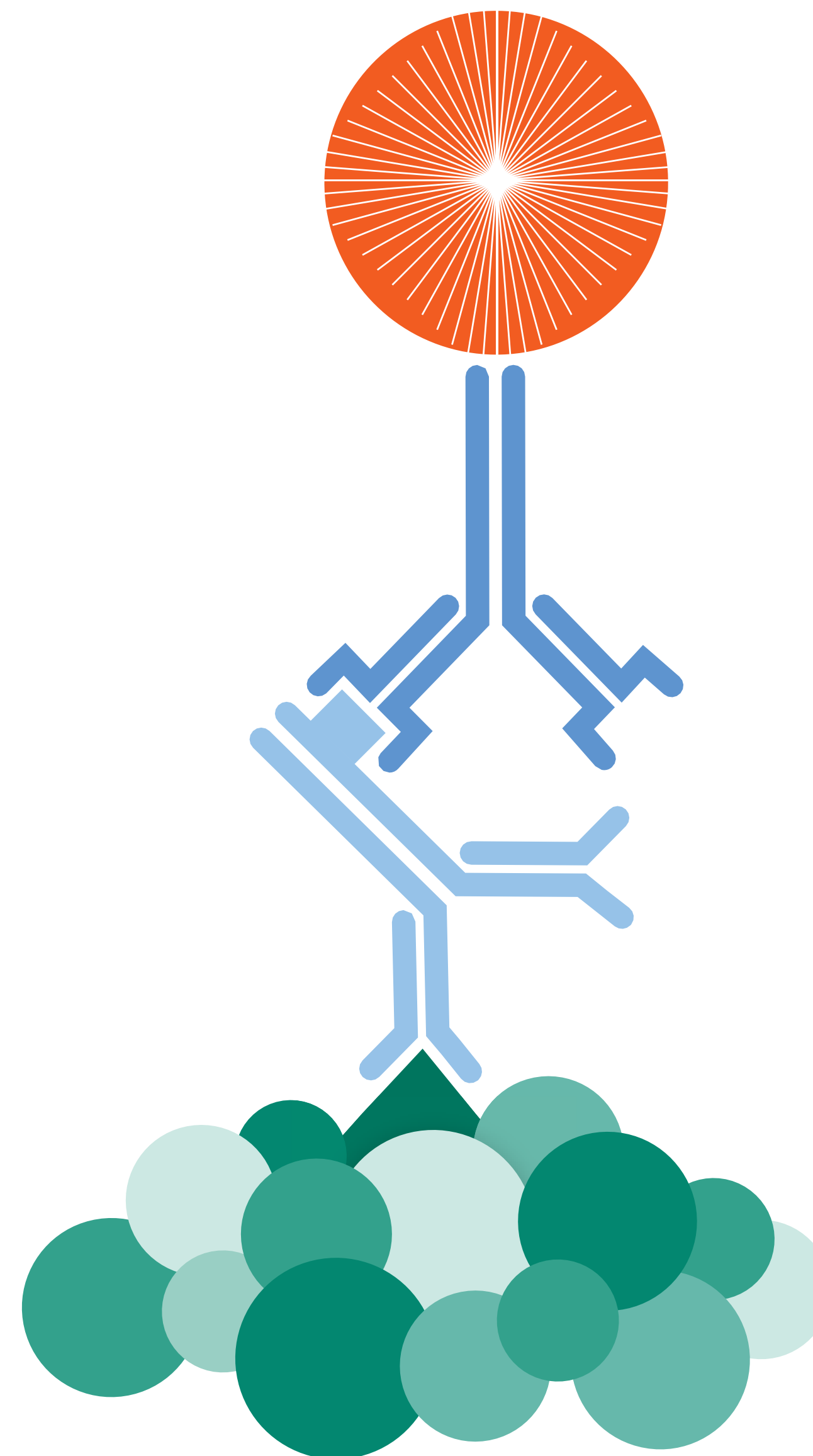


蛋白质印迹法

原则和方法



目录

01	蛋白质印迹术语表和相关定义	4	3.1.4 天然凝胶：PAGE	22	05	抗体探测	38			
	介绍	7	3.1.5 二维 (2D) 凝胶电泳	22		5.1 封闭	39			
	蛋白质印迹工作流程	8	3.2 分子量标记物	24		5.1.1 电转印	39			
	检测	8	3.2.1 彩虹分子量标记物	24		5.1.2 用去垢剂做封闭剂	40			
	Cytiva 和蛋白质印迹	8	3.2.2 Amersham™ ECL DualVue™ 蛋白质印迹标记物	24		5.1.3 适用于封闭剂的缓冲液	40			
02	样品制备	10	3.2.3 Amersham™ ECL Plex™ 荧光彩虹标记物	25	5.1.4 时间与温度	40				
	2.1 简介	11	3.2.4 未标记的蛋白质分子量标记物	25	5.2 一抗和二抗探测	40				
	2.2 蛋白质提取方法	12	3.3 通过分子量标记物确定未知蛋白质的分子量	25	5.2.1 一抗	41				
	2.2.1 基于去垢剂的裂解	12	3.4 总蛋白染色	26	5.2.2 二抗	42				
	2.2.2 冷冻/解冻裂解	12	3.5 参考文献	27	5.3 剥离和再生检测膜	44				
	2.2.3 渗透性休克	12	04	转印	28	5.3.1 通过加热和去垢剂进行剥离	44			
	2.2.4 超声处理	12				5.3.2 优化膜剥离的策略	44			
