

范培昌 编著

生物大分子印渍技术和应用

上海科学技术文献出版社

生物大分子印渍技术和应用

范培昌 编著

上海科学技术文献出版社

生物大分子印渍技术和应用

范培昌 编著

上海科学技术文献出版社出版发行

(上海市武康路2号)

新华书店经销

昆山亭林印刷厂印刷

开本 787×1092 1/32 印张 9.25 字数 223,000

1989年6月第1版 1989年6月第1次印刷

印数: 1—4,000

ISBN 7-80513-333-6/Q·12

定价 5.70 元

《科技新书目》185-256

编者的话

新技术的开发和应用促进了生命科学的发展,这是从事生命学科的人们所熟知的真谛。近十年来,生命科学中又出现了三项具革命性的新技术:DNA序列快速分析术,单克隆抗体生产术和生物大分子印渍术。和以往新技术出现时的情景不同,这三项技术诞生后仅一二年就都得到广泛的认可。报道之多,应用面之广,都是以往所不及。今天,它们虽在理论与实践两方面都已取得丰硕成果,然发展势头却有增无减。

生物大分子印渍术简便易行,既具有凝胶电泳的高分辨率、生物分子亲和技术的高灵敏度,又能将所得结果长期保存而深受欢迎。今天,它已在生物化学、分子生物学、免疫学、医学、细胞生物学、植物生理学等学科得到广泛应用。更可喜的是,印渍术已进入临床检验等部门,为病原诊断作出贡献。可以预言,随着本技术的继续发展,印渍术必会成为生命学科各领域实验室中必不可少的一项常规技术。

本书的编写将以方法学为主线,希望在参阅本书后能使读者基本上理解和掌握这项极为有用的新技术,希望本书能解答实际操作中所遇到的种种疑难问题。全书共分六章,前两章为概念和原理;三、四章讨论装置与操作;最后两章介绍发展和应用。限于篇幅,“应用”一章中将偏重分子生物学与医学,有关其它方面的应用将以实例形式穿插于各章间。自认为这样做,既可限制住篇幅,又可反应印渍术应用的广泛性。鉴于编著者知识浅薄、实践又少,错误之处在所难免,欢迎读者批评指正,共同进步。

范培昌(华东师范大学生物系,上海)

一九八七年四月

目 录

第一章	引言	(1)
一	生物大分子印渍术的概念	(1)
二	生物大分子印渍术的演变与发展	(3)
三	印渍过程及常用术语	(9)
四	印渍术的评价	(14)
五	印渍术的应用与前景	(17)
第二章	印渍术原理及其影响因素	(25)
一	印渍效率	(25)
二	与凝胶电泳有关的印渍原理	(28)
三	与固定化技术有关的印渍原理	(44)
四	与分子亲和技术有关的印渍原理	(59)
第三章	印渍装置与操作	(73)
一	毛细作用印渍装置与操作	(74)
二	扩散印渍装置与操作	(79)
三	电印渍装置与操作	(80)
四	其它辅助装置与操作	(94)
第四章	实验技术	(106)
一	印渍模板的选择与加工	(106)
二	印渍用纸的选择与加工	(119)
三	印渍缓冲液的选择	(131)
四	印渍步骤的操作要点	(132)
五	猝灭及猝灭剂的选择	(152)
六	印渍纸染色方法	(158)

七	印渍分子的特异性检出——印盖术	(169)
第五章	有关印渍的其它技术	(191)
一	点印渍术	(191)
二	细胞印盖术	(202)
三	印渍纸上原位修饰术	(206)
四	生物小分子印渍术	(208)
五	测定酶活性的酶印渍术	(213)
六	印渍物的回收技术	(221)
七	在印渍纸上使用非放射性探针的分子杂交术 ...	(225)
第六章	印渍术在分子生物学与医学领域的应用	(232)
一	在研究生物分子间相互作用中的应用	(232)
二	在基因组 DNA 测序及基因定位中的应用	(237)
三	在基因结构分析中的应用	(247)
四	在基因表达、基因筛选及基因工程等方面的应用	(253)
五	在遗传疾病诊断和治疗中的应用	(257)
六	在免疫学与自身免疫病中的应用	(265)
七	在单克隆抗体生产与研究中的应用	(271)
八	在各种传染病病理研究与临床诊断中的应用 ...	(275)
	本书所用缩写和简称	(287)

