

## S2 免疫轉印法

莊榮輝

**膠體電泳** 可以把蛋白質依照分子量大小分開，若膠體內的蛋白質色帶能轉印到尼龍膜，則這些蛋白質可繼續以其專一性抗體來偵測，成為更強大的解析工具。

### 2.1 背景知識

膠體電泳的原理與前面 P3 實驗完全一樣，而蛋白質轉印也是相同的機制，只是轉個方向，把膠片上的色帶印到尼龍膜。

#### 2.1.1 蛋白質轉印

膠體電泳的解析力雖然很高，可以把複雜的蛋白質混合物分離開來，但是不能方便地鑑別這些色帶的身分；原因之一，是因為膠體本身易脆，不容易進一步操作，因此要先把這些色帶轉移到尼龍薄膜上，再繼續以其它方法檢定之；而最常用的方法，便是以抗體對尼龍膜上的蛋白質色帶進行免疫偵測。

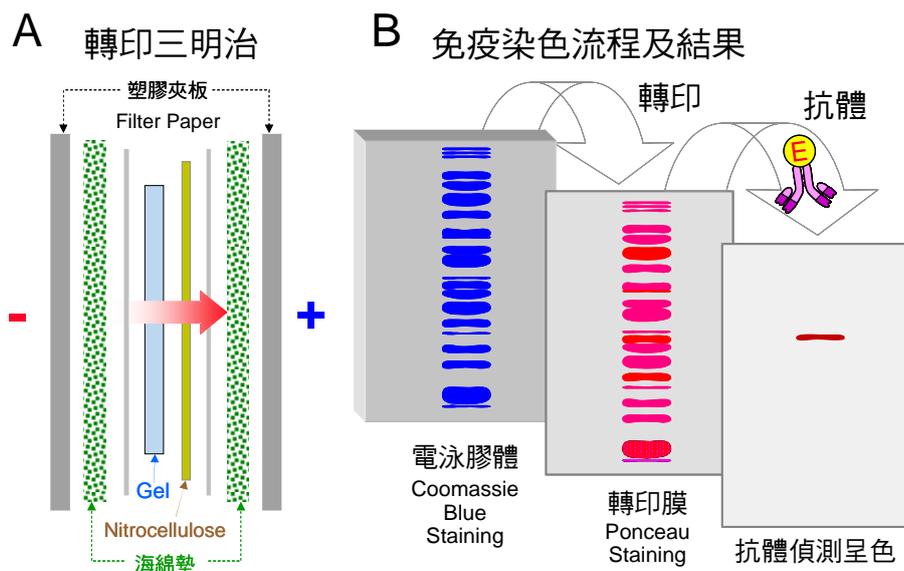


圖 S2-1 蛋白質轉印及免疫染色的原理機制

早期蛋白質轉印法是使用 硝化纖維紙 (nitrocellulose)，蛋白質可吸附在紙上的硝基，不易脫落。後來改用尼龍材質的薄膜 (如 PVDF)，上面有各種修飾基團，可強力地吸引住蛋白質，但降低非專一性的吸附，使結果更為可靠。轉印膜在轉印後的空白部份，通常都要以無關的蛋白質覆蓋起來，以免後面操作所用到的抗體等物質，吸附到轉印膜上去。通常都使用脫脂奶粉，我們則比較常用明膠，隨人喜好而定。

轉印時，要小心分子量較小的蛋白質，可能會穿過轉印膜而損失；可在轉印緩衝液中添加甲醇 (10~30%)，以增加轉印膜對蛋白質的吸附力量。反之，也有商品標榜在一次轉印後，可以同時印出十張相同的轉印膜，減少膠片消耗與轉印時間；這在蛋白質體學的應用上，有相當大的吸引力，因為同一張二次元電泳的轉印膜，可能要進行很多種不同的偵測反應，因此需要很多張相同的轉印膜。

另外，注意有些在轉印以後要分離色點，然後進行胺基酸定序，若是使用 Edman degradation 反應的定序儀，則轉印緩衝液中避免使用帶有  $-NH_2$  基團的成份 (如 Tris, Gly)，以免干擾 Edman degradation。

