酶联印迹法（Western-Blot）应考虑的几个技术要素

V. C. W. Tsang

The Enzyme-Linked Immunoelectrotransfer Blot ("Western-Blot"): Technical Considerations

Victor C. W. Tsang

(Helminthic Immunology Activity, Helminthic Diseases Branch, Divison of Parasitic Diseases, Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control, U.S.Public Health Service, Department of Health and Human Services, Atlanta, GA 30333 USA)

提　要

本文对蛋白质的十二烷基硫酸钠（SDS）-聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE），酶联印迹法（EITB）的条件和所用试剂的改进进行了讨论。EITB的应用已在各种研究和日常临床检测得到证实。文章着重阐明有关印迹的条件、灵敏度、试剂和仪器的使用局限性、样品的处理和加样器方面的问题。

引　言

酶联印迹法（EITB）又称 Western blot，在不到六年的时间里已基本上从一种研究技术逐渐发展成一种临床检测手段。由于大部分研究程序经常变动，EITB也经历了一些重大改进。最近有几篇综述文章（Tsang 等，1985；Towbin 与 Gordon，1984；Symington，1984；Gershoni 与 Palade，1983）讨论了这类方法的演变与改进。

最初介绍的EITB（Tsang 等，1983）分为三步：Ⅰ．用SDS-PAGE将复杂的生物大分子或简单的生物大分子混合物分开。Ⅱ．用第二次定向电泳将被分开的分子从凝胶转移到硝酸纤维素膜，牢固地结合于膜上，这一步一般被称为“印迹”。Ⅲ．第一步被分开，第二步“印迹”到硝酸纤维素膜上的大分子与抗体结合，通过酶联免疫吸附测定（ELISA）而被检测出。

本文着重阐述免疫印迹法(immunoblots)的实际应用与方法学方面的问题。我们介绍的蛋白质免疫印迹法已详述于疾病防治附属中心（CDC）的一本名为“HIV（人类免疫缺陷性病毒，原称HTLV-Ⅲ/LAV）抗体的酶联印迹（Western blot）”的手册中。

这一详细方法在疾病防治附属中心及其它地方所进行的许多实验课程已广泛试验过，所编入的大部分内容是近3年来改进的技术，我将讨论这一技术每一步的构成及其最佳试验条件。

步骤Ⅰ—SDS-PAGE

在介绍蛋白质印迹技术的应用方面，Towbin等（1979）报道了用Laemmli凝胶与缓冲系统分析SDS处理的蛋白质，这是当今最通用的SDS-PAGE系统之一。我们选择了一种改良的、不连续的Tris-硼酸盐-硫酸盐-氯化物缓冲系统（Tsang等，1983；Jovin等，1971；Neville等，1974）制备梯度凝胶，优选这一系统的原因是分辨率高、谱带清晰，即令用单一百分比的凝胶替代梯度凝胶时，这个缓冲系统也能形成清晰狭窄的谱带。而且由于这一缓冲系统极高的“堆集”效应(Stacking efficiencies)，即使是很稀的样品也能被浓缩成狭窄的谱带，因而只需极其少量的样品（见后面的样品处理及加样部分）。我们也试验过其它缓冲液和凝胶系统，包括Laemmli系统，但产生的所有谱带均比我们选用系统的谱带宽。

虽然事实上所有被试的SDS-PAGE系统都能用于印迹法，但我们观察到转移率较低的现象，特别是用等电聚焦凝胶时，然而其最终结果还是可用的。许多PAGE系统的印迹效率小于100%，不同蛋白质转移的量也不同。

步骤Ⅱ—印迹（blotting）

文献中介绍了各种缓冲液与电泳条件。最近的一篇综述（Tsang等，1985）中列举了一些最常见的条件。在这一步我们与Towbin等人（1979）的方法相比有很大的差别，Towbin法是蛋白印迹最普通的方法。表1说明了这两种印迹系统的主要区别。

谈到印迹系统的条件，我认为印迹期间所用的电流量是其最重要的因素，尤其是在高电场强度下，对高分子量化合物来说，蛋白质从凝胶转移到硝酸纤维素膜的效率显然较高。表2与表3列举的实验数据阐明了这一现象。

