

简报

用聚乙烯薄膜复印法检测大肠杆菌合成的乙型肝炎核心抗原

丁广治 沈倍奋 马贤凯

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京)

用生物工程方法合成的蛋白质, 经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后, 需用抗原抗体反应确定特异电泳带的位置, 常用的方法为Western滤膜吸印^[1]。方法是将硝酸纤维素滤膜复盖在聚丙烯酰胺凝胶板表面, 经电泳转移, 再与用同位素、荧光素或辣根过氧化物酶标记的抗体结合, 放射自显影, 荧光照相或浸泡在底物中显色。

Buckel^[2]介绍过一种方法, 用抗体包被聚乙烯薄膜, 复盖在长有菌落的平皿上, 与菌体释放出的抗原结合, 再与标有辣根过氧化物酶的抗体作用, 复盖在含有底物的明胶板上显色, 用于菌落筛选。我们除将此法用于乙型肝炎核心抗原(HBc-Ag)表达菌落的筛选外^[1], 还代替Western滤膜吸印法, 用于确定HBcAg在聚丙烯酰胺凝胶板上的位置和分子量大小, 亦得到满意效果。此法较Western法简单方便, 不需要特殊仪器。

材料和方 法

(一) 菌体裂解液的制备

产生HBcAg的大肠杆菌M2066株由本实验室^[2]克隆。将菌体接种于100ml LB培养基中, 37℃振荡培养过夜, 离心收集菌体, 重新悬浮于5ml 0.2mg/ml溶菌酶(上海禽蛋厂), 50mM葡萄糖, 100mM EDTA, 25mM Tris-HCl pH8.0 溶液中,

4℃ 1h, 加5ml 250mM EDTA中止反应。超声破碎后离心除渣, 将上清液装入透析袋中以50%甘油(溶于PB缓冲液pH7.4)透析浓缩4h, 体积缩小5倍。放入-20℃冰箱中保存。

(二) 聚丙烯酰胺凝胶电泳

分离胶浓度为10%, 成层胶浓度为7.5%, 胶板厚1mm。电泳液采用25mM Tris, 192mM甘氨酸, 0.1%SDS, 10mA, 50V预电泳30min后加样, 样品中含2%SDS, 5%二巯基乙醇, 0.05%溴酚蓝, 10%蔗糖, 100℃水浴煮沸5min后, 每个加样孔加50μl样品。10mA, 50-80V电泳过夜。电泳后, 将胶板切成两份, 分别进行染色和复印。用于染色的胶板浸在0.4%考马斯亮蓝溶液(甲醇:醋酸:水=5:1:5)中染色12h。再放入脱色液(乙醇:醋酸:水=2:1:7)中脱色24h, 每4h更换一次脱色液。用凝胶干燥器干燥后保存。

(三) 聚乙烯薄膜复印酶联检测

将聚乙烯薄膜预先剪成所需之大小, 放在异丙醇当中浸泡5-10min, 取出后放在滤纸上晾干。将包被抗体用0.05M碳酸盐缓冲液pH9.6稀释成合适浓度, 放入聚乙烯薄膜, 37℃孵育1h, 4℃冰箱中放置过夜。再在0.1%BSA, 0.5%牛血清(溶于PBS缓冲液pH7.4)当中浸泡5min,

本文于1985年5月6日收到。

将未结合上抗体的部位封闭起来,取出晾干,4℃冰箱中密封可保存一月。使用前将薄膜剪去一角作好标记,复盖在凝胶板表面,用滤纸卷轻轻挤压,将气泡赶走,盖上玻璃板,压上0.5—1kg重物,复印12—24h,复印完毕将薄膜取下,用PBS吐温缓冲液(pH7.4)漂洗后取出。