	2.2.5 机械方法	12				5.3.3 通过低 pH 值进行剥离	45			
	2.2.6 酶消化	12				5.3.4 通过高 pH 值进行剥离	45			
	2.2.7 爆炸性减压	13				5.3.5 通过高浓度盐溶液行剥离	45			
	2.2.8 预制裂解缓冲液	13				5.3.6 提示和技巧	45			
	2.2.9 样品制备试剂盒	13				5.4 参考文献	45			
	2.2.10 保护样品	13				06	检测	46		
	2.3 样品净化	14							6.1 化学发光	47
	2.3.1 样品净化产品	15							6.1.1 Amersham™ ECL™ start	49
2.3.2 去除血清或血浆样本中的高丰度蛋白质	16	6.1.2 Amersham™ ECL™							49	
2.3.3 脱盐和浓缩样品	16	6.1.3 Amersham™ ECL™ Prime							50	
2.4 总蛋白质浓度的测定	16	6.1.4 Amersham™ ECL Select™							51	
2.4.1 用于测定总蛋白质浓度的产品	17	6.1.5 化学发光提示和技巧							53	
2.5 参考文献	17	6.2 荧光							53	
03	凝胶电泳	18	6.2.1 多重检测	54						
	3.1 电泳	19	6.2.2 利用荧光多重复用实现归一化	55						
	3.1.1 聚丙烯酰胺凝胶	19	6.2.3 荧光提示和技巧	57						
	3.1.2 缓冲液系统和 pH 值	21								
	3.1.3 变性凝胶：SDS-PAGE	21								

