

蛋白质的印迹法

林斯骏

何全品

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

所谓印迹法就是生物样品(如核酸、蛋白质等)先经过凝胶(琼脂、聚丙烯酰胺等)电泳后,载有样品区带或点子的凝胶通过压片扩散或电泳迁移,把凝胶中分离的样品转移到硝酸纤维素滤纸上,并用一定的探针进行检测的方法。

自从 Southern^[1] 首先建立核酸的印迹法之后, Renart^[2]、 Bittner^[3]、 Bowen^[4] 等许多学者加以应用与改进,使该法更加完善。

印迹法既能保持样品在凝胶分离中的状态,又不受凝胶孔径等的制约(样品已转移到硝酸纤维素滤纸上),有利于样品的分析,因此该法广泛应用于生化、免疫、遗传等领域的研究。

近年来我们在开展大鼠肝及其肝癌染色质非组蛋白研究的过程中,深感非组蛋白种类多,含量少,分离分析均较困难。为此,我们建立了印迹法,准备利用一定的 DNA 做探针来识别和了解它与非组蛋白结合的情况,以便进一步分级分离特异结合的蛋白质。

材料与方 法

一、材 料

小牛胸腺组蛋白(范佩芳同志赠送),人血清白蛋白(上海生物制品所产品),大鼠肝癌(BERH-2)的 DNA 按山岸秀夫等^[5]方法制备的。

硝酸纤维素滤纸(型号为 WX,孔径 0.22 微米,上海医药工业研究院产品)。

二、方 法

1. 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

10%、12.5% 聚丙烯酰胺凝胶(均匀胶)或 10—15% 梯度聚丙烯酰胺凝胶,分别加入 10—20 微克人血清白蛋白,10 微克小牛胸腺组蛋白。电泳装置和电泳

条件参考以前发表的工作^[6,7]。

2. 蛋白质的转移

(1) 夹心法:按 Bowen 法,电泳结束后,取出凝胶片浸泡于转移液(50 mM NaCl、2 mM EDTA、0.1 mM 巯基乙醇和 10 mM Tris-HCl pH 7.0)中两小时,然后作压片,具体作法是以凝胶片为中心,在凝胶片的两边分别依次铺上(贴上)硝酸纤维素滤纸,普通滤纸 3—4 张,泡沫塑料,最后加上多孔的有机玻璃板,用 C 字型轧头夹紧,浸泡于转移液中,让凝胶上的蛋白质扩散到硝酸纤维素滤纸上。

(2) 电泳转移法:按 Towbin 法^[8],装片的方法基本上同(1),所不同的是仅在凝胶片的一侧加硝酸纤维素滤纸,此纸面向阳极,夹好片子后,插入电极槽(19×12×15 厘米)中央,也就是正负极的中央,充满电泳转移溶液(12.5 mM Tris-96 mM 甘氨酸-10% 甲醇)约 2500 毫升,在 80 毫安,室温中电泳 2 小时。

3. 鉴定蛋白质是否从凝胶上转移到硝酸纤维素滤纸上

(1) 染色法:把转移后的硝酸纤维素滤纸在 0.2% 氨基黑-7.5% 三氯醋酸溶液中,染 60 分钟,退色,水洗,烘干。或浸入 0.2% 考马斯蓝溶液(染料溶于醋酸:甲醇:水 = 1:5:5 溶液中),退色,水洗,烘干保存。转移前和转移后的凝胶片也可用氨银染色。

(2) 放射自显影:小牛胸腺组蛋白按 Greenwood 和 Hunter 的方法^[9]用¹²⁵I 标记。取 5—10×10⁴ cpm 标记的组蛋白,经电泳分离,电泳转移,烘干硝酸纤维素滤纸后,做放射自显影,曝光 6 天。

(3) 转移率:以(2)标记的组蛋白,每孔样品槽加样 5—10×10⁴ cpm,经电泳后,凝胶片按样品槽的间隔处纵切成条,做不同时间的电泳转移,转移后的凝胶条和纸,分别测定 cpm,以两者 cpm 值的和为分母,纸上 cpm 值为分子,计算转移的百分数。