有時候，可以把酵素轉印到膜上，然後直接在上面進行催化反應，若能產生不溶性的生成物，原地凝集在轉印膜上，則可做為酵素的檢定之用。例如磷酸酶 (phosphatase) 或過氧化氫酶 (peroxidase)，都可直接在轉印後呈色。當然，若使用 SDS 膠體電泳，則必須在轉印後，使酵素充分回復原態及活性。

### 2.1.2 免疫染色

膠體電泳的高解析力，加上抗體的高專一性，結合成為一個極為強大的分析工具。因此，一直到目前，電泳轉印加上免疫染色的流程，都是所有生物科技相關實驗室所必備。

一次抗體有時可以買到商品，但通常都極為昂貴；較不常見的抗原，則必須自行製備抗體，那就要先準備好純質抗原。抗原與佐劑 (adjuvant) 混合成乳劑後，進行動物免疫，通常使用大白兔或小白鼠。每兩週免疫一次，如此進行追加免疫約四到六次，試採血檢測血清效價，若血清稀釋 1,000 到 10,000 倍，仍然可在轉印膜上染出抗原的色帶，則免疫可謂成功，即可進行採血，製得抗血清，其中即含有所要的專一性抗體。

專一性抗體會像『巡弋飛彈』一樣，自動去找出抗原色帶，並且與此色帶緊密結合，然後再利用 二次抗體 (即第一次所用抗體的抗體，可以買到) 與上述抗體結合。圖 S2-2 說明此一設計，抗體上面標有 2 者即為二次抗體，後面連結著標誌酵素 (E)；標誌酵素多使用上述的磷酸酶或者過氧化氫酶，兩者在加入基質後，都可生成具有強烈呈色的沈澱。

使用二次抗體與酵素的連結體，雖然增多一次操作動作，但也提升了整個反應的專一性，因為多加一次專一性篩選步驟，而且自由的一次抗體效價較高。同時也較方便，因為各種一次抗體都可直接使用，然後用二次抗體與酵素連結體即可，不須各種一次抗體都得去做酵素標誌。

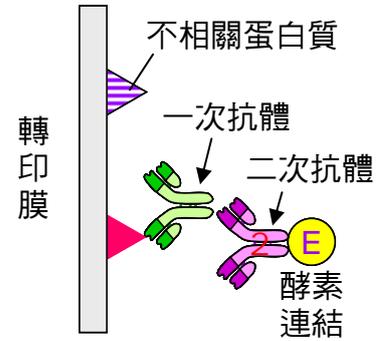


圖 S2-2 免疫染色的設計

### 2.1.3 實驗大綱

本實驗分成三個部份：(1) SDS-PAGE 膠體電泳、(2) 蛋白質轉印、(3) 免疫染色。樣本為前面實驗的 trypsin 及胰臟抽取液，並使用 CHOM 為負對照組，然後以抗 trypsin 的抗體為探針，進行專一性的偵測。

### S2 免疫轉印法

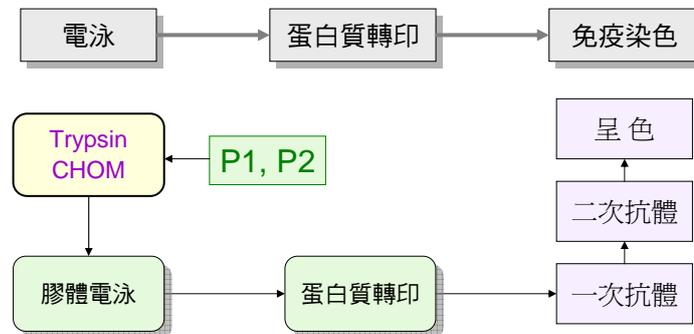


圖 S2-3 蛋白質轉印及免疫染色操作流程

## 2.2 膠體電泳

兩組鑄造兩片平板 SDS 電泳膠片，分別進行各組 trypsin 樣本的分析，接著並進行蛋白質轉印，則請依照下節 2.3 實驗步驟操作。

### 2.2.1 儀器用具

- 鑄膠套件 (含電泳玻片及氧化鋁片)。
- 間隔條 (spacer, 0.75 mm) 及樣本梳 (comb, 10 well)。
- 垂直迷你電泳槽 (Hoefer SE-250 平板式垂直電泳槽)。
- 電源供應器 (Pharmacia Biotech EPS 200)。
- 微量針管 (Hamilton 80465) 或電泳樣本專用吸管頭。
- 染色脫色方盒。