目录

07	成像	59			
	7.1 数字成像	60			
	7.1.1 电荷耦合设备 (CCD) 成像仪	60			
	7.1.2 扫描仪系统	61			
	7.1.3 荧光基团和滤光片	62			
	7.2 使用胶片进行化学发光检测	63			
	7.3 放射自显影	63			
	7.3.1 X 射线胶片自显影	63			
	7.3.2 存储荧光屏自显影	63			
	7.4 检测系统和成像仪兼容性	64			
08	分析	65			
	8.1 定量蛋白质印迹	66			
	8.1.1 灵敏度	66			
	8.1.2 线性动态范围	66			
	8.1.3 信号稳定度	67			
	8.1.4 归一化	67			
	8.1.5 信噪比	69			
	8.1.6 SNOW 成像模式可降低噪音水平并获得卓越的图像质量	70			
	8.2 分析软件	71			
	8.2.1 ImageQuant™ TL 软件的主要特点	71			
09	应用示例	73			
	9.1 化学发光蛋白质印迹	74			
	9.1.1 重组蛋白的纯化	74			
	9.1.2 低丰度蛋白质的检测：监测信号通路的激活	74			
	9.1.3 通过免疫共沉淀和蛋白质印迹检测蛋白质相互作用	75			
	9.2 荧光蛋白质印迹	76			
	9.2.1 对总蛋白进行归一化的多重检测	76			
	9.2.2 对管家蛋白进行归一化的多重检测	77			
	9.2.3 分子量相似蛋白质的多重检测	77			
	9.2.4 三重检测：同时检测三种蛋白质	78			
	9.2.5 三层蛋白质印迹放大信号	79			
	9.2.6 二维(2D)蛋白质印迹检测磷酸化异构体	80			
	9.3 参考文献	81			
	10 故障排除	82			
	10.1 通用处理流程	83			
	10.2 与运行缓冲液和膜处理有关的问题	92			
	10.3 提高蛋白质印迹效率的其他技巧	92			
	11 方案与配方	93			
	11.1 蛋白质印迹法标准流程	94			
	11.2 样品制备	95			
	11.2.1 用哺乳动物蛋白质提取缓冲液提取蛋白质	95			
	11.2.2 样品净化	95			
	11.2.3 使用 2D Quant 试剂盒测量浓度	98			
	11.2.4 2×上样缓冲液	99			
	11.2.5 使用 Amersham™ Quickstain™ 进行预标记	100			
	11.3 电泳	100			
	11.3.1 制备含有 SDS 的聚丙烯酰胺凝胶	100			
	11.3.2 用于 SDS-PAGE 的电泳运行缓冲液	102			
	11.4 蛋白质印迹电转印	102			
	11.4.1 全湿转印	102			
	11.4.2 半干转印	103			
	11.5 蛋白质印迹缓冲液	105			
	11.6 封闭	105			
	11.7 抗体探测与检测	106			
	11.7.1 使用 Amersham™ ECL™、和 Amersham™ ECL Select™ 进行化学发光检测	106			
	11.7.2 用 Amersham™ ECL Plex™ 进行荧光检测	107			
	11.7.3 快速启动方法	107			
	11.8 剥离和再生检测	109			
	11.8.1 通过高 pH 值和高温进行剥离	109			
	11.8.2 通过低 pH 值进行剥离	109			
	11.8.3 通过高 pH 值进行剥离	110			
	11.8.4 通过高浓度盐溶液行剥离	110			
	11.9 确定一抗和二抗最佳浓度的优化方案	110			
	11.9.1 通过斑点印迹法优化一抗浓度	111			
	11.10 参考文献	111			
	12 附录优化	112			
	A.1 膜的选择	113			
	A.2 封闭剂的选择	113			
	A.3 清洗缓冲液的选择	113			
	A.4 使用膜条优化抗体浓度	114			

蛋白质印迹术语表和相关定义

以下术语的定义基于其在蛋白质印迹应用中的常见用法。

丙烯酸胺 C ₃ H ₅ NO	聚合后形成聚丙烯酰胺凝胶基质的单体单元。
亲和纯化	一种基于高度特异性相互作用(如抗原-抗体相互作用)的层析纯化法，可将目标蛋白质固定在固相载体上。研究人员可以利用亲和纯化技术提高单克隆和多克隆一抗作为蛋白质印迹试剂的特异性。
碱性磷酸酶 (AP)	一种水解酶，可与二抗偶联，用作蛋白质印迹检测系统的一部分。
过硫酸铵 (APS)(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	丙烯酸胺聚合的引发剂。与 TEMED 一起用于催化丙烯酸胺聚合形成聚丙烯酰胺。
分析软件	此类工具主要用于自动分析、存储和归档通过 CCD 成像仪和/或扫描仪成像仪收集的图像。
阳极	电泳或印迹仪器中的正电极。
抗原	任何能诱导受试动物产生特异性抗体的结构。
放射自显影	在 X 射线胶片或磷屏上捕捉和分析放射性物质衰变发射产生的图像的过程。
背景	由于一抗和/或二抗与膜本身或样品中的杂质相互作用而产生的信号。
生物素	一种维生素，由于与链霉亲和素的亲和力极强，在许多分子生物学应用中被用作蛋白质标签。
双丙烯酸胺 C ₇ H ₁₀ N ₂ O ₂	一种交联剂，用于将丙烯酸胺聚合成聚丙烯酰胺，形成凝胶。
封闭	在印迹后用蛋白质等使膜饱和，以防止抗体与膜上未被目标蛋白质占据的区域发生非特异性结合的过程。
印迹	将蛋白质从凝胶转印到膜上的过程，通常在电场中进行。也称为免疫印迹法。
β-巯基乙醇 HOCH ₂ CH ₂ SH	一种用于还原蛋白质中二硫键的试剂，可产生未折叠蛋白质。