预染的标准分子量蛋白（Cat#6041SA，Lot#51101）从马里兰州BRL购买，这些蛋白质按以前介绍的方法（Tsang等，1984）重新配制、处理与存放。

每份5 μl的预染蛋白用两块相同的10%凝胶SDS-PAGE分离后按表2所列条件印迹30分钟。

从表3所介绍的数据可清楚看出，较高的印迹电流确实促进蛋白质分子从凝胶转移到硝酸纤维素膜上，这对分子量大于20万道尔顿的分子（如肌球蛋白）尤为明显。同时，一般担心的“过度印迹”（Over-blotting）和失去一些低分子量蛋白看来尚未发现（见表3有关β-乳球蛋白和溶菌酶的资料）。对中等范围分子量（4～15万道尔顿）的蛋白而言，低的或高的电流条件均可。

尚未弄清印迹效率的增加是与高温、高电流有关或是二者双兼。我们选用这两种缓冲液目的在于阐明这样的观点：即令在较低的平均功率（瓦特数）和电压条件下，在

表 1 两种印迹方法的比较特征

Table 1 Comparative features for protein blotting after SDS-PAGE

条件/缓冲液	Towbin 等	Tsang等
缓冲液	25mmol/L Tris/HCl 20% MetOH 193m mol/L 甘氨酸 pH8.35	212mmol/L Tris/HCl 20% MetOH 无甘氨酸 pH9.18
起始电压	30～100V	**200～120V
终止电压	30～100V	120～150V
起始电流	0.1Amin	1.5Amin
终止电流	0.2Amax	2.8Amax
优选控制条件*	电压（100V）	电流（2.5A）
电泳时间	30V＝18小时 100V＝4小时	1.5A＝1.5小时 2.5A＝0.5小时
缓冲液温度 （循环冷却，－5℃）	4℃－开始 4℃－终点	4℃－开始 45℃－终点
转移效率		
>200,000道尔顿	～50%	～100%
<50,000道尔顿	～100%	～100%

* 循环冷却对两个系统都是至关重要的，除非不断除去电流产生的热量，否则印迹缓冲液的温度将随着相继产生的传导率的增加而提高，这将引起电流产热量输出的增加，最终可能导致印迹槽的熔化。为防止这一点，我们连接了带继电器的热敏线路到电源处，定最高极限为45℃，达到该温度时，继电器将切断印迹槽的电流；当温度降到45℃以下将保证电流输入。

** 原文如此，可能为100～120V之误—译者。

表2 印迹条件的比较*

Table 2 Comparative blotting conditions

时间消耗	高电流的印迹 (0.424mol/L Tris/HCl 20% MetOH pH9.18)				低电流的印迹 (0.212mol/L Tris/HCl,20%MetOH,pH9.18)			
	A△	V△	W△	℃△	A△	V△	W△	℃△
开始	1.0	108	108	4	0.76	108	82.1	4
10 分钟	1.0	79	79	12	0.85	108	91.8	7
20 分钟	1.0	76	76	12	0.85	108	91.8	7
30 分钟	1.0	73	73	13	0.93	108	100.4	7
平均	1.0	84	84	—	0.85	108	89.0	—
控制方式	电流				电压			

* 在印迹期间，两种缓冲液均循环冷却，保持在－5℃(原文如此—译者)

△A＝安培；V＝伏特；W＝瓦特；℃＝温度

0.424mol/L Tris/HCl缓冲液中，正是较高的电流产生了较高的印迹效率。从表2也可看出，较高的电流确实产生较多的热。温度较高究竟是否印迹效率较高的原因是不能肯定的，因为较高的温度是较高的电流引起的。在高温条件下，聚丙烯酰胺凝胶网格的孔径可能因热膨胀而变大，这本身就可导致凝胶中蛋白质分子易于移动。

表3 用激光光密度计（Laser densitometry）测定印迹蛋白带的相对量

Table 3 Retative quantitation of blotted protein bands by laser densitometry

蛋白质[1]	分子量[2]（千道尔顿）	相对量[3]（峰的积分面积）	
		（0.424M[4]）	（0.212M[4]）
肌球蛋白	224	4.143	1.619
磷酸化酶b	102	4.785	4.705
牛血清蛋白	69	10.745	10.097
卵清蛋白	48	10.670	10.574
α-糜蛋白酶原	30	11.562	11.168
β-乳球蛋白	18	21.615	10.275
溶菌酶	16	7.148	7.741