(4) 与 DNA 结合:DNA 用¹²⁵I 按 Gets 等人^[10]的方法标记。已转移到硝酸纤维素滤纸上的组蛋

白,按 Bowen 方法与同位素标记的 DNA 一道温育,经过几次洗涤后,烘干,做放射自显影,曝光6天。

结 果

一、转 移

人血清白蛋白和小牛胸腺组蛋白分别通过10%和12.5%聚丙烯酰胺凝胶电泳后,进行电泳转移,然后用考马斯蓝或氨银染色,结果如图1、2所示,聚丙烯酰胺凝胶中的蛋白质大部分能转移到硝酸纤维素滤纸上,被转移的凝胶条上仅残留部分蛋白区带(图2.b)或几乎呈空白的凝胶条(图1.b)。在凝胶浓度相同(均匀胶)的条件下,蛋白质分子量不同,它们被转



图1 人血清白蛋白电泳和转移的图谱

- 转移前凝胶片的蛋白区带
- 转移后凝胶片的状态
- 转移到硝酸纤维素滤纸上的蛋白区带

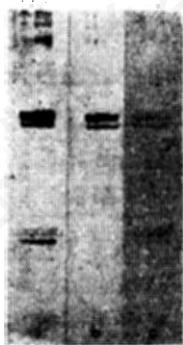


图2 小牛胸腺组蛋白电泳和转移的图谱

- 转移前凝胶片的蛋白区带
- 转移后凝胶片的状态
- 转移到硝酸纤维素滤纸上蛋白区带

移到纸上的速度也不一样,大分子转移慢,小分子转移快。为了达到不同分子量,有比较一

致的转移速度,可采用梯度凝胶分离。

转移还可通过放射自显影的方法来证明,即以标记的小牛胸腺组蛋白,经 SDS 凝胶电泳和电泳转移之后,硝酸纤维素滤纸烘干,此纸在暗室中与 X 光底片紧贴在一道,夹在两片玻璃之间,橡皮筋扎紧,外面包上黑纸,放在无放射性物质干扰的干燥暗室中,曝光6天,结果如图3。



图3 ¹²⁵I标记的小牛胸腺组蛋白放射自显影图谱

上图表明用 ¹²⁵I 碘标记的组蛋白电泳转移后可通过放射自显影直接观察转移的效果。

二、转移率

取一定量 ¹²⁵I 同位素标记的人甲胎蛋白或小牛胸腺组蛋白,经凝胶电泳后,按样品槽把凝胶片纵切成条,取一条凝胶条剪碎,装瓶测定脉冲数(cpm),其余凝胶条贴上硝酸纤维素滤纸进行电泳转移,转移分为1、2、3、4小时等四个组,按时取出凝胶条和滤纸,分别测定凝胶条和纸上的cpm,转移率如表1。

表1 蛋白质从凝胶转移到硝酸纤维素滤纸上的百分率

凝胶浓度(%)	时间 转移率 (%)	时				备注
		1	2	3	4	
10	66	83	88	—	人甲胎蛋白	
12.5	36.3	71.3	75.8	76.5	小牛胸腺组蛋白	
10—15	68	72	75.5	77.1	"	

从上表结果表明电泳转移蛋白质速度相当快,基本上以2小时转移为适当,转移率达70%以上,同落合广(1982)的结果相似^[11]。转移时间再延长,蛋白质转移率增加有限。

三、与 DNA 结合

蛋白质转移到硝酸纤维素滤纸后,把此纸浸泡于结合缓冲溶液(10mM Tris-HCl pH7.0,

1mMEDTA, 0.02%BSA, 0.02%Ficoll, 0.02%polyvinyl pyrrolidone) 中, 轻微振荡 30 分钟, 然后移入 10 毫升含 $1-2 \times 10^8$ cpm 的 ^{125}I -DNA 的结合缓冲溶液, 振荡约 1 小时, 移入不含牛血清白蛋白的结合缓冲液中洗两次, 再用含有 100mM NaCl 的结合缓冲液洗两次, 烘干(纸片一定要烘干, 否则将来放射自显影曝光后, 纸张与 X 光底片粘贴在一道, 不容易分开, 影响放射自显影的效果), 做放射自显影, 结果如图 4。

