

免疫电镜定位酶的探针—蛋白 A 胶体金复合物 (PA-Au Complexes)的制备和检验*

王美琪 王伟君 张正福

(中国科学院上海植物生理研究所 200032)

60年代初 Feldherr and Marshal 将胶体金作为电镜研究的一种特殊标记物。1971年 Taylor 引进了一种免疫胶体金方法用于电镜工作,从而开始了胶体金应用的新纪元。

在溶液中金颗粒呈圆形,用电镜观察其边缘是平滑、完整、界线十分清楚,使它具有确定性。胶体金的一个重要性质是金颗粒表面带有负电荷,由于静电的排斥力,使胶体金在水中保持稳定状态。如将电解质加入到胶体金溶液中,其离子层围绕金颗粒,金颗粒被压缩,使颗粒间的距离近到临界距离,当颗粒的内聚力出现时,就会产生絮凝现象。在1901年 Zsigmondy 观察了电解质引起胶体金凝结的现象,可在胶体金溶液中预先加入各种蛋白质得到防止,这个重要的发现奠定了用胶体金与蛋白质结合成复合物可作为细胞化学和免疫细胞化学定位酶的探针的应用基础。

由于金颗粒的特性决定了胶体金具有独特的优越性,根据定位对象的分子量大小可制备相应大小的金颗粒、甚至可在一张切片内,用两种不同直径大小的金颗粒作标记物定位两种不同分子量的酶,胶体金不仅可作透射电镜、冰冻蚀刻定位酶的探针,当金颗粒小于 80 nm 时在透射光下呈桔红色,因此它可作光学显微镜的定位酶的探针。

将蛋白 A 与胶体金结合形成 PA-Au 复合物作为探针研究酶的分布定位甚至借助计算机统计,可作酶的精确定量。这项技术成为当今细胞化学和免疫细胞化学研究方法上的突破和最新进展。

为了将 PA-Au 复合物应用于偶联因子(CF₁)免疫学研究,我们按照 Frens^[1]和 J. Roth^[2]M. C. Wang(王美琪)和 I. R. Kennedy^[3]的方法,以 HAuCl₄ 为原料,用柠檬酸三钠还原方法定向制备各种不同直径的金颗粒的胶体金溶液并能成功地将它与蛋白 A 结合,形成 PA-Au 复合物。经检验所制备的 PA-Au 复合物具合格性和使用价值。可作为免疫电镜定位酶的探针。

我们实验室近年来引进和建立了整套的以 PA-Au 复合物为探针的免疫电镜技术,以作者制备的菠菜叶绿体偶联因子(CF₁)专一性抗体(Ab CF₁)染色^[4],已开始应用于偶联因子(CF₁)在叶绿体类囊体膜上的分布状态的研究,并初获结果。这项技术的引进和建立为我国植物、植物生理学领域内在分子水平上精确定位酶的研究提供了新的手段,也为研究光合作用叶绿体类囊体膜上一些关键酶系的精确分布创造了必要的条件。这项新技术有较广阔的应用前景。

材 料 和 方 法

一、胶体金的制备和检验

(一)胶体金的制备 参照 G. Frens^[1]和 J. Roth^[2]的方法制备胶体金,如制备金颗粒直径为 5—12 nm 的胶体金溶液用白磷还原 HAuCl₄,如制备大于

本课题为国家自然科学基金资助项目。

*叶绿体偶联因子(CF₁)免疫学研究 I. 菠菜叶绿体偶联因子专一性的抗体(Ab CF₁)制备,发表在《植物生理学通讯》,1990(6):52—54。

12 nm 直径的金颗粒的胶体金溶液则用柠檬酸三钠还原 HAuCl_4 。我们采用柠檬酸三钠还原 HAuCl_4 的方法, 制备几种不同直径金颗粒的胶体金溶液。

1. 胶体金制备前的条件准备

(1) 净化和硅化所用的一切玻璃容器 为保持胶体金溶液不污染、不损失、不被容器壁所吸附, 实验所需的各种玻璃器皿必须用洗液洗净, 用重蒸馏水冲洗, 待干后用硅烷处理玻璃器皿的内表面, 干后再用重蒸馏水洗一次才能使用。

(2) 所需的各种试剂和溶液全部要用重蒸馏水配制。

2. 制备胶体金的程序

溶液配制: 以 HAuCl_4 为原料, 用重蒸馏水配成 0.01% (W/V) 的 HAuCl_4 的溶液, 新配制 1% (W/V) 柠檬酸三钠 (trisodium citrate)。

