

一种适用于酸性转化酶蛋白定量的酶联免疫吸附法

潘秋红* 刘艳艳 刘洪涛

中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083

A Method for Quantitative Determination of Acid Invertase Amount by Enzyme-linked Immunosorbent Assay

PAN Qiu-Hong*, LIU Yan-Yan, LIU Hong-Tao

College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

提要 利用纯化的苹果果实可溶性酸性转化酶蛋白及其多克隆抗体, 建立了一套适合于果实酸性转化酶蛋白定量测定的酶联免疫吸附方法(ELISA)。以ABA对苹果、葡萄果实酸性转化酶蛋白量的调节为例, 从方法学的角度对Western blotting和ELISA进行了比较, 显示出ELISA具有定量分析的优势以及操作简便、灵敏度高的特点。

关键词 酸性转化酶; 定量; 酶联免疫吸附分析(ELISA)

酸性转化酶能不可逆地降解蔗糖形成葡萄糖和果糖, 在库细胞蔗糖的代谢转化和库强调节中起作用, 它与植物对受伤反应和对病原防卫以及低温适应性有关, 有关酸性转化酶调控的研究已得到广泛关注^[1~3]。在酶活性调控的研究中, 常用蛋白质免疫印迹(Western blotting)技术检测酶蛋白合成量的变化, 以此来判断酶是否在蛋白水平上受到调节。但蛋白免疫印迹技术有一些缺点, 它只能依据酶蛋白的免疫检测信号强弱分析酶蛋白的含量变化, 是一种定性或半定量的方法。本文用高特异性的酸性转化酶抗体, 建立了一套定量测定酶蛋白含量的竞争性间接酶联免疫吸附方法(ELISA), 并与Western blotting进行比较, 以期能为酶活性调控机制的研究提供一种方法。

材料与方 法

1 材料

以八年生的新红星苹果树(*Malus domestica* Borkh. cv. Starkrimson)和四至五年生巨峰葡萄株(*Vitis vinifera* L. × *V. lubrusca* L. cv. Kyoho)为试材。

2 ABA 温育果实圆片的实验

参照文献4和5的方法并稍加改动。基础温育液的组成为: 50 mmol·L⁻¹ 2-吗啉代乙磺酸(pH 5.5)、1 mmol·L⁻¹ EDTA、5 mmol·L⁻¹ 抗坏血酸、5 mmol·L⁻¹ CaCl₂、1 mmol·L⁻¹ MgCl₂、200 mmol·L⁻¹ 甘露醇。用取样器分别将盛花后100 d的苹果果

实分割成直径1.0 cm、厚0.1 cm的圆片, 盛花后60 d的葡萄果实分割成0.1 cm厚的圆片, 在基础温育液中平衡30 min后, 用外源ABA处理: 分别取20 g的果实圆片, 放入盛有60 mL温育介质的三角瓶中, 温育介质为基础温育液加0、5、20 μmol·L⁻¹ (±) ABA (ABA用少量乙醇溶解); 以基础温育液中加入乙醇(终浓度不超过0.1%)为对照。于25℃下振荡温育4 h, 取出圆片, 用双蒸馏水冲洗3遍, 吸干, 用液氮速冻, 每种处理设2个独立重复。

3 抗原和抗体的制备及其质量检测

参照前文^[6]方法进行。即依次通过硫酸铵沉淀、阴离子交换层析、凝胶层析和亲和层析等步骤从苹果果实中纯化出可溶性酸性转化酶, 经SDS-PAGE检测达到电泳纯; 用该纯化酶免疫兔子, 获得兔抗血清, 经硫酸铵沉淀、阴离子交换层析和偶联过氧化物酶的亲和层析, 获得对酸性转化酶有特异性的多克隆抗体; 经免疫沉淀检测, 该抗体对酸性转化酶活性的抑制率达87.9%。表明所获得的抗体对酸性转化酶有较强的特异性。

4 酸性转化酶提取与活性测定

参照文献6和7的方法。

收稿 2005-04-07 修定 2005-10-18

资助 中国博士后科学基金(200435378)。

*E-mail: panquih@263.net, Tel: 010-62737553

5 酸性转化酶的Western blotting

参照文献6的方法。

6 酸性转化酶蛋白含量的ELISA

包被: 将电泳纯的苹果果实中可溶性酸性转化酶(soluble acid invertase, SAI)蛋白溶于包被液(15 mmol·L⁻¹碳酸钠缓冲液, pH 9.6)中至终浓度为10 μg·mL⁻¹, 在酶标板的反应孔内准确加入SAI包被液各100 μL, 再放于湿盒中, 于37℃下保温2 h后; 静置于4℃冰箱中48 h。