以0.1%BSA(溶于PBS-吐温pH7.4)溶液将酶标抗体(IgG-HRPO)稀释成合适的浓度,浸泡薄膜4h。再放入0.1%BSA(溶于PBS-吐温pH7.4)溶液中漂洗,更换BSA溶液后再浸泡10min,自来水漂洗后晾干。称取四甲基联苯胺(TMB)(E.Merck)20mg,气溶胶O.T 100mg,加10ml甲醇,混合溶解。称取明胶1.2g,加10ml 0.51M磷酸氢二钠,0.24M柠檬酸缓冲液(pH5.0),搅拌加热溶解,待温

度降至37℃,再加四甲基联苯胺溶液,混匀后加30% H_2O_2 28 μ l(最终浓度为0.02%),混匀后倒入50×80×150mm有机玻璃盒中,室温中放置20min,待胶板凝固并变成白色后,将薄膜复盖在明胶板表面,轻轻将气泡赶走,室温中放置5min,在特异性抗原的电泳带部位即可显示蓝绿色。取下薄膜与染色之胶板比较,即可找出相应的电泳带。

结果和讨论

我们采用此法对含有HBcAg基因重组子并能合成HBcAg的大肠杆菌M2066的菌体裂解液,进行了聚丙烯酰胺凝胶电泳与聚乙烯薄膜复印酶联免疫检查,结果如图1所示。1为含有载体质粒pUR222的

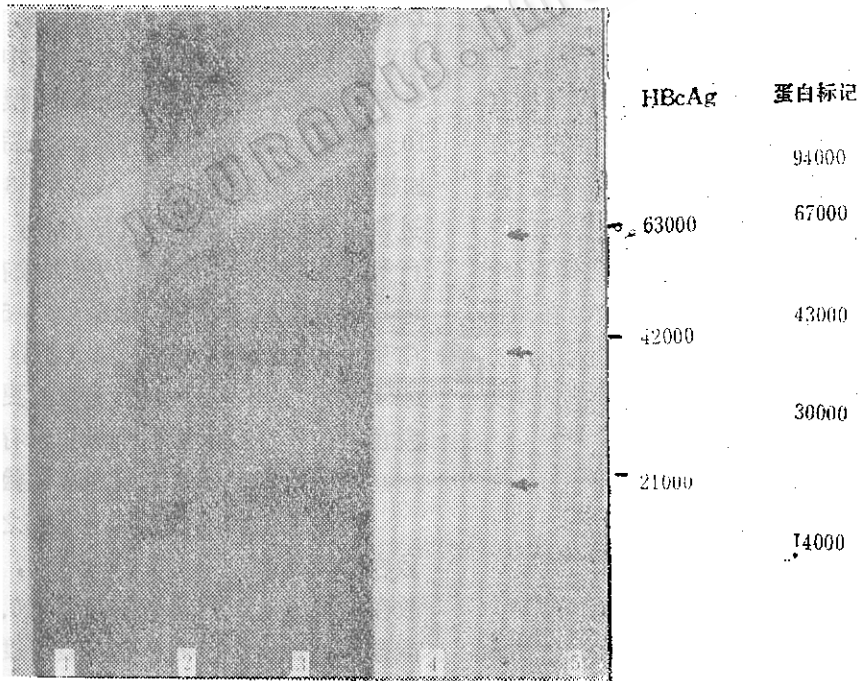


图1. M2066菌体裂解液聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

1. 对照(*E. coli* K12BMH71-18(pUR222))
2. M2066(*E. coli* K12BMH71-18(pMM2066))
3. M2066, 加SDS与二巯基乙醇变性处理
4. M2066, 加SDS与二巯基乙醇变性处理
5. 蛋白分子量标记

1, 2, 3; 明薄膜复印法检查 4, 5; 用考马斯亮蓝染色检查

大肠杆菌(*E. coli* K12, BMH71-18)菌体裂解液; 2、3、4为含有重组质粒 pMM 2066 的大肠杆菌 (*E. coli* K12, BMH71-18) 菌体裂解液, 重组质粒是在质粒 pUR 222 的 *EcoRI* 克隆位点插入 HBcAg 基因片段构成; 5 是蛋白质分子量标记, 分子量分别为: 磷酸化酶 B (94000d), 牛血清白蛋白 (67000d), 卵清蛋白 (43000d), 碳酸酐酶 (30000d), 胰蛋白酶抑制剂 (20000d), 乳清蛋白 (14700d)。3、4 皆加入 2% SDS 与 5% 二巯基乙醇, 加热 100°C 5 min 变性处理, 2 仅加热 100°C 5 min 未加二巯基乙醇与 SDS 变性剂。1, 2, 3 用塑料薄膜复印法检查, 4, 5 用