### 2.2.2 藥品試劑

所用藥品與原態電泳類似，但是多了 (e) SDS 及 (f) 樣本溶液，整個系統都要加入 SDS；同時有標準分子量的蛋白質 (k)，可供比對樣本的分子量。

- a) A 液 (T 30%, C 2.6%)：**注意！本溶液有毒性！**

丙烯醯胺溶液 acrylamide	14.6 g
Bis ( <i>N,N'</i> -methylene-bis-acrylamide)	0.4 g

加水至 50 mL，若難溶則稍微加熱助溶之，儲存於 4°C。

- b) B 液 (分離膠體緩衝液)：

Tris	18.2 g
TEMED ( <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyl-ethylenediamine)	0.36 mL

用 60 mL 水溶解後，以 HCl 調 pH 至 8.8 後加水至 100 mL，儲存於 4°C。

- c) C 液 (聚焦膠體緩衝液)：

Tris	0.6 g
TEMED	40 $\mu$ L

用 8 mL 水溶解後，以 HCl 調 pH 至 6.8 後加水至 10 mL，儲存於 4°C。

- d) 通用電泳緩衝液 (5 $\times$ )：

Tris	90 mM $\times$ 5	54.5 g
EDTA $\cdot$ 2Na	2.5 mM $\times$ 5	4.7 g
Boric acid	80 mM $\times$ 5	24.8 g

加水 800 mL 溶解，以 NaOH 調 pH 至 8.4 後，加水至 1000 mL，室溫保存。使用前要以蒸餾水稀釋五倍，並且加 SDS 成為 0.1%。

- e) APS 溶液 (ammonium persulfate, 10%)：

取 0.1 g 溶於 1 mL 水，要確實溶解完全；使用前新鮮配置，過夜者不再用。

f) 10% SDS 水溶液。

g) 異丙醇。

h) SDS 樣本溶液 (2×)：

Tris (250 mM)	0.3 g
EDTA·2Na (4 mM)	14.9 mg
SDS (4%)	0.4 g
β-Mercaptoethanol (10%)	1 mL

加二次水 8 mL 溶解，調 pH 至 6.8 之後，再加水至 10 mL。

i) 追蹤染料：Bromophenol Blue (BPB) 1 mg 加 5 mL 水及 5 mL 甘油。

j) CBR 染色液：Coomassie Brilliant Blue R-250 1.5 g 加 250 mL 水後再加 250 mL 甲醇及 50 mL 醋酸，過濾去掉不溶物，置於排煙櫃中公用。要回收。

k) 脫色液：甲醇 (20%) 及醋酸 (10%) 的水溶液，置於排煙櫃中公用。

l) 標準蛋白質組合：

預先染色之低分子量標準 (Novex SeeBlue Pre-stained Standard)

Protein	Molecular mass (D)
Myosin	250,000
Bovine serum albumin	98,000
Glutamate dehydrogenase	64,000
Alcohol dehydrogenase	50,000
Carbonic anhydrase	36,000
Myoglobin	30,000
Lysozyme	16,000
Aprotinin	6,000
Insulin B chain	4,000

### 2.2.3 鑄膠 (SDS-PAGE)

表 S2-1 各種膠體溶液的濃度 (單位 mL)

分離膠體	7.5%	10.0%	12.5%	15.0%	聚焦膠體	4%
A 液	2.5	3.4	4.2	5.0	A 液	0.7
B 液	2.5	2.5	2.5	2.5	C 液	1.3
水	4.8	3.9	3.1	2.3	水	2.8
10% SDS	0.1	0.1	0.1	0.1	10% SDS	0.1
APS	0.1	0.1	0.1	0.1	APS	0.1
Total	10.0	10.0	10.0	10.0	Total	5.0