纸染上墨渍而被称为 Blotting^[1,2], 此词理应译为印渍术^[3]或印迹术^[4]。某些文献把它译为“原位转移^[5]”, 似使人有“去简就繁”之感。

由图 1-1 可见, 印渍术实际上是凝胶电泳技术、固定化技术及分子亲和技术三者融为一体的综合性技术。其核心在于把凝胶电泳已分离的区带转移并印渍于固定化纸上使之固定化, 并处于薄的固定化纸表面, 从而既耐其后用分子亲和技术检出所需特异性分子时所进行的种种处理, 又有利于亲和分子接近而提高灵敏度。

众所周知, 各种凝胶电泳是当代分析与纯化生物大分子最有效的技术之一。目前, 凝胶电泳的分辨率已达惊人程度。如 O'Farrell 的双相凝胶系统, 一次电泳就能分辨出 1,600 多种蛋白质^[6]。但这却出现了新问题: 要想毫不含糊地从这上千条区带中辨别出一条是我们感兴趣的功能性蛋白质, 则常是十分困难的。迄今, 虽已创立了能灵敏地特异性检出酶^[7]、抗原^[8]、糖蛋白^[9]、激素受体^[10], 或其它 DNA-RNA^[11]、蛋白质-DNA^[12]、蛋白质-DNA-DNA^[13,14]、蛋白质-蛋白质^[15,16]等的方法和技术, 但是若把这类方法直接用于凝胶电泳后的分离区带, 则要求: (1) 被鉴定的生物大分子应能亲和结合于一种容易检出的配体上; (2) 此配体应不受凝胶孔径的限制容易进入凝胶; (3) 电泳期间生物大分子的活性应能保持, 至少能保留住其和特异性配体结合的亲和位点; 或者 (4) 电泳时虽已失活, 但电泳后经某种处理后可使生物大分子恢复活性。显然, 要做到上述各项势必要对电泳后之凝胶进行各种处理, 包括保温、浸泡、洗涤、平衡、改性等等, 这又可能使凝胶变形、破损、断裂, 致使全功尽弃。更何况湿的凝胶难以贮存, 必须及时并连续地处理; 凝胶孔径限制扩散的作用, 又迫使采用较大量的, 十分昂贵又供应不足的配体

试剂。例如，通常直接检出琼脂糖凝胶上已分离的限制酶切 DNA 片段时，每一区带约需 $1\mu\text{g}$ 单链互补 DNA (cDNA)。事实上，如果想要分析来自一复杂机体的特异基因结构而又不 对基因预先提纯的话，那末将必须在一百万左右其它 DNA 类型中检出皮克 (10^{-12}g) 量的单种类型的 DNA^[17]。这就要求所用方法必须非常灵敏且具高度特异性，而直接使用凝胶来检出就有一定困难。相反，印渍术可使凝胶中的分子经印渍而浓集于固定化材料的表面，故能达到这种检出要求。正因为印渍术克服了直接用凝胶检出生物大分子时带来的种种困难，所以其一出现就被广泛接受，并很快在分子生物学和医学领域得到应用和发展。

二、生物大分子印渍术的演变与发展

Southern 于 1975 年开创 DNA 印渍术后不到一年，法国的 Chambon 小组在应用此技术研究鸡胚卵清蛋白基因时，发现分子杂交后所得放射自显影谱显现的不是一条，而是多条区带。这一偶然发现，使 Chambon 小组立即意识到其重大意义：“真核生物基因具有不编码的插入序列”^[18]。现在已经肯定这一结论是正确的，并把这种具有不编码插入序列的基因称为断裂基因 (Split gene)，其中编码序列称为外显子 (exon 或 exteron)，不编码序列称为内含子 (intron)。这一杰出成果被创立 DNA 双螺旋模型的 Crick 誉之为分子遗传学中的一次“微型革命”，也使印渍术名声大振。1977 年，Alwine 等人将此印渍术应用于 RNA 的研究上，并首先采用重氮苄氧甲基纤维素纸 (Diazobenzyl oxymethyl cellulose paper, 简称 DBM)，以使被印渍物和它共价键合而被固定化^[19]。遗憾的是，Alwine 等