1. 预染的标准分子量蛋白购自BRL（见正文）
2. 由于染料电荷起的作用，预染蛋白质的分子量稍有变化，这些数字用先前介绍的方法（Tsang等，1984）重校。
3. 印迹谱带用备有SL-504-XL扫描仪的激光光密度计（Biomed Instruments, Inc. Fullerton）定量测定。峰的积分面积以内标线换算。
4. 印迹的条件如表2所定，凝胶被印迹30分钟。

无论如何，所有印迹均应在高电流但温度又不超过65℃下进行。我们的SDS-PAGE样品是在65℃下处置的，所以未必可能在这一较低的温度下进一步引起任何热变性。然而，因为大多数电源未装备热传感器，故在高电流印迹时，操作者必须格外小心！如果让温度升得太猛或太高，缓冲液将沸腾，一旦缓冲液蒸发而使电极裸露，随之而来的是印迹槽的熔化，简直是冒失火之险！因此，不主张即使是在低电流与低电压下的印迹过夜。

要了解印迹后漂洗与封闭（blocking）的细节，读者可以参阅最近发表的一篇文章（Tsang等，1985）。

酶联结合

任何酶联免疫测定的灵敏度和一定程度上的特异性都取决于显色反应，或者是抗体和酶的结合物。因为实际观察到的颜色是通过酶促反应使底物转化为产物而形成的，最终能定量的数据取决于全部洗去未结合的酶标抗体后存在的活性酶量，因而免疫学活动过程所产生的颜色信号（或灵敏度）能简单地用增加结合于第二抗体上的酶分子数而增强。反过来说，如果第二抗体用酶标记得不当则不可避免地灵敏度低，结果不好。

酶结合的第二抗体的克分子比率是一个极重要的因素。最理想的是结合物应通过免疫亲和（immunoaffinity）纯化和最大量活性酶分子共价交联而又不产生严重的空间障碍。关于结合物的分子构成在ELISA测定中所起作用的讨论已在早先介绍过（Tsang等，1984）。

市场上有各种浓度和形式的许多结合物出售。其中有些产品浓度可能很高，以致操作者能用其高倍数稀释液为试验溶液。然而，如果IgG/POD比率很低，或者只有少数

指示抗体被标记，那么结合物并无最大的灵敏度，下述实验说明了这一点。

HIV 粗制抗原用10%凝胶通过SDS-PAGE分离，印迹到硝酸纤维素膜上。然后将硝酸纤维素膜剪成3 mm宽的条子，每条有等量的全部病毒抗原，再将这些条子以每4条一组分成13组，放到不同的模拟血清或盐水中，反应1小时。模拟血清用0.01mol/L Na_2HPO_4 /NaH_2PO_4，0.15mol/L NaCl，0.3%Tween-20，pH7.20（PBS/Tw）稀释成1:100。每4条硝酸纤维素膜均放入相同稀释度的血清中，作用时间相同。模拟血清是用含抗HIV抗体的CDC标准阳性参考血清VS2151与CDC标准阴性参考血清VN2152混合配制而成，开始时阳性与阴性血清的比为1：4，终点是1:65536。将12个血清样品与一个空白盐水对照进行编号，所有以后的试验均随机进行。

因为血清样品按常规用 PBS/Tw 作 1:100 的稀释，最终的稀释相对于阳性标准参考血清为1:400到1:6553600的范围，每组4条硝酸纤维素膜用2.0ml稀释样品。

13组硝酸纤维素薄膜条与稀释血清样品温育1小时后，漂洗，重编成4组，每组13条，包括原先4条一组中的一个代表。然后4个组在4种不同的结合物溶液中再作用1小时，每种结合物溶液具有不同的IgG:POD克分子浓度比：1:0.2，1:0.5，1:1.1和1:2.3。这些结合物的蛋白浓度相同，每毫升PBS/Tw含50ng。这4种结合物中浓度较高的并不改善其灵敏度，也不增加阳性抗原谱带的强度。然后所有试条与底物作用显色，其结果如图1所示。

