DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.02.022

蛋白免疫印迹法在 G蛋白检测中的应用*

熊仁平** 周元国 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第四研究室) 重庆, 400042

提 要 目的: 建立一项用蛋白免疫印迹法测定鸟苷酸结合蛋白(G蛋白)含量的技术。方法: 取冷冻组织块 200 mg置于 4℃预冷的匀浆缓冲液中匀浆、离心后, SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 电转移法转移至硝酸纤维素膜上, 经 5% 脱脂奶粉封闭后, 依序与抗 G蛋白抗体和辣根过氧化物酶标记的 IgG反应, 化学发光法检测。结果: 所得的 G蛋白目标带清晰、明显, 重复性好。不同种属大鼠主动脉、心房、心室、脑组织中 Goα 和 Giα 均为单一带, Fischer 344大鼠 Gsα 主动脉为 4条带, Sprague-Dawley和 WKY/SHR大鼠主动脉 Gsα 为 3条带, 心房和心室 Gsα 为 3条带, Fischer 344和 Wistar大鼠脑组织中 Gsα 只有两条带。Wistar大鼠肺组织浆和膜中 Gqα、Giα 均为单一带, Gsα 两条带; 肺组织膜中 Goα 为单一带, 肺组织浆中未能检出 Goα。结论: 用 Western blot技术可较好地检测 G蛋白含量和带型分布。不同种属动物及组织 G蛋白亚型的含量和带型分布是不完全相同的。

关键词 Western blot; G蛋白; 大鼠; 肺损伤; 肺; 心脏; 主动脉
中图法分类号 R392-33

蛋白免疫印迹法(Western blot)是一项综合凝胶电泳高分辨率和生物分子亲和技术高特异性与敏感性的技术, 用于蛋白质的分析与检测。我们利用国内条件建立了 Western blot研究方法, 并应用于鸟苷酸结合蛋白(Guanine nucleotide-binding protein, 简称 G蛋白)在不同种属大鼠心、脑、肺及主动脉组织中的含量分析, 获得了满意的效果, 现报告如下。

1 材料与方法

1.1 主要仪器及试剂

电泳仪, 垂直电泳槽以及电泳转移槽(北京东方仪器厂产), 低温高速离心机(Backman公司产)。

SDS(Bio-Rad公司产品), 脱脂奶粉(台湾产品), 抗 G蛋白抗体(美国杜邦 NEN公司产品), 辣根过氧化物酶标记 IgG(Bio-Rad公司产品), Tris base和 Tris·HCl(IBI公司产品), 牛血清白蛋白(美国 Sigma公司产品), 增强型化学发光(ECL)显影药盒(美国杜邦 NEN公司产品)。

1.2 方法

1.2.1 动物 雄性 Fischer 344, Sprague-Dawley, WKY/SHR, Wistar大鼠, 按各部分实验要求[1,2], 断头处死, 速取脑、肺、主动脉及心脏于 4℃预冷的 pH7.0的 PBS(NaH_2PO_4 0.08 mol/L, Na_2HPO_4 0.32 mol/L, NaCl 3.6%)中, 洗去余血, 置 -70℃保存待用。

1.2.2 细胞浆、膜蛋白的制备 参照文献[3]改进后实施。将冷冻组织置于 4℃预冷的含 0.4 mmol/L PMSF, 1 mmol/L 1.10 Phenanthroline, 1 mmol/L Iodoacetamide和 1μmol/L Pepstatin A的 pH7.0的匀浆缓冲液(NaH_2PO_4 0.08 mol/L, Na_2HPO_4 0.32 mol/L NaCl 3.6%) 1 ml中, 冰浴下剪碎、匀浆(14000 r/min, 20 s×2次)。2100 r/min, 离心 15 min, 取上清, 12000 r/min离心 25 min上清为浆蛋白, 沉淀为膜蛋白。膜蛋白洗涤一次。浆、膜蛋白均存于 -70℃备用。离心均在 4℃进行。