人把当时人们以发明人姓氏命名的 Southern blotting, 以其姓氏含南部之意来称呼(即南部印渍术), 而把他们的改良法风趣地称为北部印渍术(Northern blotting)。1979年, Towbin 等人首先把印渍术用于抗原检出, 并称为免疫印渍术(Immunoblotting)^[20]。Towbin 等人另一功绩是, 他们首先应用电洗脱装置作为印渍动力, 这不仅能真实地获得凝胶分离区带的复制品, 而且缩短了印渍时间^[20]。目前, 用电作为印渍动力的方法是最广泛应用的一种, 且已有几种仍不太理想的电印渍专用装置问世, 如美国 Bio-Rad 公司生产的 Transblot cell; 我国江苏兴化分析仪器厂生产的转移电泳槽。此外, 人们也常把用电作为印渍动力的印渍术称为电印渍 (Electroblotting)^[21]、电洗脱法 (Electroelution)^[22]、电转移 (Electrotransfer)^[23]、电泳转移 (Electrophoretic transfer)^[24]、横向电泳 (Transversal electrophoresis)^[25]等。Towbin 等人创造的免疫印渍术是当代印渍术中发展最快、应用最广的一类, 目前已有不少用于临床诊断的报道^[26~28]。这是因为抗体也是大分子, 它们不易渗入凝胶, 用凝胶直接检出将有一定困难, 印渍术正好免除了这一关键问题^[29]。1981年 Burnette 把免疫印渍术谐称为西部印渍术 (Western blotting)^[30], 并为许多人所接受而沿用至今, 成为免疫印渍术的同义词^[31]。蛋白质印渍术最初系由 Renart 等人提出的^[32]。1982年, Reinhart 和 Malamud 将等电点聚焦法分离蛋白质的凝胶作为印渍模板, 他们又把这种蛋白质印渍术称为东部印渍术 (Eastern blotting)^[33], 使之成为蛋白质印渍术的同义词。

综上所述, 除了 Southern blotting 系取发明人姓氏以示纪念外, 其余名称均属科学上诙谐之称, 虽说别有风趣, 但其后果除造成名称的混乱外, 还出现了不必要的政治性争论^[34]。于

是, Gershoni 和 Palade 在 1983 年著文呼吁改变这一局面, 并建议把各种生物大分子从凝胶转移到一种固定化基质上的过程称为印渍术 (blotting), 这一术语可和有关大分子连在一起使用, 如 DNA 印渍术 (DNA blotting)、RNA 印渍术 (RNA blotting)、免疫印渍术 (Immunoblotting)、蛋白质印渍术 (Protein blotting) 等^[39]。就目前报道的文献看, Gershoni 和 Palade 的建议已为大多数学者所接受, 迄今, 除了 Southern blotting 和 Western blotting 外, 像 Eastern blotting 和 Northern blotting 等以地区性命名的术语已基本消失。但是, Gershoni 和 Palade 关于 Blotting 可与有关大分子名称连用的建议, 又引起了另一堆名词。如大分子印渍术 (Macromolecular blotting)^[38]、酶印渍术 (Enzyme blotting)^[36]、脂多糖印渍术 (“LPS” blotting)^[37]、配体印渍术 (Ligand Blotting)^[38]、酶联免疫电转移印渍技术 (Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot techniques)^[39]、麦胚凝集素印渍术 (Wheat Germ agglutinin blotting)^[40]、金印渍术 (Golden blotting)^[41]、过氧化物酶免疫印渍术 (Peroxidase immunoblotting)^[42] 等等。显然, 除了前三个词符合 Gershoni 和 Palade 的建议外, 其余名称实属印渍过程中用于检出所使用的配体或染料名称, 非并 Gershoni 和 Palade 所建议的, 原来存在于凝胶中, 后被印渍于固定化介质上欲检出的生物大分子。

值得提出的是, 1979 年 Renart 等人^[32] 在进行蛋白质印渍研究中为了研究印渍效率, 他们把蛋白质纯品直接点于固定化纸上, 然后再按印渍术的其后步骤予以鉴定。同年, Cleveland 等人^[43] 把疱疹病毒感染的细胞直接点于固定化材料上使之固定化, 然后进行免疫检出。这种不经凝胶电泳分离, 直接把样品以小圆点或其它几何形状 (如小方块^[44]) 点于固定化材料, 然后