以制备直径为 (18.72 nm) 胶体金溶液为例加以说明: 取 15 ml 0.01% HAuCl_4 溶液放入大试管内, 将试管放置在水浴锅内加热并煮沸 (最好采用可调温度的恒温水浴锅) 将 2 ml 1% 的柠檬酸三钠倾注入煮沸的 0.01% HAuCl_4 溶液内再继续加热, 使其混匀、观察颜色变化, 直到反应完全, 颜色变化为深桔红色为止。深桔红色的溶液即胶体金溶液。制备的金颗粒直径的大小以还原剂 1% (W/V) 的柠檬酸三钠的用量多少来控制。

(二) 金颗粒直径大小的测量和检验 1. 测胶体金溶液的最大吸收值的方法: J. Roth^[2]文献对胶体金性质的分析中所报道, 红色的胶体金在可见光谱波

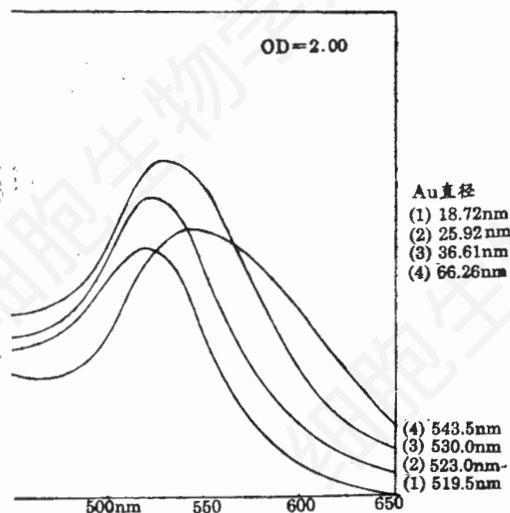


图 胶体金溶液的最大吸收值测定结果

长 520—540 nm 范围之间有一个单一的吸收峰为依据, 用双光路分光光度计 (UV 3000) 实际测定了本实验室最近制备的四种胶体金的最大吸收值, 如图所示: 其最大吸收峰的波长分别为 519.5 nm、523.0 nm、530.0 nm 及 543.5 nm。

2. 用电镜拍照以上四种不同直径大小的金颗粒, 用光镜目测其电镜底片内金颗粒直径的实际长度, 经统计计算可得出胶体金颗粒直径的实际长度, 其结果如表、图版图 1—4 所示。

二、蛋白 A-胶体金复合物 (PA-Au Complexes) 的制备

参考文献 [2] J. Roth 的方法:

1. 制备所需直径大小的胶体金溶液, 选择了两种不同直径的金颗粒, 标号如下: (1) 直径为 18.72 nm。(2) 直径为 25.92 nm。用 (1)、(2) 两种胶体金溶液分别与 Protein A 结合, 形成两种 PA-Au Complexes。结合程序如下所述:

2. 用 0.2 mol/L K_2CO_3 将胶体金的 pH 调到与蛋白 A 的等电点即 pH 6.5。

3. 按照 J. Roth^[2]和 M. Binder (1978) 的方法。首先选择蛋白 A 与胶体金结合的合适用量。经实验选择出约 10 ml 胶体金溶液需用 50 μg (微克) Protein A。

4. 蛋白 A 与胶体金的结合: 以 (1) 号胶体金为例: [(1) 与 (2) 结合方法相同] 取 20 ml 的 (1) 胶体金溶液, 用 0.2 mol/L K_2CO_3 调 pH 到 6.5, 加入 100 μg 蛋白 A 搅匀放置 15 分钟, 加少量 HSA (约 5—10 mg, 将 HSA 配制为 0.5 mg/ml PBS), 使 PA 与 Au 结合。

5. 用超离心方法去除未与 Au 结合的 PA 和不稳定的金颗粒: 将以上 PA-Au 混合物放入 25 ml 离心管, 用 MSE 50 型离心机 SW 25 Rotor 进行两次超离心。第一次 21000 r.p.m. (60000 $\times g$) 在 5 $^\circ\text{C}$, 离心 30 分钟去除上清液, 用 20 ml PBS (1 ml 中含 0.5 mg HSA) 复溶沉淀。第二次 23000 r.p.m. (80000 $\times g$) 5 $^\circ\text{C}$, 40' 将上清液轻轻吸出, 离心管底部沉淀为两层, I、II、将管底 II 部分暗红色的粗颗粒去除, 取 I 部分深红色的、不太紧密的沉淀用 2.5 ml 含有 HSA 的 PBS (0.5 mg HSA/ml PBS) 复溶, 加 0.1% NaN_3 两滴, 放置冰箱内保存。