免疫反应: (1)在若干0.5 mL硅化的离心管中分别加入200 μL经过一系列稀释的纯化的苹果果实SAI蛋白(每管中每100 μL反应液中分别含有2 000、500、125、31.25、7.81、0 ng的标准SAI蛋白)和待测样品液, 然后向各管中加入200 μL稀释酸性转化酶多克隆抗体(1:3 000), 该抗体用封闭液[10 mmol·L⁻¹ Na₂HPO₄-KH₂PO₄ (pH 7.5)、150 mmol·L⁻¹ NaCl、3 mmol·L⁻¹ KCl、0.05% Tween-20、1% BSA]稀释; 抗原与抗体充分混匀后, 置于37℃培养箱中温育1 h后, 再放在4℃冰箱中24 h。(2)取出酶标板, 弃去包被液, 用洗涤缓冲液[10 mmol·L⁻¹ Na₂HPO₄-KH₂PO₄ (pH 7.5)、150 mmol·L⁻¹ NaCl、3 mmol·L⁻¹ KCl、0.05% Tween-20]洗涤3遍。向各孔中加入100 μL封闭液, 酶标板置于湿盒中, 于37℃下温育2 h。(3)用洗涤缓冲液洗涤各孔3遍。在酶标板的各孔内加入上述经免疫反应的标准SAI蛋白液或待测样品液100 μL(平行3个重复), 以加入100 μL免疫前兔血清的孔为阴性对照(平行3个重复), 然后将酶标板置于湿盒中, 于37℃下温育2 h。(4)取出酶标反应板, 用洗涤缓冲液洗涤3~4遍之后, 在加洗涤液的孔内仍加入100 μL洗涤液, 其余各孔加入100 μL稀释的辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG(1:500), 于37℃下温育1 h。(5)取出酶标板, 洗涤各孔5遍, 接着向各孔内加入100 μL底物反应液[0.1 mmol·L⁻¹ Na₂HPO₄-柠檬酸(pH 5.0), 含0.4 mg·mL⁻¹邻苯二胺和1.5 μL·mL⁻¹ 30% H₂O₂], 室温下反应20 min, 加入50 μL 2 mol·L⁻¹ H₂SO₄终止反应。在酶标测定仪上测定其在波长490 nm处的OD值, 以加入洗涤液的孔为空白调零孔。用每孔标准SAI蛋白含量(ng)的对数为横坐标, 以测得的对应OD值为纵坐标, 绘制标准曲线。

结果与讨论

1 酸性转化酶ELISA的基本原理和测定结果计算

酸性转化酶蛋白定量的ELISA依据竞争性固相抗原法的原理, 即固相抗原(antigen-solid, AgS, 即包被于酶标板反应孔中的酸性转化酶蛋白)和液相抗原(antigen-liquid, AgL, 即加在硅化离心管中的酸性转化酶蛋白)对特异性抗体(antibody, Ab, 即兔抗酸性转化酶抗体)的竞争性结合, AgL先与Ab结合形成AgL-Ab复合物, 剩余的Ab再与预先吸附于酶标板上的一定量的AgS结合, 形成AgS-Ab复合物。由于Ab为有限量, 而AgL与AgS量之和超过Ab上的有效结合位点, 因此, 在这个系统中, AgL越多, 形成的AgL-Ab复合物就越多, 形成的AgS-Ab复合物量就越少, 当加入酶标二抗(Ab₂E, 即辣根过氧化物酶标记的羊抗兔血清)时, 形成的AgS-Ab-Ab₂E三元复合物就少[二抗(Ab₂)与AgS-Ab复合物中Ab的Fc(fragment crystallizable)段相结合], 二抗中酶的显色反应就越浅, OD值也越小, 反之亦然。同系列浓度的AgL就得到系列的OD值, 据此绘制标准曲线, 从样品的OD值即查出待测AgL的量。在一定的范围内, OD值对AgL的对数呈一定的线性关系。

2 抗酸性转化酶的抗体最佳稀释倍数的确定

在进行ELISA测定之前, 首先确定抗体的最佳稀释度, 这是影响ELISA灵敏度的重要因素。不同稀释倍数(1 000~3 000倍)的一抗工作液的ELISA标准曲线表明: 稀释1 000和2 000倍的抗体在测定范围的低含量区(7.8~500 ng)不敏感, 说明这两个稀释度的SAI抗体工作液不适合于范围为7.8~2 000 ng的酸性转化酶测定; 而当用稀释3 000倍的苹果果实SAI抗体工作液进行测定时, 电泳纯的苹果果实SAI蛋白含量(7.8~2000 ng)的对数与其在酶联免疫反应中对应的OD值呈极显著的线性相关($Y=-0.082X+0.4479$, $R^2=0.9935$), 表明该稀释度的一抗工作液适合于这一范围的酸性转化酶蛋白的测定。