再用分子亲和技术检出的方法现在称为点印渍术 (Dot blotting)^[45]。也就是说,点印渍术除省略了凝胶电泳外,其它步骤则和印渍术相同。因此严格说来,点印渍术似不应列入本技术范畴。但是,考虑到两种方法具有相辅相成的关系,作者将把它作为印渍术的一项分支来讨论。

点印渍术 (Dot blotting) 是在 1981 年,因 Larsson 设计了一种纸上肽抗原的多点测定法 (Multi-spot test)^[46] 而引起人们注意。自此以后,点印渍术则以其同时可检出数十样品而闻名于世。报道之多,发展之快,都达到惊人的程度^[39],各种点印渍专用装置也相继问世。例如, Towbin 小组设计了一种可注射皮克量的样品输送器 (Hami-Lton Microlad M 型),能反复输送 $0.1\mu\text{l}$ 体积的样品,并使其自动地点在刻有格子的 NO 纸上。又如, Alrio 等人^[44]设计了一种点印渍槽,一次操作可上样 600 个。当然,也像其它新技术出现时的情景那样,点印渍术的名称也有许多同义词,尤其是因为它广泛用于抗原和杂交瘤的筛选,故常冠以有关名词。例如,点免疫结合术 (Dot immunobinding)^[39]、斑点免疫检出法 (Spot immunodetection)^[47]、点印渍免疫测定 (Dot blot immunoassay)^[48]、抗原斑点检出法 (Antigen spot detection)^[49]、杂交斑点分析 (Hybridot analysis)^[50] 等。近来更有人把细胞直接点于固定化纸上的点印渍术,并称为群体印渍 (Colony-blot)^[41]。

图 1-2 列出了通规印渍术和点印渍术所得检出图谱,据此不难判别二者之差异。图中, A 为限制性内切酶降解人 DNA 所得片段经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳后,凝胶的放射自显影谱 (其中列 1 为 λ DNA 的分子量标准系列); B 是该凝胶经用 NO 纸印渍,并用 β 珠蛋白的 RNA 与之杂交后所得的放射自显影谱; C 是以圆点的形式直接把不同量胸苷酸激酶点于 DE81 纸上。

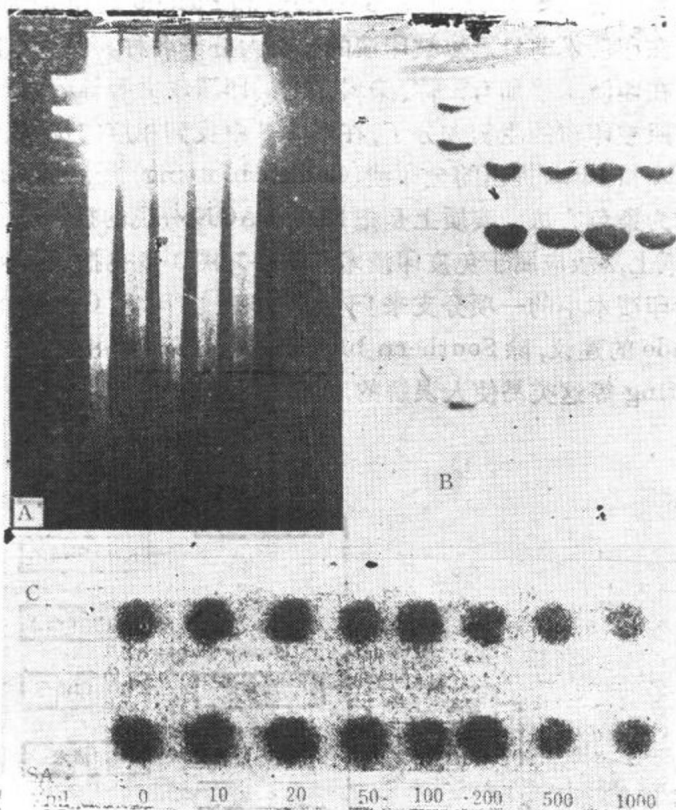


图 1-2 以凝胶为模板的常规印渍术(A、B)和点印渍术(C)的印渍谱比较
A, 经限制酶切人 DNA 的电泳凝胶之放射自显影谱; B, 此凝胶
经印渍, 并用分子杂交检出专一性区带的放射自显影谱; C, 直接
点样于固定化纸的点印渍谱, 数字示点样 $45 \mu\text{l}$ 胸苷酸激酶所含
牛血清蛋白(BSA)的浓度。