牛血清白蛋白 (BSA)	用途广泛的蛋白质，可用作封闭剂和总蛋白浓度测定的标准物质。
溴酚蓝 C ₁₉ H ₁₀ Br ₄ O ₅ S	上样缓冲液中的一种蓝色化合物。在 PAGE 中迁移到前端，是电泳距离的标记物。
丁醇	饱和状态下使用，在加入堆积凝胶前暂时覆盖在新浇铸的分离凝胶上，以防止气泡形成，同时有助于在两相之间形成完美平滑的界面。
阴极	电泳或印迹仪器中的负电极。
电荷耦合设备 (CCD)	将电荷转换为数字值的设备。CCD 成像仪与成像仪集成在一起，可生成高质量的图像数据。
化学发光	通过化学和/或酶诱导生成活性荧光基团，可在特定波长的光激发下发光。
化学发光	分子因化学反应而发光。
电泳梳	聚合前插入堆积凝胶中的塑料歧管，用于形成注入样品的孔。
偶联物	任何稳定附着在相关载体分子上作为标记物的化学物质。偶联物不得干扰其载体的功能。
CyDye™	来自 Cytiva 的荧光基团，在相应波长的光刺激下可发出红光 (Cy™5)、绿光 (Cy™3)、蓝光 (Cy™2)、短红外光 (CyDye™ 700) 和长红外光 (CyDye™ 800)。
变性凝胶	含有 SDS 的聚丙烯酰胺凝胶。
密度测定	胶片光密度的定量测量。光密度通常以刻度中的相对值表示。
检测限 (LOD)	使用特定检测试剂和系统可检测到的最小蛋白质量，与 LOQ 进行比较。
去垢剂	一种添加到蛋白质印迹应用的缓冲液和溶液中的表面活性剂，有助于提高蛋白质的可溶性。
非连续缓冲液系统	使用由成层凝胶和较大的分离凝胶组成的凝胶进行电泳。

二硫苏糖醇(DTT) C₄H₁₀O₂S₂	一种还原试剂。在电泳和蛋白质印迹中，它用于还原蛋白质中的二硫键，破坏三级结构。
斑点印迹	用于监测蛋白质与膜的相互作用及其随后与探针相互作用的快速方法。使用斑点印迹法检测条件时，无需进行凝胶电泳或凝胶-膜印迹。
动态范围	使用特定系统可测量的印迹蛋白质数量范围。动态范围的线性度越高，蛋白质在该范围内的定量就越精确。
发射	当分子中的电子从激发态降低到低能态时，荧光基团释放光的过程。
增强化学发光 (ECL)	HRP 催化 ECL 底物转化为敏化试剂，在过氧化氢的进步氧化作用下，试剂衰变时会发出可检测到的光。
电泳 (1-D)	在电场中将凝胶上的蛋白质混合物根据大小、形状和电荷进行分离的过程。
电泳 (2-D)	在两个维度上分离蛋白质，首先根据等电点 (pI),然后根据分子量。
表位	抗体识别的抗原的特定分子区域。
激发	荧光基团吸收光能，在此过程中，荧光基团分子中的电子被提升到更高的 匕 AT7
滤光片	的一个部件，允许特定波长的光通过，同时阻挡其他波长的光。
荧光	荧光体经较短波长的光源激发后发出的特定波长的光。
荧光基团	任何化合物，当转变为暂时的高能状态时，在返回基态时会发光。
甘油	上样缓冲液中的一种无色的粘稠液体，用以增加样品的密度。甘油可以帮助上样，并在电场作用于凝胶之前，将样品固定在样品孔中。
辣根过氧化物酶 (HRP)	催化 ECL 试剂转化为活性发光化合物的酶。
管家蛋白质	任何表达水平不会因外界刺激而发生明显变化的细胞内蛋白质。
成像	将检测系统产生的信号转换为可视化、分析和存储数据的格式的过程。
免疫沉淀	通过与固态基质 (如 Sepharose™ 磁珠) 结合的抗体进行孵育，以机械方式去除样品中的蛋白质或蛋白质复合物。
叠氮化钠	添加到抗体溶液和缓冲液中以延长其保存期限的防腐剂。叠氮化物可抑制 HRP 和 AP 活性。