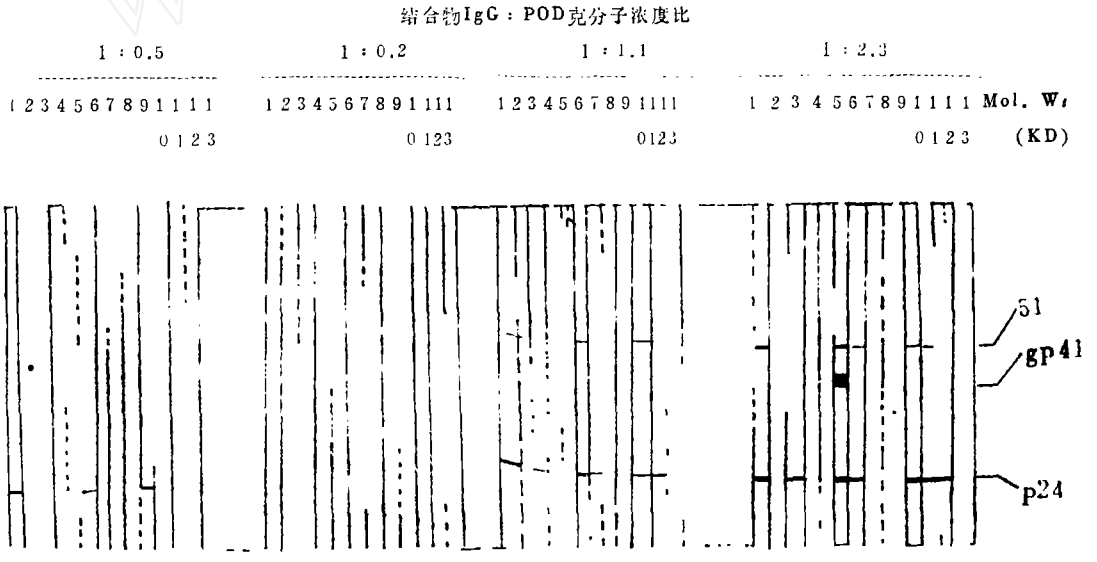

图1 不同IgG：POD克分子浓度比率结合物灵敏度的比较

Fig 1 Comparing sentivities of conjugates with varying IgG: POD molar ratios

所有硝酸纤维素薄膜条剪自相同薄膜，这样它们就含有同等数量、质量的HIV抗原。图中数字表明和每一张条作用1小时的抗体阳性血清的最终稀释度(详见文)。每步稀释4倍，最终稀释分别为：1＝1：1600，2＝1：409600，3＝1：25600，4与8＝纯净的阴性血清，5＝1：1638400，6＝纯净的阳性血清，7与11＝1：6400，9＝1：6553600，10＝1：400，12＝1：102400，13＝盐水空白对照。然后4组条子与4种不同结合物作用1小时，这些结合物浓度相同，均为50ng总蛋白/ml。温育均随机进行，所有子条均显色10分钟。

图1清楚地指出，前两种1:0.5与1:0.2克分子浓度比结合物是低灵敏度的，而谱带的强度和灵敏度与IgG:POD比率成正比。

克分子浓度比率愈高，检测的局限性就会愈大。通过试验我们已测出IgG:POD克分子浓度比率在1:2.0与1:4.0之间最适宜印迹转移，至少对HIV系统是如此。超过1：4的比率，未检测出灵敏度的增加。克分子浓度比为1:0.5或更低的结合物不适用于印迹。

在测定各种结合物克分子浓度比时，必须确定所有未结合或游离的POD均已除去。就我们实验室制备的结合物说，通常用终浓度为40%饱和度的$(NH_4)_2SO_4$、4℃、pH 7.2下沉淀所有的结合产物。在这条件下，仅IgG与IgG-POD被沉淀而留下游离的POD于上清液。然后将沉淀物溶于PBS/77%甘油，从这一部分测出IgG:POD的克分子浓度比。这一简便方法很适用于大多数结合产物。然而，含有高度共聚合作用（Co-polymerization）的结合产物（例如$[IgG\text{-}POD\text{-}(IgG\text{-}POD)]_n$）在沉淀后不能再溶，对这类结合物，分子筛柱层析对分离未被结合的POD是最为有效的。

