifoam A

0.02% 叠氮钠

如果非特异背景仍然很高，可向封闭液中加入 Tween 20 使其终浓度为 0.02%，通常情况下 Tween 20 的存在并不影响抗体与靶抗原的结合。

13.4.3.4 靶蛋白与第一抗体反应

(1) 第一抗体溶液的配制：用封闭液稀释第一抗体。抗体的稀释度要由预实验来定，下列数值可作为参考

多克隆抗体：1:100 到 1:5 000

培养的杂交瘤细胞上清液：可稀释到 1:100

小鼠腹水：1:1 000 到 1:10 000

(2) 封闭结束后，将纤维素膜放入一塑料袋中，按每平方厘米膜加 0.1ml 第一抗体溶液，去除袋内的所有气泡，用封膜机封上开口，4℃下轻轻振荡 2 小时。

据报道，在室温下延长孵育时间可增加靶蛋白的检出率，但同时也增加了非特异性结合的背景。

(3) 剪开塑料袋，弃去反应液，用 PBS 洗 3 次，每次 10 分钟。

13.4.3.5 与第二抗体反应

一般所用的第二抗体（抗免疫球蛋白或蛋白质 A）为酶标抗体，如辣根过氧化物酶标抗体或碱性磷酸酶标抗体。

(1) 将膜从 PBS 中转入 150 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris·Cl (pH7.5) 的溶液中，室温下轻轻振荡 10 分钟。

该步骤目的是去除纤维素膜上的磷酸及叠氮钠。

(2) 将膜放入一塑料袋中，加第二抗体溶液，每平方厘米膜加 0.1ml。

第二抗体溶液：

将酶标抗体用下述溶液稀释：

1% (W/V) 去脂奶粉

150 mmol/L NaCl

50 mmol/L Tris·Cl (pH7.5)

第二抗体的稀释度一般为: 1:200 到 1:2 000

(3) 封好塑料袋, 在室温下轻轻振荡 1 小时

(4) 取出纤维素膜于 150 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris·Cl (pH7.5) 溶液中冲洗 3~5 次, 每次 10 分钟。

13.4.3.6 显色

1. 碱性磷酸酶:

(1) 溶液的配制:

取 0.5g NBT (氮蓝四唑 nitroblue tetrazolium) 溶于 10 ml 70% 的二甲基甲酰胺中。

取 0.5g BCIP (5' - bromo - 4 - chloro - 3 - indoxyl phosphate) 溶于 10ml 100% 二甲基甲酰胺中。

碱性磷酸酶缓冲液

100 mmol/L NaCl

5 mmol/L MgCl₂

100 mmol/L Tris·Cl (pH9.5)

(2) 于 10ml 碱性磷酸酶缓冲液中加 66 μ l NBT 液, 充分混匀, 再加 33 μ l BCIP 液, 混匀。这一混合液必须在 30 分钟以内使用。

(3) 将膜放入上述显色液中, 室温下轻轻摇动。

(4) 注意观察显色反应, 当条带达到所需深度 (~ 20 分钟) 时, 将膜转入 500 μ l 0.5mol/L EDTA (pH8.0) 和 50 ml PBS 的溶液中。

(5) 照像。

2. 辣根过氧化物酶:

(1) 取 6 mg diaminobenzidine tetrahydrochloride 溶于 9 ml 0.01 mol/L Tris·Cl (pH7.6) 中, 加 1ml 0.3% (W/V) 的 NiCl₂ 或 CoCl₂, 此液必须新鲜配制。

(2) 过滤除去沉淀。

(3) 加 10 μ l 30% H₂O₂ 充分混匀。

(4) 将膜放入上述显色液中, 室温下轻轻摇动。

(5) 观察显色反应, 当条带达所需深度时 (1~3 分钟) 立刻用水洗膜, 然后将膜转入 PBS 中。

(6) 照像。

注意:

辣根过氧化物酶显色的条带在阳光下几小时就会褪色。

(刘强远 文 缪时英 审)

参 考 文 献

1. Taniguchi T. Structure and Expression of a Cloned cDNA for Human Interleukin - 2. *Nature*, 1983, 302:305
2. Doodbourn S. The human β - interferon gene enhancer is under negative control. *Cell*, 1986, 45:601
3. 黄翠芬. 遗传工程理论方法. 北京. 科学出版社, 1987
4. 吴乃虎. 基因工程原理. 北京. 高等教育出版社, 1989
5. Takebe Y, et al. SR α promoter: An efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R - U5 Segment of human T - cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. *Mol Cell Biol*, 1988, 8:466
6. Sambrook J, et al. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 2nd. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989