等电聚焦 (IEF)	根据等电点 (pI) 在pH梯度上分离蛋白质。
等电点 (pI)	蛋白质净电荷为零时的 pH 值。
同种型	根据重链定义的抗体类别。与蛋白质印迹法最相关的抗体同种型是 igG。
Laemmli 缓冲液	基于 Tris-甘氨酸的常用电泳运行缓冲液。
裂解	在电泳前的样品制备过程中破坏细胞。裂解细胞可以通过纯机械方法实现，也可以通过使用含有去垢剂的缓冲液来进行。
膜容量	膜单位面积上可结合的最大蛋白质量。
甲醇	转印缓冲液中的一种重要成分，可最大限度地减少聚丙烯酰胺凝胶在转印时的膨胀和变形。此外，甲醇还能抵消 SDS 对蛋白质与膜接触的抑制作用。备注：转印缓冲液中也可以使用乙醇代替甲醇。
分子量标记物	已知分子量的蛋白质混合物。预染色的分子量标记物可用于蛋白质印迹，以验证转印是否成功。
单克隆抗体	只与一种表位结合的抗体，通常具有高度特异性、纯度高、性能稳定等特点—般背景较低。
多重检测	单次实验中，在一个印迹上检测几种不同的蛋白质。
天然凝胶	不含任何变性试剂 (如 SDS)或还原剂 的凝胶(如阳蔬基乙醇)
硝酸纤维素	一种膜的材料。
非特异性结合	用于检测的抗体与膜上的杂质或膜本身之间的相互作用。
归一化	为可靠地量化蛋白质水平，对各个泳道总蛋白质量的变化值进行调整的过程
优化	一个通用术语，用于涵盖为确定特定实验系统的最佳条件而应采取的初步步骤，例如封闭剂、抗体浓度以及孵育时间/温度。
磷酸酶抑制剂	防止磷酸化蛋白质被磷酸酶去磷酸化的制剂。如果实验目的是检测蛋白质的瞬时磷酸化，则应将其添加到裂解缓冲液中。
磷酸盐缓冲盐水 (PBS)	生物研究中常用的缓冲溶液，由生理浓度和pH值条件下的氯化钠和磷酸钠 组成。
光电倍增管 (PMT)	—种将光转换为电流并放大电流的光电装置。

多克隆抗体	对目标分子上不同表位具有亲和力的抗体混合物。
聚偏氟乙烯 (PVDF)	一种膜的材料。
翻译后修饰 (PTM)	翻译后对蛋白质进行化学修饰，从而调节和改变蛋白质的功能。常见的 PTM 包括磷酸化、糖基化和乙酰化基团。
一抗	对目标蛋白质具有特异性的一抗，用作印迹膜上的探针。一抗通常是未标记的。
蛋白酶抑制剂	一种抑制蛋白酶活性的混合试剂，从而防止蛋白质降解。
蛋白 A / 蛋白 G	从细菌细胞壁中提取的蛋白质，可与免疫球蛋白结合，特别是与 IgG 的 Fc 区域结合。
定量下限 (LOQ)	使用特定检测试剂和系统可检测到的最小蛋白质量 (与 LOD 进行比较)。
放射性同位素	一种元素的放射性同位素， 其中一些可用作蛋白质印迹法中二抗的标签。
分辨率	样品电泳后凝胶中蛋白质条带的分离质量。
分离凝胶 (又称分离凝胶)	凝胶的主体能将蛋白质按大小分离。
上样缓冲液	上样到成层凝胶孔前， 在蛋白质样品中加入的溶液。
二抗	针对一抗恒定区的标记抗体。通过标记抗体与一抗的多重结合提高检测灵敏度。
半干转印	将凝胶和膜夹在印迹纸之间， 并浸泡在转印缓冲液中， 从而将蛋白质从凝胶电转印到膜上。
SDS-PAGE	在有 SDS (见十二烷基硫酸钠) 存在的聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳。
信号持续时间	可检测到信号的时间间隔。
信号稳定性	信号强度随时间变化保持一致。
信噪比	衡量从噪声中分辨出真实信号的能力。“噪音”是检测系统产生的信号。
叠氮化钠	添加到抗体溶液和缓冲液中以延长其保存期限的防腐剂。叠氮化物可抑制 HRP 和 AP 活性。