3 ABA对苹果和葡萄果实中酸性转化酶蛋白含量的调节

3.1 ABA对苹果果实中SAI和细胞壁酸性转化酶(cell wall acid invertase, CWI)的调节 从图1可

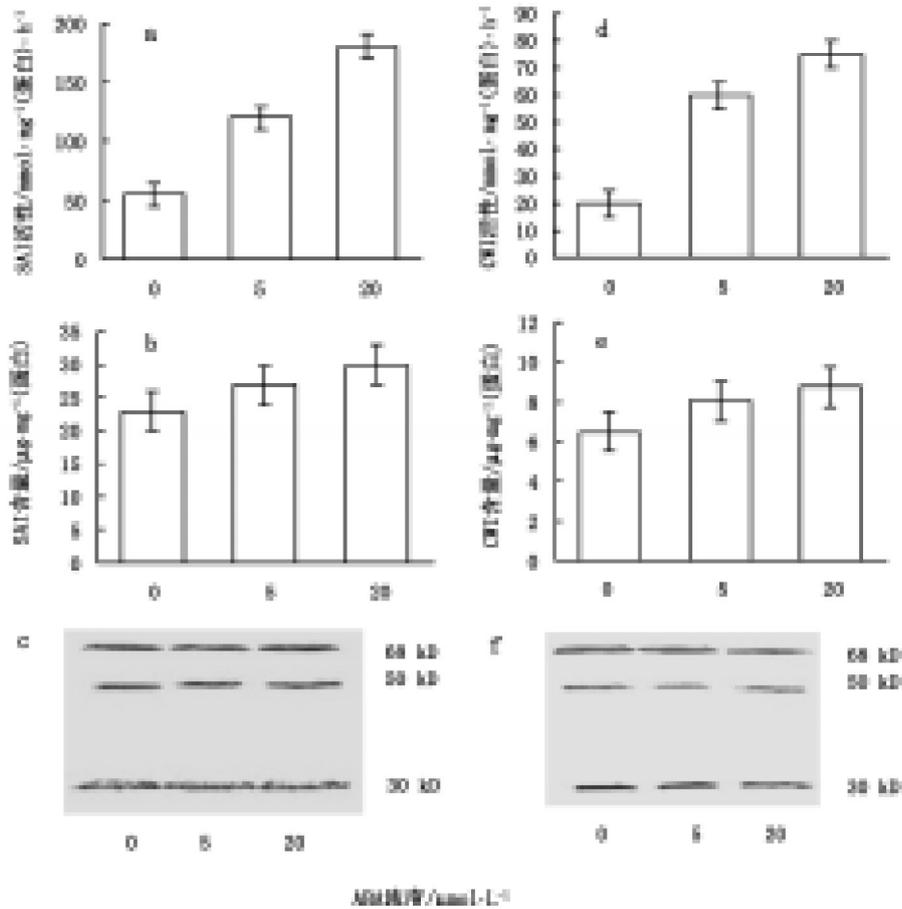


图1 ABA温育苹果果实圆片中SAI和CWI活性和含量的变化

a和d分别为SAI和CWI活性; b和e分别为SAI和CWI蛋白含量; c和f分别为SAI和CWI的Western blotting。

可以看出,用ABA溶液温育果实圆片后,苹果果实SAI和CWI活性明显增加,且随着处理浓度的增大,增加更明显。用ELISA测定其蛋白含量,结果显示,无论是SAI或是CWI,与相同处理的对照相比,ABA处理的酶蛋白含量均增加,但差异并不显著。Western blotting分析表明,用抗SAI抗体,在苹果果实可溶性组分和细胞壁组分的SDS-PAGE条带上均特异性地识别出3条多肽,其表观分子量分别为68、50和30 kD,说明苹果果实中可能存在3种酸性转化酶的同工酶。ABA处理与对照之间,这3条多肽的免疫检测信号强度均没有明显可见的差别。ABA对苹果果实SAI和CWI的激活作用可能是受翻译后的调节。