然后用 ^{125}IdU 检出的放射自显影点印渍谱。

综上所述, 作者按 Gershoni 和 Palade 的建议^[9], 把各种印渍术归类如图 1-3。正如 Gershoni 和 Palade 提出的那样, 要求在印渍术前只冠以被印渍的生物大分子名称。至于目前常见的在印渍术前加有配体、染料、装置、印渍动力等等名称者, 也可按照被印渍的生物大分子, 在图 1-3 中找到相应的位置。例如 Brada 和 Roth 提出的金印渍 (Golden blotting)^[41], 金溶胶只是作为染色方法, 实质上是把 SDS-PAGE 分离的抗原印渍于 NO 纸上, 故应属于免疫印渍术。此外, 图 1-3 也把点印渍术作为印渍术中的一项分支来归类。作者也同意 Gershoni 和 Palade 的建议, 除 Southern blotting 外, 不再使用如 Eastern blotting 等这类易使人误解的地区性名称。

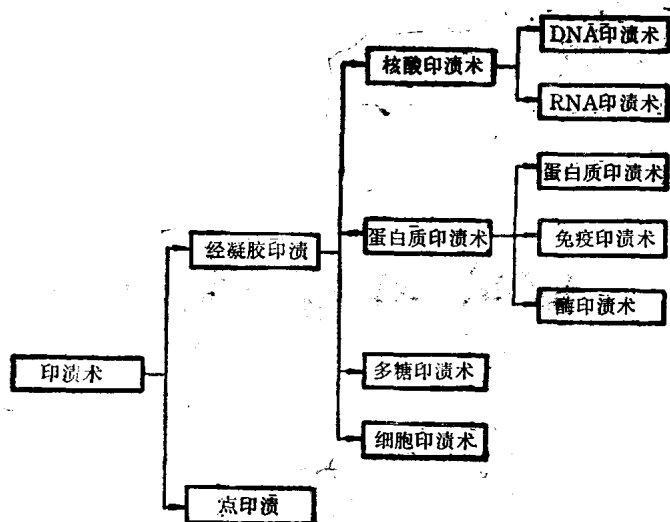


图 1-3 作者建议的印渍术分类

三、印渍过程及常用术语

要熟悉并掌握一项新技术，必须先对其全过程有一初步了解，以便在此基础上领会其有关理论。图 1-1 曾列出了 DNA 印渍术的概貌，这里再以 Gershoni 等人最近用免疫印渍术特异检出人红细胞膜中副流感病毒受体(sendai virus receptors)的全过程作为例子^[51]，并同时介绍印渍过程中常用的术语。

图 1-4 系 Gershoni 等人实验步骤的方框图。为了比较检出效率，他们同时用放射标记法和酶联免疫检出法进行检出。此外，他们的这一实验比较完整，在引用时，因不同的实验目的可以删减。但图中标有数码的步骤，除猝灭项外通常是不能减少的。

1. 凝胶电泳

印渍术中进行的凝胶电泳与常规法并无两样，但因印渍效果和凝胶的孔径与厚度有关，而大多采用板型凝胶。即使采用圆型管凝胶，也往往经纵切后取中间片条进行印渍。为了使大分子容易迁出凝胶，常在不影响分辨率的情况下尽可能采用大孔胶。此外，在一些研究印渍机理及其影响因素的印渍实验中，为使结果标准化，大多采用著名的、久经考验而公认的 Laemmli 电泳系统^[52]。

在图 1-4 所示实验中，Gershoni 等人也用 Laemmli 系统对人红细胞影淘(影泡制法可参考文献[43]和[54])进行板型十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。上样量为 70~100 μg 影淘，凝胶浓度为 10%，板胶厚 0.3~1 mm。电泳后凝胶纵切为三：一块作常规染色，用它和印渍后的考贝相对照，了解印渍区带数是否和原来凝胶中相同；另两块用作比较两种