结果和讨论

一、本实验室能定向地制备所需要的、合格的不同直径的金颗粒的胶体金溶液, 从表

表

| 样品号 | 金胶体最大吸收入 | 用电镜光镜 实测 Au 颗粒直径 | 0.01%HAuCl ₄ 的用量 | 1%柠檬酸三钠用量 |
|-----|----------|---------------------|--------------------------------|------------|
| (1) | 519.5 nm | 小 ↑ 18.72 nm | 15 ml | 多 ↑ 2 ml |
| (2) | 523.0 nm | 25.92 nm | 15 ml | 1 ml |
| (3) | 530.0 nm | 36.61 nm | 15 ml | 0.5 ml |
| (4) | 543.5 nm | 大 ↓ 66.26 nm | 15 ml | 少 ↓ 0.1 ml |

所示:所制备的(1)(2)(3)(4)四种不同直径的金颗粒的胶体金溶液,其实测金颗粒的直径大小值与其测得相应胶体金溶液的最大吸收峰所在的波长值成正比,这与胶体金性质的理论相符合,即金颗粒直径越大则其胶体金的最大吸收峰值往长波方向移动,这可证明四种胶体金是合格的。同时从表所示:在制备胶体金时可固定其0.01%的HAuCl₄的用量,适当变换其还原剂—1%柠檬酸三钠的用量,能能动地制备所需直径大小的金颗粒的胶体金。从箭头所指这规律是:所用的1%柠檬酸三钠用量多少是与形成的金颗粒直径大小成反比。

二、我们能将不同直径的金颗粒的胶体金与蛋白A成功地相结合,形成蛋白A-胶体金复合物(PA-Au Complexes)可作为免疫电镜在分子水平上研究酶分布的新探针,本文已报道了已制备两种不同直径金颗粒(PA-Au Complexes), (即直径为18.72 nm和25.92 nm),并以Au直径为18.72 nm的PA-Au复合物作探针应用于研究偶联因子(CF₁)菠菜叶绿体类囊体膜上的分布,作了初步定位观察,可见所制备的PA-Au复合物具有实用价值。见图版图5—8。

摘 要

我们以HAuCl₄为原料,用柠檬酸三钠还原方法能制备所需直径大小的金胶体溶液,并成功地制备蛋白A-胶体金复合物(PA-Au Complexes),经检验PA-Au复合物具合格性和使

用价值,可作为免疫电镜在分子水平上定位酶的探针。用作者自制的纯的CF₁的抗体(AbCF₁)^[4]以及我们引进和建立整套制备PA-Au复合物和以PA-Au作为探针的免疫电镜技术,现已开始应用于研究偶联因子(CF₁)在叶绿体类囊体膜上分布,获初步结果;为研究叶绿体类囊体膜上关键酶系的精确分布创造了必要的条件。

图 版 说 明

不同直径金颗粒的电镜照片(放大75,000倍)

1. Au直径为18.72 nm 2. Au直径为25.92 nm
3. Au直径为36.61 nm 4. Au直径为66.26 nm

以PA-Au/AbCF₁-IgG标记的菠菜叶绿体超薄切片的电镜图,示CF₁的初步定位。

Au直径为18.72 nm, G表示叶绿体的基粒。

5. 放大75000倍, 7. 放大40500倍

5,7. 金颗粒基本上分布在叶绿体类囊体基粒外膜上,即CF₁基本上分布在叶绿体类囊体基粒外膜上。有少量非特异性反应。

6,8. 对照实验,以PA-Au/正常兔血清-IgG标记的菠菜叶绿体超薄切片的电镜图,没有金颗粒呈现。

6. 放大75000倍, 8. 放大40500倍。

参 考 文 献

- [1] Frens, G., 1972, *Nature Physical Science.*, 241: 20—22.
- [2] J. Roth., 1983, in *techniques in immunocytochemistry*, ed. by G. R. Bullock and P. Petrusz., Vol 2; PP 217—84, Academic Press, London.
- [3] M. C. Wang and I. R. Kennedy., 1988, *Aust. J. Biol. Sci.*, 41: 475—87.
- [4] 王美琪等 1990, *植物生理学通讯*, 6: 52—54.