样品的处理与加样

EITB的样品通常用0.1—2.5% SDS在pH7.0—8.0，65℃下处理15分钟。我宁可在该温度而不是在通常的100℃下处理所有样品，因为在高温下可能发生分子降解。如若可能，样品在1.0% SDS中热处理15分钟，加样前再稀释到SDS最终浓度为0.1%。含糖蛋白多的样品应该用2.5% SDS加热。在所有情况下，不论SDS实际使用浓度如何，都必须保持SDS的重量至少比蛋白质超过10倍。大量加终浓度高于0.1%SDS的样品（每毫米凝胶大于5 μl），PAGE期间产生的堆集（Stacking）效果差，因而建议在加样前将样品稀释至0.1%SDS。

象二硫苏糖醇（DTT）和2-巯基乙醇（2-ME）之类的还原剂不要与粗抗原制品共用。用二硫化物还原剂还原复合蛋白质混合物会增加蛋白总的谱带数。由二硫键连接多个亚基构成的天然大分子经还原后变成复合蛋白。当需要还原时，我宁愿用DTT而不用2-ME，因为DTT比较安全和易于处置。一般用终浓度为50m mol/L的DTT来还原二硫键。在PAGE前所有样品的稀释剂中均应保持50mmol/L DTT的浓度这一点也很重要。

一般认为在结合物适宜时印迹的灵敏度约每条带为10pg到1 ng。根据我们的经验，用*Schistosoma*, *Taenia*, *Echinococcus*, *Giardia*, ameba, *Toxoplasma*, malaria和HIV抗原，需要加样的范围为10～100ng/mm。加入较多的蛋白质样品仅仅产生较高的非特异性反应，而并不改善其灵敏度。印迹HIV时，我们发现了在12个不同的抗原制剂中加入10到80ng/mm的样品，对灵敏度与特异性都是最适宜的。超过此范围，我们发现了高度非特异性反应，特别是p24核心蛋白带。用牛奶或白明胶封闭也未能完全消除这种非特异性。如果可能，应测定抗原滴度以决定其最适浓度。

概　　要

虽然在本文中考察了我们的印迹法的几个关键问题，然而这一简要的综述仅能作为

一般的指导。文中阐明了在该操作程序中我们优选某些试验条件的缘由。另外的条件已在其它系统中成功地使用。纵观许多实验室使用该技术的情况，明显看出印迹法是很有用处的，并将随着其它应用的发现而变得更为大众化。然而当我们用这一有应用前景的有力工具时，也应该认识到其局限性：使用的结合物不当则不发生反应便是其一（图1）。正如其它免疫测定法一样，印迹法将仍然会有灵敏度与特异性的问题。灵敏度的问题似乎将随着使用更好的结合物和更有效地标记第二抗体而得到改善。至于特异性仍是一个与抗原性质有关的问题，封闭非特异性的结合位点仅是“涂脂抹粉”的作用，更好的解放办法应该是分析与排除非特异性的起因。

因为多数免疫印迹法是用SDS使蛋白质变性来完成的，所以印迹法最使人迷惑不解的一个问题不是它的作用如何尽善尽美而倒是它为何起作用。用SDS来使蛋白质变性一般认为是较激烈的、甚至可能是不可逆的，因为SDS的结合作用很强，并且蛋白质-SDS的复合物被认为是无规则卷曲的。三级结构和某些二级结构抗原位点的消失在SDS存在时是必然发生的。另外，在印迹薄膜上还有许多SDS处理过的蛋白质有免疫学活性，这必然意味着：（1）用SDS变性后印迹检测的所有免疫学活性与仅有一级结构抗原性的位点有关，或者（2）印迹后足量的SDS被除去，蛋白质在硝酸纤维素膜上重卷曲使得抗原性恢复。这是两个尚待实验证明的似有道理的解释。目前我们还不能肯定，当印迹法检测抗原活性失败，它可能只是技术上的失误。