分離膠體每支約需 2~3 mL，故一組配製 10 mL 即可。

- 1) 將電泳玻片及氧化鋁片清洗淨後擦乾，再以玻璃清潔劑擦拭乾淨，選擇所需厚度間隔條 (spacer) 組裝於鑄膠套件，本課程由助教事先準備架好。
- 2) 依照表 S2-1 所列的各溶液比例，選擇所需的分離膠體濃度，本次實驗使用 12.5% 膠體。配置膠體溶液時，其中 APS 溶液必須最後加入，小心混合均勻，以避免氣泡產生，然後以微量吸管小心注入鑄膠套件。
- 3) 膠體約佔玻片的 2/3 至 3/4 高度，加完後儘快在膠體液面上方小心加入 100  $\mu$ L 異丙醇，以壓平膠體液面。
- 4) 約 30 min 至 1 h 後 (天冷須更久)，凝膠完成，倒出上層的異丙醇。
- 5) 配製焦集膠體溶液，先準備好所需之樣本梳 (comb)，加入溶液後立刻插入，整個過程必須在 5 min 完成，約 30 min 可完成凝膠。
- 6) 拆下膠片並清理，將多餘的凝膠去除，鑄好的膠片可置封口袋中於 4°C 保存，但要加入少量蒸餾水防止膠片乾裂，使用期限約兩週。一組使用一片。

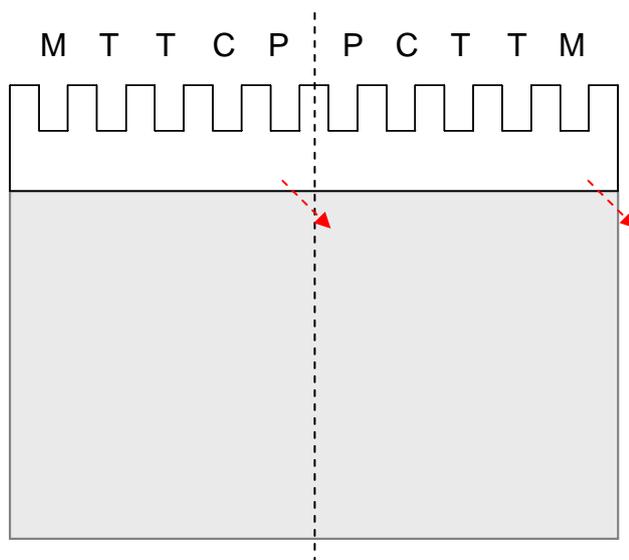


圖 S2-4 添加樣本的配置方式

T 為 trypsin (可能有不同動物來源的樣本)，C 為 CHOM，P 為胰臟抽取液，M 為標準蛋白質。跑完電泳後由中央切開，右上角各切角做記號 (箭頭虛線)；一半進行 CBR 染色，另一半則馬上進行轉印，請接續 2.3 免疫轉印法。

## 2.2.4 電泳

- 1) 若膠片是在 4°C 中保存，須先取出回復室溫。同時將稀釋成一倍的 SDS 通用電泳緩衝液，倒入電泳槽底部。然後把膠片以 45 度架到電泳槽上，避免附著氣泡；當電泳夾夾妥後，在電泳玻片組合的上方槽內，加入 SDS 電泳緩衝液。