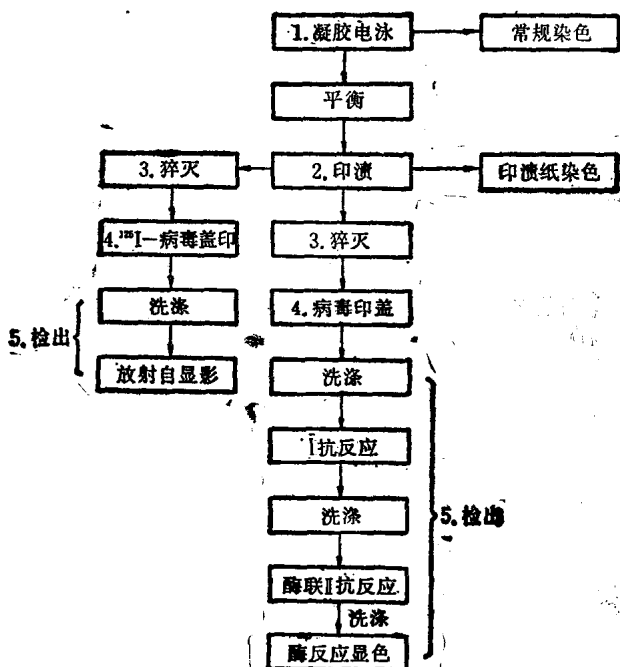


图 1-4 用免疫印渍术特异性检出人红细胞膜中副流感病毒受体的全过程示意图(说明见正文)

检出方法的印渍模板(Blot templet), 故同时放在印渍缓冲液 [15.6 mM Tris, 120 mM 甘油, pH 8.3; 加(或不加)20% 甲醇] 中, 在室温下浸泡 1~4 小时。此步称为印渍前平衡, 目的在于防止凝胶从电泳缓冲液转入印渍缓冲液时, 因盐浓度改变而使凝胶胀或缩, 致使印渍谱上区带扭曲变形造成的影响。

2. 印渍

印渍(Blot)或称转移(Transfer), 实质上是把凝胶电泳已分离的区带转移于固定化纸或膜使之固定化。这种固定化作用可以是非共价结合(如用 NO 纸), 也可以是共价结合(如用重

氮化纸)。印渍的动力既可用电,也可利用毛细作用,接触扩散作用。为此印渍术中又可按印渍动力分为电印渍术(Electroblotting)、毛细作用印渍(capillary blotting)和接触扩散印渍(contact diffusion)^[56]。所用印渍装置一般由实验自行设计,图1-5所示电印渍装置示意图是比较通用的。也就是说,在两侧装有网板形正、负电极的印渍槽中央,放入印渍夹层。此夹层常由多孔有机玻璃板、泡沫塑料垫、一叠滤纸、固定化纸、凝胶等所组成。因将在第三章中,专门讨论,这里不再详述。

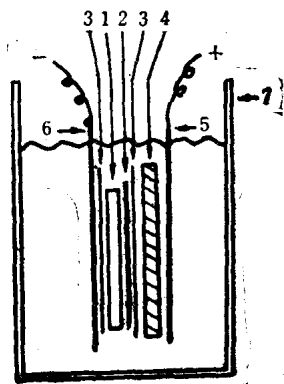


图1-5 电印渍装置示意图

1. 凝胶模板; 2. 固定化纸; 3. —○—通用滤纸; 4. 泡沫塑料垫; 5. 铂丝网阳电极; 6. 多孔不锈钢片阴电极; 7. 有机玻璃印渍槽。

在 Gershoni 等人的实验中采用自行设计的,与图1-5类似的电印渍装置。印渍纸是 NC, 印渍电压为 70~90V, 印渍时间 3~6h。所用印渍缓冲液和上述平衡溶液相同,用量为 4l, 同时预冷到 8~10°C。

3. 猝灭

猝灭(Quenching)又称封阻(Blocking)。因为印渍术的重要目的在于检出某种已分离的功能性区带,而不是全谱的检出,这就要采用生物分子亲和技术。也即利用一对亲和物中的甲方去检出已被印渍于固定化纸(称印渍纸)上的乙方。由于甲方仍是生物分子,直接用它去处理已印渍的固定化纸,它势必去占领印渍纸上各区带间所剩余的活性基团,使它也被固定化,从而使欲检出的区带混淆不清,难以辨认。为此必须把印渍纸上这些剩余的活性基团事先封闭再行检出。印渍术中这种和印渍纸剩余