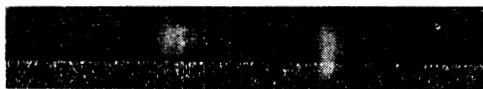


图 4 小牛胸腺组蛋白与 ^{125}I -DNA 结合的图谱

从上图可以看出大鼠肝癌的 DNA 能够和小牛胸腺组蛋白结合, 此结合十分牢固。同时观察到 ^{125}I -DNA 量的不同, 直接影响放射自显影的曝光时间, 如每毫升结合缓冲液中含有 2×10^8 cpm 的 ^{125}I -DNA, 则曝光时间为 6 天, 每毫升结合缓冲液中含有 1×10^5 cpm 的 ^{125}I -DNA, 曝光时间可适当延长。

讨 论

一、转 移

1. 转移法的比较: 我们用三种转移法, 即 Southern 法, Bowen 法和 Towbin 法作了比较。Southern 法, 利用吸水纸把蛋白质(Southern 做核酸转移)引向一个方向扩散, 扩散时间约两天, 每次转移一张硝酸纤维素滤纸。Bowen 法把凝胶夹在两张硝酸纤维素滤纸之间, 自然扩散两天, 一次可以转移两张硝酸纤维素滤纸, 有利于做比较试验。但是, 几次试验的结果, 我们感到不满意, 转移到硝酸纤维素滤纸上的蛋白区带的边缘较模糊, 也许是扩散时间过长的缘故吧! Towbin 法, 上面已经讲过了, 它的特点是转移快, 转移时间短, 蛋白质区带紧密。我们还发现, 蛋白质转移与硝酸纤维素滤纸的孔径有关, 滤纸的孔径小(0.22 微米)蛋白质在转移的过程中损失少, 反之,

孔径大(0.45微米)蛋白质损失多, 可能是某些小分子蛋白质穿孔而丢失。因此, 蛋白质的转移, 应选用与其分子量相适应的硝酸纤维素滤纸的孔径, 使转移的效果更为满意。

2. 电泳转移缓冲溶液的选择: 我们曾使用巴比妥缓冲溶液, 醋酸缓冲溶液等, 电泳转移的效果均欠佳。Towbin 用 25mM Tris-192mM 甘氨酸-20% 甲醇的电泳缓冲溶液进行电泳转移, 其效果很好。为了节省试剂和费用, 把此缓冲液的浓度减半使用, 电移率达 70% 以上, 转移的蛋白区带清晰, 结果较满意。如果在电泳转移溶液中加入少量 SDS, 又控制硝酸纤维素滤纸的孔径, 也许电泳转移的效果更好。

二、蛋白质分子量与凝胶浓度对电泳转移的影响

不同分子量的蛋白质采用不同浓度的凝胶, 使蛋白质的分离能达到预期的要求, 这是众所周知的。小牛胸腺组蛋白用 10—15% 梯度胶的浓度, 则蛋白质区带分离相当清晰, 也有利于电泳转移。因为这种梯度凝胶的浓度从上到下递增, 而蛋白质分子量从上到下递减, 可能电泳转移较容易, 而且电泳转移的效果也较一致。用 12.5% 均匀胶, 也能清晰地把组蛋白的五种成分区分开, 电移率与梯度胶的相似。但对于 H_1 的转移, 稍欠于梯度胶。总之, 无论 12.5% 均匀胶还是 10—15% 梯度胶都适合于分离和转移小牛胸腺组蛋白。

三、印迹法的应用

蛋白质转移到硝酸纤维素滤纸上, 避免了凝胶的厚度、孔径等阻隔, 对于研究蛋白质与蛋白质, 蛋白质与核酸(包括 RNA 与 DNA)之间相互关系等都是十分有利的。

本文着重谈了蛋白质转移法的建立, 并初步做了 DNA 结合的试验。大鼠肝癌 DNA 能够和小牛胸腺组蛋白结合, 而且这种结合十分牢固。但是大鼠肝癌 DNA 不能和标准低分子量蛋白中的磷酸化酶 b、白蛋白、卵清蛋白和碳酸酐酶等结合, 这种现象可能由于组蛋白含

(下转第 7 页)