- ◆ 膠片一定要等回復室溫後才能架到電泳槽，否則玻片會因熱漲而撐破。
- 2) 電泳前先以微量針管清洗各樣本槽，避免有凝膠不完全的殘餘物留在槽內。
- 3) 樣本處理：取 trypsin 樣本 20  $\mu\text{L}$ ，因其中含甲酸溶液，先加入 2  $\mu\text{L}$  1 N NaOH 中和之，再加入 20  $\mu\text{L}$  SDS 樣本溶液，及 20  $\mu\text{L}$  追蹤染料 BPB 均勻混合，在沸水浴煮沸 10 min 後放冷。CHOM 取 20  $\mu\text{L}$  如法處理，但不須中和。請在鑄膠的空檔時，處理好樣本。
- 4) 取適量的樣本 (約 10~15  $\mu\text{L}$ )，依圖 S2-4 配置，以微量針管小心注入樣本槽，避免氣泡陷入。另外，也注入標準蛋白質 (M) 5  $\mu\text{L}$ ，作為分子量之參考。
- 5) 蓋上電泳槽的蓋子，確認正負電極裝置正確 (由負極往正極跑)，連接上電源供應器，定電壓以 100~150 V 進行電泳。
- 6) 在電泳過程中，特別觀察標準蛋白質中各個色帶的泳動情形。
- 6) 待追蹤染料跑出膠片後，關掉電源，取出膠片，並將膠體平均切成兩半，各以解剖刀截去右上角做記號
- 7) 一半進行蛋白質染色，另一半馬上浸入轉印緩衝液平衡 20~30 min，繼續進行轉印，參考下節 2.3 步驟。

#### 2.2.4 染色及脫色

- 1) 將電泳膠片浸入 CBR 染色液中，染色液用量只要覆蓋過膠片即可，一定要蓋上蓋子，置於平台震盪器上搖盪 30 min。
- 2) 倒出染色液，用自來水沖洗後加入脫色液，脫色液也一樣蓋過膠片即可；約 10 min 可換新脫色液，一直重複到背景呈現透明為止。
- 3) 若蛋白質濃度較低，染色時間可加長 (1 h) 以增加色帶深度。
- 4) 脫色完成的膠片，可以用玻璃紙三明治乾燥之，經護貝後可永久保存。

### 2.3 蛋白質轉印

首先以迷你平板膠體電泳對樣本蛋白質進行分離，然後轉印到尼龍膜上去。

#### 2.3.1 儀器設備

- a) 平板迷你電泳槽 (Hoefer, Mighty Small SE-250) 及所有附件。
- b) 電泳轉印槽 (Hoefer, TE-22) 及海綿、卡夾各兩片。
- c) 電源供應器 (可達 500 mA)。
- d) 震盪器及塑膠染色方皿。

### 2.3.2 藥品試劑

- a) SDS-PAGE 膠體，由電泳實驗所得之一半 SDS-PAGE 膠片。
- b) 轉印膜 (Millipore Immobilon, PVDF)、甲醇少許。
- c) 濾紙 (Whatman 3 mm) 兩張。
- d) 轉印緩衝液 (blotting buffer, 10×)：

Tris	30.3 g
Glycine	144 g

加水至 800 mL，pH 調至 8.3 後，加水至 1,000 mL。SDS-PAGE 轉印時，轉印緩衝液中須加有 10% (v/v) 甲醇。

- e) PBST (PBS 加 0.05% Tween)

- f) Urea-PBST：

Urea (6 M)	36 g
------------	------

加入 PBST 加熱溶解後，以 PBST 添加至 100 mL。

### 2.3.3 實驗步驟：

#### 蛋白質轉印

- 1) SDS-PAGE 電泳膠片接續 2.2 節電泳，其中一半進行 CBR 染色，另一半則保留在本實驗作為轉印之用，電泳後切半馬上浸入轉印緩衝液平衡 15 min。
- 2) 轉印膜 PVDF 要裁得比膠片稍大，因膠片平衡後體積會略膨漲。PVDF 為疏水性，必須先以 100% 甲醇短暫溼潤後，再浸入轉印緩衝液 (1×) 中備用。
- 3) 取兩張稍大的濾紙，於轉印緩衝液中浸潤備用。取出轉印卡夾，先墊一張多孔性海綿，鋪上一張濾紙，再小心鋪上膠片，勿陷入任何氣泡，鋪上轉印膜，再蓋上一層濾紙及海綿，再把整個三明治卡夾裝好。可參考圖 S2-1 的組合。
- 4) 置入已裝有轉印緩衝液 (1×) 的轉印槽中，注意 PVDF 那面朝正極，膠片面朝負極。儘量除去附在卡夾外面的氣泡，氣泡的存在將使轉印效率變差。
- 5) 於 4°C 中以 400 mA 進行轉印，轉印槽內要加以攪拌，以免溫度過高或不均，轉印 60 min 後中止。
- 6) 取出轉印膜，浸在尿素 (urea-PBST) 中過夜，次日換成 PBST，等到次週繼續免疫染色；尿素可洗去蛋白質分子上的 SDS，同時可將一部份蛋白質分子恢復成原態，以增加抗體的確認機率。
- 7) 在電泳樣本中若含有 pre-stained 標準蛋白質，則可作為轉印效率之參考。