3.2 ABA对葡萄果实中SAI和CWI的调节 ABA对葡萄果实中SAI和CWI活性也有明显的激活作用(图2)。Western blotting分析显示,用苹果果

实SAI的抗体,可在葡萄果实蛋白质的SDS-PAGE条带上特异性识别出一条分子量为60 kD的多肽,它与Ruffner等^[8]用抗葡萄SAI抗体检测到的葡萄果实中SAI的分子量完全相同。SAI和CWI免疫检测信号强度与相应的酶活性呈现几乎一致的变化规律。用ELISA测定这两种酸性转化酶蛋白含量的结果同样显示,在不同浓度ABA预温育的圆片中,其SAI和CWI蛋白量均呈现明显可见的增加。与未经ABA预温育的对照相比,20和100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA温育的圆片中,SAI蛋白含量增加了50%和110%,CWI蛋白则增加2倍多。这些结果表明ABA对酸性转化酶的激活作用是通过增加其基因表达量实现的。

从上可以看出,Western blotting与ELISA的分析结果基本相符。Western blotting方法虽然可显示细胞中所存在的酸性转化酶同工酶和各个同工

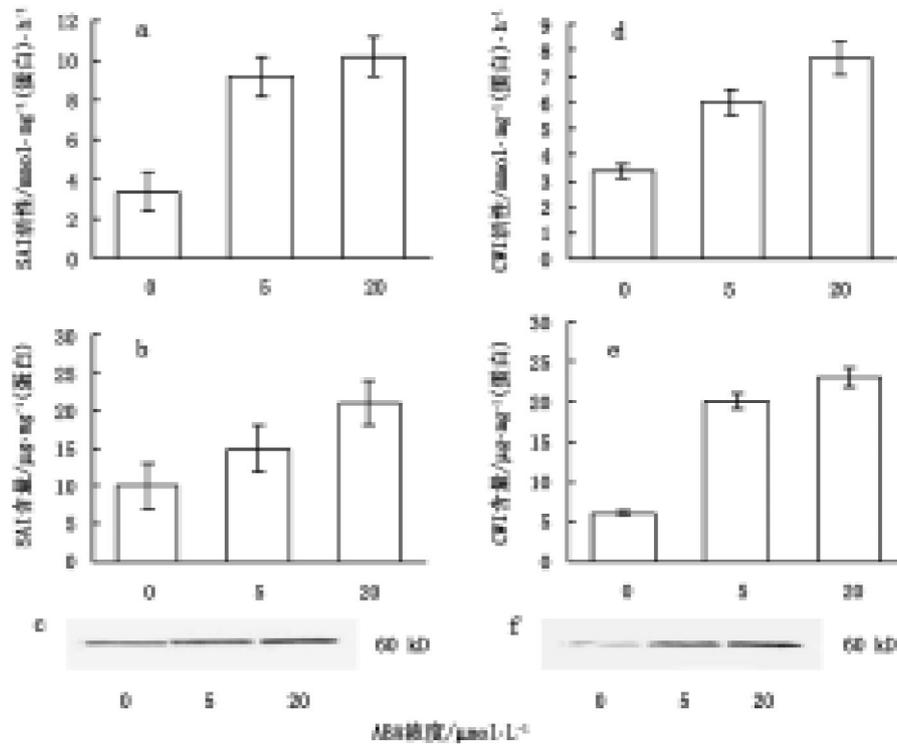


图2 ABA 预温育对葡萄果实圆片中 SAI 和 CWI 活性和含量的影响

a 和 d 分别为 SAI 和 CWI 活性; b 和 e 分别为 SAI 和 CWI 的数量; c 和 f 分别为 SAI 和 CWI 的 Western blotting。

酶的定性变化情况,但应用此法时通常必须先将粗提液浓缩以提高其中蛋白质浓度,尤其是果实,其蛋白含量很低[20~40 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)],浓缩操作较为繁琐,工作量大,而且容易造成蛋白的损失。ELISA 法可采用粗提液直接测定,操作简便,所需样品少,对蛋白含量较少的材料(如果实等)更加适用,更重要的是,它还能定量地反映酶蛋白含量的变化情况。在酸性转化酶调控的研究中,这两种方法结合使用可取长补短。

这里还应指出的是,SAI 和 CWI 是由同一基因家族的不同基因编码的蛋白^[9~11],它们之间有很高的抗原相似性,所以抗体和基因探针一般可以互换^[9~11]。不同植物酸性转化酶之间同源性也很高,它们的抗体之间也可以互换^[12,13],因此,抗苹果果实中 SAI 的抗体对苹果果实中 CWI、葡萄果实中 SAI 和 CWI 都具有相似的免疫学特异性。用免疫前兔血清代替一抗进行温育而其它步骤不变的 Western blotting 中,没有显示免疫蛋白带(结果未列出)。这说明本实验中苹果果实中 SAI