考马斯亮蓝染色检查。将两种检查位置对齐, 即可找出经考马斯亮蓝染色检查的 HBcAg 电泳带的位置, 并根据它们的迁移距离计算出分子量大小, 见图 2。结果表明在大肠杆菌菌体裂解液中的 HBcAg 除含有 2.1 万道尔顿的单体外, 尚存在 4.2 万道尔顿的双体和 6.3 万道尔顿的三体。另外在不加变性剂处理的情况下, 电泳后呈弥散分布, 不能形成明显的电泳带, 更证明此抗原是一种能与 DNA 结合在一起的蛋白^[4]。

Towbin^[5] 介绍的方法虽然可用辣根过氧化物酶标记抗体代替用同位素标记不需放射自显影, 但仍需采用硝酸纤维素滤膜电泳转移, 不但需要特殊的电泳装备, 而且配制电泳液所使用的甘氨酸也是很多的。我们采用聚乙烯薄膜复印法不需要电泳转移, 是利用凝胶中抗原分子自身的扩散运动, 在凝胶表面与包被在聚乙烯薄膜表面的抗体分子接触形成牢固的结合实现的。所采用的底物是加到明胶当中, 凝固后再将薄膜复盖在明胶表面, 利用分子扩散运动, 底物分子与酶标抗体接触经氧化显色, 而不是将滤膜浸泡在底物溶液中显色, 因此很容易洗净, 本底干净, 操作也很简单。

本法所使用的四甲基联苯胺为不溶于水的颗粒性底物, 因此需先溶解在有机溶剂甲醇当中, 并加入气溶胶 O.T 助溶。此底物比酶联检测中常用的底物磷苯二胺 (OPD) 灵敏, 而且不像磷苯二胺及二氨基联苯胺 (DAB) 那样有致癌性, 使用起来比较安全。

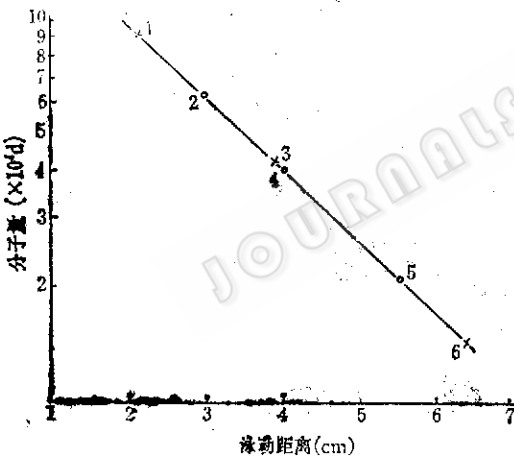


图 2 大肠杆菌 M2066 菌株合成的 HBcAg 分子量测定

1. 磷酸化酶 $9.4 \times 10^4 d$ (2.15cm)
2. HBcAg $6.3 \times 10^4 d$ (3 cm)
3. 卵清蛋白 $4.2 \times 10^4 d$ (3.9cm)
4. HBcAg $4.2 \times 10^4 d$ (4 cm)
5. HBcAg $2.1 \times 10^4 d$ (5.5cm)
6. 乳清蛋白 $1.4 \times 10^4 d$ (6.4cm)

参 考 文 献

- (1) 丁广治等: 待发表。
- (2) 左平等: 待发表。
- (3) Buckel, P. et al., *Gene*, 16:149-159, 1981.
- (4) Pasek, M. et al., *Nature*, 282:575-579, 1979.
- (5) Towbin, H. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:435C-4354, 1979.