## 2.4 免疫染色

轉印膜上的蛋白質繼續用抗體偵測，首先用一次抗體去結合抗原色帶，再加入二次抗體與酵素的結合體，最後抗原色帶將會被標上酵素，以酵素反應呈色之。

### 2.4.1 儀器設備

- a) 平台震盪器。

### 2.4.2 藥品試劑

- a) 明膠-NET：

Gelatin	0.25%	2.5 g
NaCl	0.15 M	8.75 g
EDTA·2Na	5 mM	1.8 g
Tween 20	0.05%	0.5 mL
Tris	50 mM	6.05 g

加水 800 mL 並加熱至明膠溶解，調 pH 至 8.0，再加水至 1,000 mL。

- b) 一次抗體：(小白鼠抗豬的 trypsin 抗體)

通常要免疫大白兔或小白鼠以製備一次抗體，一般抗體的使用濃度在 1:1,000 至 1:5,000 之間，視抗體效價而定，使用前以上述明膠-NET 稀釋之。

- c) 二次抗體-HRP 連結體：

通常都可以購得上述一次抗體的二次抗體，並且連結有標誌酵素 (horse radish peroxidase, HRP) 或標誌物 (如螢光物或 biotin)；其使用濃度請依照廠商建議，也稀釋在明膠-NET 中。

- d) HRP 呈色劑 DAB：

Diaminobenzidine (DAB)	5 mg
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%	10 μL

用 100 mL PBS 溶解，必須新鮮製備，不可放過夜；DAB 是致癌物質。

- e) HRP 螢光呈色劑：SuperSignal West Pico Substrate (Pierce)

Luminol solution (含 enhancer)	0.5 mL
Peroxide solution	0.5 mL

上面兩種溶液以 1:1 混合後立刻使用，一整張轉印紙約需 1 mL。

### 2.4.3 實驗步驟：

- 1) 尿素洗過的轉印紙再以 15 mL PBST 洗兩次，每次 5 min。
- 2) 加入 15 mL 一次抗體 (適當濃度溶於明膠-NET 中)，室溫下反應 1 h。

◆ 一般抗體的使用濃度是在 1:1,000 至 1:5,000 之間，視抗體效價而定。

- 3) 以 15 mL PBST 洗 3 次，每次約 10 min。
- 4) 加入 15 mL 二次抗體-HRP 連結體，室溫下反應 1 h。
- 5) 以 15 mL PBST 洗 3 次，每次約 10 min。
- 6) 倒入 HRP 呈色劑 DAB 15 mL，褐色色帶應很快出現。
- 7) 呈色約在 1~5 min 內完成，應當在背景開始加深前中止呈色。
- 8) 倒去呈色液，並以蒸餾水清洗數次，取出晾乾後避光保存。

◆ 若使用螢光染色劑，則上面 6) 改加入 1 mL SuperSignal 呈色劑，並在螢光掃描儀中顯像至清晰色帶出現，弱一點的色帶，可能要呈色 10 min 以上。

## 2.5 結果與報告

- a) 請以掃描或拍照記錄免疫染色結果，注意有幾條色帶呈現。
- b) 免疫染色圖譜請與 CBR 染色結果詳細比對。
- c) 由結果可推論所用抗體的專一性如何。

## 2.6 參考文獻

莊榮輝 主編 (2000) 酵素化學實驗。台灣大學農化系。頁 155, 205, 217

Nelson DL, Cox MM (2005) Lehninger Principles of Biochemistry (4th ed) p.180-182

Roitt I, Brostoff J, Male D (2001) Immunology (6th ed) Chap. 4, 27