1.2.3 电泳 将制备的浆、膜蛋白样品用改良的福林酚法定量, 牛血清白蛋白为标准。按 1:1加入样品缓冲液(2% SDS, 10% Glycerol, pH7.6的 80 mmol/L Tris·HCl, 用前按 9:0.5:0.5加入此缓冲液, 0.1% 溴酚蓝, 0.5% DTT贮备液), 终浓度为 2 g/L, 100℃处理 3 min, 10000 r/min, 离心 30 s, 用 11% 聚丙烯酰胺凝胶(dH_2O 2.18 ml, 3.0 mol/L Tris 1.5 ml, 30% Arc 2.2 ml, 10% SDS 0.12 ml, 10% APS 60μl, TEMED 5μl)垂直平板电泳, 胶为非连续性, 上样量 30~80μg, 每样至少上两块平行胶, 用 Amersham公司产中分子彩虹蛋白分子量标准作为确定分子量的依据。预电泳电压 50 V, 15 min; 电泳电压 100 V, 电泳缓冲液为甘氨酸溶液(0.303% Tris base, 1.444% Glycine, 用前加 0.1% SDS), 3 h后, 取下凝胶将相同的两块胶一块用于考马斯亮蓝染色, 确认上样量的一致性, 另一张用于电转印。

1.2.4 电转印 将胶及硝酸纤维素膜(Ncm)夹于两张滤纸之间, 放入已装有电转液(pH8.2~8.3, Glycine 190 mmol/L, Tris base 20 mmol/L, Methanol 20%, SDS 0.02)的电转移槽, 电压 15 V, 转印 10 h后取出, 将转移后的凝胶染色, 检查转印是否完全, 然后将 Ncm仔细做好标记。

1.2.5 杂交 将做好标记的 Ncm置于含脱脂奶粉的 pH7.2的 PBS(NaCl 9.0 g/L, KCl 0.224 g/L, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 3.58 g/L, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 0.28 g/L)中封闭 12 h, PBS漂洗 1×15 min, 2×5 min后加入抗 G蛋白抗体, 室温反应 1 h后, 将 Ncm用 PBS清洗 1次×5 min, 2次×5 min后置于辣根过氧化物酶标记的 IgG中反应 40~60 min, PBS洗 1次×15 min, 4次×5 min后待检测。抗体稀释均用含 3% 牛血清白蛋白的 pH7.2的 PBS。

* 国家自然科学基金资助项目, No. 39470305
** 熊仁平, 男, 35岁, 实验师, 本科

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2.6 检测 将待测的 Ncm置于 Amersham公司产的 ECL蛋白免疫印迹检测试剂中反应 1 min,然后迅速用塑料薄膜包好,与 X线胶片一同放入暗盒曝光 10 s至 3 min,再将 X线胶片显影定影。

1.2.7 分子量确定 仔细检查 Ncm上的彩虹分子量标准在 X线片上的对应位置及电泳起始点,计算各目标带的分子量。

1.2.8 Western杂交分析 将 X线胶片置于图像扫描仪下,对目标带进行密度分析,结果用灰阶×面积表示。校正上样量根据同时进行的电泳复本胶染色干燥后形成影像的密度进行校正。

2 结果

用 11%不连续聚丙烯酰胺电泳可很好地分离目标样品,各带规则,分辨率高,见图 1。将其转移到 Ncm上,经用 5%~6%脱脂奶粉、1∶(1000~1200)抗 G蛋白抗体和 1∶8000辣根过氧化酶标记的 IgG与待测 Ncm反应,得到了背景干净,目标带清晰,非特异结合少的 X线片,见图 2。

不同种属大鼠不同组织的 G蛋白亚型各带分布及分子量不完全一致。

雄性 Fischer 344大鼠:主动脉 Goα、Giα均为单一带,其分子量分别为 39、41 kD△;Gsα有 4个带,分别是 38、42、45和 52 kD,大多数动物主带为 45 kD,有时则以 42 kD带为主。三者中 Giα含量最为丰富,其次是 Gsα和 Goα。心房及心室中 Goα亦为单一的 39 kD带,心房中 Goα含量高于心室及主动脉,Giα表现为单一的 41 kD带,Gsα的 3个带分别为 42、45和 52 kD,与主动脉不同其主带是 52 kD带。

雄性 Sprague-Dawley大鼠:主动脉,Goα为单一带,位于 39 kD,Giα亦为单一的 41 kD带,Gsα则有 3个分别为 42、45和 52 kD的带,大多数鼠以 52 kD带为主,个别则以 42 kD带为主,3种 a亚基中,Giα含量最高,其次为 Gsα,Goα最少。在心房和心室,Gsα表现为 3个带,分子量分别为 42、45和 52 kD,三者含量比例与主动脉不完全相同。Goα和 Giα仍各为一个带(39 kD和 41 kD)。

雄性 WKY和 SHR大鼠:主动脉中 Giα,Gsα带的分布及分子量类似 Sprague-Dawley大鼠,且信号较弱。在心房和心室,Goα、Giα和 Gsα的分子量及带的分布与 Sprague-Dawley大鼠相似,心房中 Goα显著高于心室。