抗体对苹果果实中 CWI、葡萄果实 SAI 和 CWI 蛋白的识别是特异的。此外,本文中用的是多克隆抗体,尚不能对苹果果实中酸性转化酶的 3 个同工酶分别定量,它只能反映可溶性组分或细胞壁组分中酸性转化酶的总含量。

总之,在现有的条件下,ELISA 不失为一种简单的可用于定量测定酶蛋白含量的方法,尤其是对于蛋白质含量很少的材料(如果实)。为保证 ELISA 的正确使用,根据我们的经验,操作中应注意以下几点:(1)抗体的特异性要好;(2)测定前应先确定抗体的最佳稀释浓度,这是影响 ELISA 灵敏度的重要因素;(3)每次测定时标准曲线必须重新制作;(4)液相抗原与抗体反应需在经硅化处理过的离心管(这种离心管与抗体之间的附着力很小,抗体不易吸附于管壁上)中进行,所用的反应试剂(标准 SAI,一抗、二抗及反应液)需要充分混匀(在混匀器上振荡 1 min 以上);(5)ELISA 虽在同一酶标板上有很好的重复性,但由于反应条件的不一致,板与板之间重现性不佳,故测定前

需在酶标检测仪上读取每孔消光值,再逐一用每孔消光值与平均值比较在10%以内为合格,同一批样品尽可能采用消光值一致的酶标板并同时进行测试;(6)在操作中多次涉及到洗涤,洗涤是否彻底往往关系到实验的成败,只有彻底洗涤,才能除去前各步加入的未被结合的抗原、抗体或结合物,防止它与随后加入的抗体、结合物或底物发生某些干扰反应,洗涤要严格,每次洗涤时间控制在1 min之内,所有小孔采用同样方法严格清洗,以减少干扰。

参考文献

- 1 Smeeckens S, Rook F. Sugar sensing and sugar-mediated signal transduction in plants. *Plant Physiol*, 1997, 115: 7~13
- 2 Tymowska LZ, Kreis M. The plant invertase: physiology, biochemistry and molecular biology. *Adv Bot Res*, 1998, 28: 71~117
- 3 Lalonde S, Boles E, Hellmann H et al. The dual function of sugar carriers: transport and sugar sensing. *Plant Cell*, 1999, 11: 707~726
- 4 Beruter J, Studer FME. Comparison of sorbitol transport in excised tissue discs and cortex tissue of intact apple fruit. *J Plant Physiol*, 1995, 146: 95~102
- 5 王永章, 张大鹏. 果糖和葡萄糖诱导了苹果果实酸性转化酶翻译后的抑制性调节. *中国科学(C辑)*, 2002, 45: 309~321
- 6 Pan QH, Zou KQ, Peng CC et al. Biochemical and immunological characterization of acid invertases from apple fruit. *J Integrative Plant Biol*, 2005, 47: 50~59
- 7 Miron D, Schaffer AA. Sucrose phosphate synthase, sucrose synthase and invertase activities in developing fruit of *Lycopersion esculentum* Mill. and sucrose accumulation in *Lycopersion hirsutum* Humb and Bonpl. *Plant Physiol*, 1991, 95: 623~627
- 8 Ruffner HR, Hurlimann M, Skrivan R. Soluble invertase from grape berries: purification, deglycosylation and antibody specificity. *Plant Physiol Biochem*, 1995, 33: 25~31
- 9 Sturm A, Chrispeels MJ. cDNA cloning of carrot extracellular β -fructosidase and its expression in response to wounding and bacterial infection. *Plant Cell*, 1990, 2: 1107~1119
- 10 Elliot KJ, Butler WO, Dickinson CD et al. Isolation and characterization of fruit vacuolar invertase genes from two tomato species and temporal differences in mRNA levels during fruit ripening. *Plant Mol Biol*, 1993, 21: 515~524
- 11 Quick WP, Schaffer AA. Sucrose metabolism in sources and sinks. In: Zamski E, Schaffer AA (eds). *Photoassimilate Distribution in Plants and Crops: Source-sink Relationships*. New York: Marcel Dekker, Inc, 1996. 115~116
- 12 Ranwala AP, Baird V, Miller WB. Organ-specific localization and molecular properties of three soluble invertases from *Lilium longiflorum* flower buds. *Physiol Plant*, 1998, 103: 551~559
- 13 Weil M, Rausch T. Acid invertase in *Nicotiana tabacum* crown-gall cells: Molecular properties of the cell-wall isoform. *Planta*, 1994, 193: 430~437