- Soc. Hort. Sci.*, 105(4):481-484.
- [15] Kartha, K. K., 1981, In "Plant Tissue Culture", Ed. T. A. Thorpe p. 181-211.
- [16] Kartha, K. K., 1982, In "Application of Plant cell and Tissue Culture to Agriculture and Industry." Eds. D. T. Tomed et al., Guelph, Ontario, p. 139-161.
- [17] Latta, R., 1971, *Canad. J. Bot.*, 49: 1253.
- [18] Loo Shih-wei, 1982, In "Proceeding of 5th IAPTC congress, Tokyo, Japan, p. 14-26.
- [19] Lovelock, J. E. & M. H. W. Bishop, 1959, *Nature*, 183:1394.
- [20] Mazur, R. A. & J. X. Hartman, 1978, In "Plant Cell and Tissue Culture, Principles and Applications," Eds. W. R. Sharp, et al., Ohio State Univ. Press, Columbus. p. 876.
- [21] Nag K. K. & H. E. Street, 1973, *Nature*, 245:270-272.
- [22] Nag, K. K. & H. E. Street, 1975, *Physiol. Plant*, 34:254-260.
- [23] Polge, C. et al., 1949, *Nature*, 164:666.
- [24] Попов, А. С., 1981, "Култура Клеток Растений", Р. Г. Бутенко, издательство Наука, стр. 150-162.
- [25] Попов, А. С., et al., 1982, *DAH CCCP*, 262(3):765-768.
- [26] Quatrano, R., 1968, *Plant Physiol.*, 43: 2057-2061.
- [27] Sakai, A. & Y. Nishiyama, 1978, *HortScience*, 13:225-227.
- [28] Sakai, A. & Y. Sugawara, 1973, *Plant & Cell Physiol.*, 14:1201-1204.
- [29] Sala, F., et al., 1979, *Physiol. Plantarum*, 45:170-176.
- [30] Seibert, M., 1976, *Science*, 191:1178-1179.
- [31] Seibert, M. & P. J. Wetherbee, 1977, *Plant Physiol.*, 59:1043-1046.
- [32] Singh, J., 1979, *Plant Sci. Lett.*, 16:195-201.
- [33] Takeuchi, M. et al., 1980, *Cryo-Letters*, 1:519-524.
- [34] Ulrich, J. M. et al., 1979, *Cryobiology*, 16:550-556.
- [35] Ulrich, J. M. & B. J. Finkle, 1981, *HortScience*, 16(1):47-48.
- [36] Withers, L. A. 1979, *Plant Physiology*, 63: 460-467.
- [37] Withers, L. A., 1982, SEB Seminar Series on Plant Biotechnology, Univ. of Leicester, p. 1-32.
- [38] Withers, L. A. & J. King, 1980, *Cryo-Letters*, 1:213-220.
- [39] Withers, L. A. & H. E. Street, 1977, In "Plant Tissue Culture and its Biotechnological Application," Eds. W. Barz, p. 226-244.
- [40] Withers, L. A., 1980, "Tissue culture Storage for Genetic Conservation", IBPGR secretariat, Rome, 1980.

(上接第48页)

有较多碱性基团, 等电点偏碱, 而白蛋白等是球形蛋白, 碱性氨基酸不如组蛋白多, 等电点偏酸等缘故。

还初步做了免疫反应, 以抗原经过凝胶电泳分离, 电泳转移, 把抗原转移到硝酸纤维素滤纸之后, 依次同第一抗体和第二抗体(¹²⁵碘标记)温育, 做放射自显影, 结果可以观察到抗原抗体专一结合反应。

参 考 文 献

- [1] Southern, E. M., 1975, *J. Mol Biol.*, 98: 503-517.
- [2] Renari, J., et al., 1979, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:3116-3120.
- [3] Bittner, B., et al., 1980, *Anal. Biochem.*, 102:459-471.
- [4] Bowen, B., et al., 1980, *Nucleic Acids Research*, 8:1-20.
- [5] 山岸秀夫等, 1975, 核酸の化学 I. 分离精制, 东京大学同人発行株式会社, p. 78-80.
- [6] 何全品等, 1981, 细胞生物学杂志, 3(3): 35-37.
- [7] 林斯骏等, 1981, 细胞生物学杂志, 3(2): 33-35.
- [8] Towbin, H., et al., 1979, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:4350-4354.
- [9] Greenwood, F. C. et al., 1963, *Biochem. J.*, 89:114-123.
- [10] Gets, M. J. et al., 1972, *Biochem Biophys. Acta.*, 287:485-494.
- [11] 落合 广, 1982, 生化学, 54(2):107-109.