雄性 Wistar大鼠:我们发现在脑组织中 Goα,Gsα及 Giα含量差异不大,都比较容易检测到,Gsα共两条带分子量分别为 52和 45 kD,含量基本相当,Giα的分子量为 41 kD,而 Goα分子量为 39 kD。心室 Gsα,Giα,Goα各带分布及分子量都与 Sprague-Dawley大鼠相似;Goα含量相对较低,分子量为 39 kD;Gsα仍见 3条带,其中第 3条带(42 kD)检出不太稳定,有时清晰可见,有时隐约可见。Giα比较容易检出,但个别间差异较大。

△ kD现已不用,1 kD= 1× 10^3 u

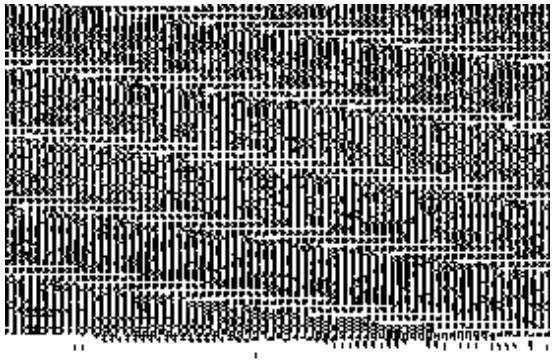


图 1 肺细胞浆及细胞膜蛋白的 SDS聚丙烯酰胺凝胶分析
左侧 4个样品为细胞膜蛋白(40 μg)
右侧 4个样品为细胞浆蛋白(80 μg)

Fig 1 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis analysis of plasma and membrane protein of lung cell
Left four sample are membrane proteins (40 μg)
Right four sample are cytosol proteins (80 μg)

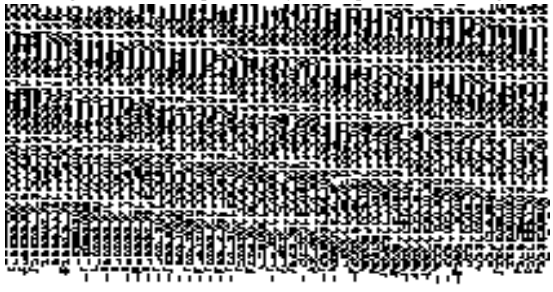


图 2 急性肺损伤后肺细胞浆及细胞膜蛋白 Western blot杂交分析
左侧 4个样品为膜蛋白,右侧 4个样品为浆蛋白

Fig 2 Western blot analysis of lung tissue Gq proteins α subunits during acute lung injury
Left four samples are membrane protein
Right four samples are cytosol protein

3 讨论

G蛋白是耦连受体与第二信使间的蛋白,是细胞外信息进入细胞的门户,不论是在生理状态下,还是在病理状态下,它的水平和活性对维持和控制细胞正常状态均是十分重要的[4]。有效而特异检测 G蛋白是研究 G蛋白作用的基本手段。我们通过不断摸索实践,成功地建立了用 Western blot检测 G蛋白的技术。该方法利用特异性抗血清(抗 G蛋白抗体)和辣根过氧化物酶标记的 IgG与 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后的相应特殊蛋白质(G蛋白抗原)结合来帮助研究者鉴定该特殊蛋白质(G蛋白)。它是电泳技术与免疫技术的高度结合,用于研究 G蛋白在细胞信息传导中的

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

变化是目前十分有效的手段,因为该方法不但敏感而且能特异地检查蛋白抗原的存在,同时又能测定被测蛋白分子量的范围,确定有无多聚体的存在,即既能定性,又能定量。

样品的制备与电泳: PMSF, 1. 10-phenanthroline, iodacetamide and pepstatim A在水溶液中不稳定,且在水溶液中的活性丧失率随 pH值的升高而加快;温度升高,失活率也加快,故应在临用前加于匀浆缓冲液中且应冰溶,匀浆缓冲液的最适 pH定为 7[5]。电泳制胶时,剂量须准,混合均一,以免影响分离效果;加样要稳准,样品量一致,以利统计处理;每块凝胶须编号,且记录编号和加样顺序,以免混淆。