尽管有这些局限性，印迹法仍不愧是确定抗原-抗体特异性的强有力工具。以HIV印迹技术用于日常临床检测为例，即使是用较粗的抗原混合物，印迹法也能简便而有效地进行。

这后面一点可能是本技术最有吸引力的地方。作为生化技术的单向与双向聚丙烯酰胺凝胶电泳系列是分离技术中实现高分辨率方法中的一种，与高灵敏度的酶联免疫测定法相结合构成EITB法，能够并已对免疫化学研究领域作出巨大贡献。在含同样抗原并已经印迹的硝酸纤维素薄膜条上用两种单克隆抗体得出的两组不同谱带，比使用其它检测方法更能说明这两种单克隆抗体特异性的差别。

随着使用试剂与SDS-PAGE/硝酸纤维素膜印迹条件的进一步改善，我相信免疫印迹法在研究和临床实验上将继续发挥作用。

参 考 文 献

〔1〕 Gershoni, J.M.and Palade, G.E., 1983, *Anal. Biochem.* 131, 1—15

〔2〕 Jovin T. K., Dante, M. L. and Chrambach, A., 1971, Federal Scientific and Technical Information, U.S.Department of Commerce, PB 196085—196091, Springfield, Virginia.

〔3〕 Laemmli, U.K., 1970, *Nature* 227, 680-685

〔4〕 Neville, D.M., Jr. and Glossmann, H., 1974, *Methods in Enzymol.*XXXII B, 92-102

〔5〕 Symington, J.1984, Electrophoretic transfer of proteins from two-dimensional gels to sheets and their detection. In *Two-dimensional gel electrophoresis of prorteins: Methods and applications* (Celis, J.E.and Bravo, R.Eds.), Academic Press, New York.128-168

〔6〕 Towbin, H., Staehelin, T.and Gordon, J., 1979, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.*76, 4350-4354
〔7〕 Towbin, H., and Gordon J. 1984 *J.Immunol.Methods.*72, 313-340
〔8〕 Tsang, V.C.W., Peralta, J.M.and Simons, A.R., 1983, *Methods Enzymol.*92, 377-391
〔9〕 Tsang, V.C.W., Hancock, K., and Maddison S.E., 1984.*J. Immunol.Methods.*70, 91-100
〔10〕 Tsang, V.C.W., Hancock, K.and Simons R.A., 1984, *Anal.Biochem.*143, 304-307
〔11〕 Tsang, V.C.W.,Bers, G.E.and Hancock, K., 1985, Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) in *Enzyme-mediated Immunoassay* (Ngo, T.T.and Lenhoff, H.M.Eds.) Plenum Publishing Corporation,389-414

（陈明彬译，吴远明、吴章琦校）

兔细小病毒（原兔出血症病毒）分类鉴定研究成果在汉通过专家鉴定

The Appraisal about Studies on Classification and Identification of Rabbit Parvovirus in Wuhan

兔细小病毒分类鉴定研究成果鉴定会，于1987年12月22日在武汉举行。会议由中国科学院武汉分院主持，到会专家有全国著名病毒学家、中国科学院学部委员高尚荫教授，病毒学家刘年翠教授等八名病毒学界老前辈，在对研究报告进行严肃认真审议评价后，专家们一致认为：

（一）本研究工作对兔细小病毒无锡 A_2R-3株进行了比较系统鉴定，获得大量实验数据，证明该病毒属于细小病毒科(*Parvoviridae*)的细小病毒属(*Parvovirus group*)。并建议将原用该病毒引起的症状命名的“兔出血症病毒”（Rabbit Hemorrhagic Disease Virus RHDV）命名为兔细小病毒（Rabbit Parvovirus）。

（二）血清学研究证明，不同地区的兔细小病毒分离物 A_2R-3、H.E、J.Sh、B.J病毒血清学关系基本一致。

（三）本研究工作对今后进一步研究我国各地分离的兔细小病毒的核酸类型和血清型及与日本兔细小病毒的关系奠定了基础，也为亚单位疫苗的研制进行了必要的准备。

到会专家一致通过：这项成果在当前兔细小病毒分类鉴定研究中是较系统和全面的，对其病毒的性质及归属作了明确的论述，本工作在国内是一项较好的科研成果。

（黄文林 孙松柏）