电转印与杂交:① 电转印: 滤纸 /Ncm /凝胶大小应吻合,确保效果; Ncm须标记,免混淆;拿取凝胶、滤纸和 Ncm须戴手套,避免皮肤上的油脂和分泌物阻止蛋白质从凝胶向 Ncm转移;转移过程中确保滤纸、Ncm和凝胶间无气泡,避免影响转移而造成 Ncm上的 G蛋白带断裂或消失。② 杂交: 转印后的 Ncm, PBS漂洗两遍,除去残存凝胶,以利杂交;杂交缓冲液选用含 5% ~ 6%脱脂奶粉,因脱脂奶粉不含有本实验检测的 G蛋白,且价廉物美,既使用方便又可与通常使用的所有免疫学检测系统兼容;杂交缓冲液未加 Tween 20,以免降低抗体效价;封闭,抗体反应中,两张 Ncm置于一皿,以利反应均匀,结果可靠;检测和曝光时应将转移面朝上,充分接触发光剂和 X线胶片,因 G蛋白主要富集于 Ncm的转移面;显影温度 19℃,以利控制显影,得到高质量 X线胶片。

本研究通过定量观察 G蛋白几种主要亚型 α亚基的变化,对生理过程的老化模型到药物脱敏、高血压和急性肺损伤等病理模型进行了研究。在衰老时,主动脉及心脏 G蛋白均有显著的变化,主要表现为主动脉 Gαi、Gβ、Gsα 42 kD带显著下降,心脏则变化不显著,提示老化所致的心血管功能变化可能与 G蛋白有关。因为 Gs下降,使β受体的作用减弱,而 Gi下降,就使老年血管组织对 Ca^{2+} 通道阻滞剂敏感性提高(α1受体通过 Gi与 Ca^{2+} 通道耦联)。以往人们认为药物及激素等脱敏的机理主要是受体数量下降所致,可我们的实验发现慢性输入 NE后,受体的信息传导也有了改变。为了更加明确病理状态下 G蛋白的变化和作用,我们对急性肺损伤模型进行了重点观察,结果发现急性肺损伤后不仅肺中 G蛋白有显著改变,脑组织中 G蛋白也有改变,提示急性肺损伤时,不仅肺是主要受累器官,脑组织也可能受损或参与了肺损伤的发病过程,这为肺源性脑水肿发病机制提供了新的解释。

G蛋白的研究是目前一个非常活跃的领域,各种 G蛋白的亚型以及 G蛋白的 3个亚基都具有很多功能。探索 G蛋白的作用机制以及与疾病的关系有着重要意义。用 Western blot技术检测 G蛋白不仅适用于心血管调节及急性肺损伤机制研究,也适用于妇产科疾病,神经科疾病,内分泌系统疾病,肿瘤,药物的成瘾和耐受,细菌致病机制等多方面的研究[4],故在此报告我们的工作结果,以供广大同道参考。

参考文献

1 熊仁平,周元国.大剂量地塞米松对油酸性 RDS的疗效研究.四川医学, 1996; 17(6): 345

2 周元国,熊仁平,王正国.衰老大鼠心脏与主动脉 G蛋白 α亚基的变化研究.生理学报, 1996; 43(3): 187

3 Hawlow E, Lane D. Antibodies: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988 471~ 504

4 周元国,王正国. G蛋白及其研究进展.生理科学进展, 1996; 27(3): 187

5 丁·萨姆布鲁克, E F弗里奇, T曼尼阿蒂斯著.金冬雁,黎孟枫译.分子克隆实验指南.第 2版.北京: 科学技术出版社, 1996 888~ 898

(收稿: 1997-10-03;修回: 1998-01-05)

(编辑　汪勤俭)

Use of Western blot for determination of guanine nucleotide-binding proteins in rats*

Xiong Renping, Zhou Yuanguo (Research Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042)

Abstract Objective: To seek a technique of determining the content of guanine nucleotide-binding proteins (G-proteins) in the tissues of rats. Methods: After each 200 mg of tissue was homogenized in prechilled homogenizing buffers at 4℃, the proteins were separated by SDS-polyacylamide gel electrophoresis and elec-

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China No. 39470305

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

troblotted to nitrocellulose membrane. The films of nitrocellulose membrane were blocked with 5% no-fat milk and then reacted with G-protein antibody and secondary Ab-HRP in order. Finally, the G-proteins were detected with chemiluminescence. **Results**: Target bands of G-proteins was very clear and had nice repeatability. There were one Gαi and Gαo bands with molecular weights of 39kD and 41kD in the aorta, atrium, ventricle and brain in rats of different races. There were four Gsα bands with molecular weights of 38, 42, 45 and 52kD respectively in the aorta of Fischer 344 rats and three with molecular weights of 42, 45 and 52kD respectively in that of the Sprague-Dawley and WKY/SHR rats. Three Gsα bands with molecular weights of 42, 45 and 52 kD were found in the atrium and ventricle in rats of different races. In the brain of the Fischer 344 and Wistar rats, only two Gsα bands with molecular weights of 45 and 52 kD were seen. One Gqα band and one Giα band with molecular weights of 42 and 41 kD respectively while two Gαi bands with molecular weights of 45 and 52 kD were found in the cyctosal and membrane of the lungs in Wistar rats. **Conclusion**: Western blot is a good method for determination of the content and band distribution of G-proteins. The subtype and band distribution of G-proteins are different among different tissues and animal races.

Key words western blot; G-protein; lung; heart; aorta; rat

(上接141页)

表1 大肠癌手术前后血液、胃液及对照组 **CEA**值(ρ_B/μg·L^{-1})

	胃液	血液	对照组
术前	52.28±28.84△△	27.24±19.13△△	11.35±7.84
术后	12.15±9.68	8.03±7.32	

△△: $P<0.01$与术后比较

由于血液与胃液 CEA值属不同来源,不直接进行比较。

胃液 CEA的阳性判定值以胃液对照组的 $\bar{x}\pm 2.5s$ μg/L为标准,即> 30.95μg/L(11.35±2.5×7.84)为阳性。血清以> 15μg/L为阳性判定标准。胃液 CEA值的阳性率显著高于血液,胃液及血液术前 CEA阳性率(%)显著高于术后见表2

表2 胃液与血液 **CEA**阳性率的比较

	胃液	血液
术前	71.43(20/28)**△△	50(14/28)△△
术后	7.14(2/28)	7.14(2/28)

**: $P<0.01$与血液比较;△△: $P<0.01$与术后比较

二者联合测定阳性率为78.57%(22/28)较胃液 CEA值稍有升高,但二者比较差异不显著($P>0.05$)。

3 讨论

CEA是一种胚胎性抗原。但近年来研究发现 CEA不是单纯的均一性物质,具有相当大的异质性,是一个大家族[1],不仅存于胚胎性肿瘤和结直肠肿瘤中,在其它许多组织的肿瘤和疾病中也发现了 CEA。在胎儿胃肠道及正常胃肠道上皮的分泌液中也含有一定量的 CEA,它是由胃肠道上皮细胞及基质细胞分泌的[2]。CEA在结直肠肿瘤时的血清水平较在胃癌及其它疾病增高显著,但尽管这样仍然有半数以上的结直肠癌患者的血清 CEA不增高,而癌组织及其转移灶中却有表达,Roselli[3]采用抗 CEA单克隆抗体进行组织学检查证明了这一点,即血清 CEA水平并不能揭示肿瘤中 CEA的表达。在本研究中,我们采用了检测胃液 CEA的方法,发现胃液中也存在着相当量的 CEA,经查阅资料,未见有这类报道,但为何结直肠癌患者会出现胃液中 CEA升高,机制尚不清楚,有待进一步研究。我们推测可能存在着一种胃结肠联动效应或反射效应。

本研究表明:胃液 CEA值及阳性率明显高于血清,提示胃液 CEA的敏感性高于血清 CEA,在一定程度上提高了特异性,对于诊断结直肠癌有重要的辅助作用。与血清 CEA一样,手术后胃液 CEA也有显著下降,且与对照组差异不显著,对手术疗效及预后的判断同样具有十分重要的意义,且敏感性同样高于血清 CEA。二者联合测定阳性率无显著升高,说明胃液 CEA的升高与血清 CEA的升高呈正相关。因此,若胃液抽取方便,我们认为胃液 CEA的结果和意义完全可以取代血清 CEA

关键词 大肠癌;CEA
中图法分类号 R734.34

参考文献

1 Shimada S, Ogawa M, Takahashi M *et al*. Molecular cloning and characterization of the complementary DNA of an M(r) 110,00 antigen expressed by human gastric carcinoma cells and upregulated by γ-interferon. Cancer-Res, 1994; 54(14): 3831

2 Motro B, Itin A, Sachs L *et al*. Pattern of interleukin 6 gene expression *in vivo* suggests a role for this eytokine in angiogenesis. Proc Natl Acad Sci USA, 1990; 87: 3092

3 Roselli M, Guadagni F, Buonomo O *et al*. Intraoperative radioimmunolocalization of an anti-CEA MAb F(Ab)2 (F023C5) in CEA serum-negative colorectal cancer patients. Anticancer Res, 1996; 16(2): 883

(收稿: 1997-06-13;修回: 1997-11-12)
(编辑 王 红)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net