十二烷基硫酸钠 (SDS) $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4\text{Na}$	一种用于 SDS-PAGE 的阴离子去垢剂，能够使蛋白质变性，使其带有负电荷。又称月桂醇硫酸钠。
堆积凝胶 (也被成为成层胶)	凝胶中含有样品孔的区域，蛋白质在进入分离凝胶前在此区域浓缩。
链霉亲和素	一种对生物素具有极高亲和力的细菌蛋白质。链霉亲和素/生物素系统广泛应用于分子生物学领域。
剥离	从印迹膜上物理去除检测系统分子组分的过程。剥离后，膜可与第二种一抗重新结合。
四甲基乙二胺 (TEMED) $(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$	聚合引发剂。与 APS 一起用于催化丙烯酰胺聚合形成聚丙烯酰胺凝胶。
Tris / Tris 缓冲盐溶液 (TBS)	生物研究中常用的缓冲溶液，缓冲范围为 pH 值 7 至 9，即大多数生物体的典型生理 pH 值。
全湿转印	通过将凝胶和膜完全浸泡在转印缓冲液中并施加电场，将蛋白质从凝胶转印到膜上的过程。这种方法效率很高，建议用于大分子蛋白质的转印。
两性离子 (也称两性)	在同一分子中同时具有酸性和碱性基团 (在特定 pH 值下带正电和负电的氨基酸) 的特性。所有蛋白质都是两性离子。

01 简介

蛋白质印迹法是一种检测和分析蛋白质的成熟方法。自 1979 年首次提出以来，它已成为生命科学研究中应用最广泛的方法之一。

该方法以抗体-蛋白质复合物为基础。科学家能够通过它检测与膜固定蛋白结合的抗体。

无论您是新手还是专家，这本手册都将为您提供指导和启发。本手册分享了最新的专业知识和前沿技术，内容涵盖从样品制备到分析的全流程，助您操作成功。您可以参考本手册作为指导，或用它来优化实验成果。

第 2 章至第 8 章逐步概述了蛋白质印迹法的工作流程。这些章节介绍了该技术的理论和实践，并附上了有用的提示和技巧。您可以在第 9 章中找到常见应用的示例，以及蛋白质印迹的一些新方法。第 10 章概述了故障排除策略；第 11 章提供了实验方案和配方，包括能够改进实验设计和运行的推荐标准程序。

在过去十年中，检测方法和软件的改进实现了蛋白质印迹法的定量分析。我们将举例说明可帮助您从蛋白质印迹中获得更多定量数据的方案。

如需获取更多方法手册，请访问 [cytiva.com/handbooks](https://www.cytiva.com/handbooks)。

蛋白质印迹工作流程

您可以根据所使用的蛋白质和所需的信息调整实验方案。不过，虽然不同应用的实验方案可能有所不同，但它们都遵循相同的基本步骤。



例如，您可能需要在电泳前对样品进行初步处理。样品可以是复杂的蛋白质混合物，如细胞或组织提取物。也可以是纯化的蛋白质，如纯化过程中的馏分。

- 使用凝胶电泳分离蛋白质。将它们从凝胶中电转印并固定到膜上。
- 封闭膜上未与蛋白质结合的区域。这有助于防止非特异性结合。
- 用特异性结合相关蛋白的一抗孵育膜。清洗以去除未结合的抗体。
- 使用与酶、荧光基团或同位素偶联的二抗进行检测。蛋白质-抗体-抗体复合物发出的信号与膜上的蛋白质量成正比。

检测

最常见的检测方法是化学发光法。化学发光法使用与辣根过氧化物酶偶联的二抗。加入过氧化物试剂后，酶会催化鲁米诺的氧化，这一反应会发光。您可以使用 X 射线胶片或电荷耦合设备 (CCD) 成像仪捕捉光信号。

另一种较新的检测方法是荧光检测。科学家用 CyDye™ 荧光染料等荧光基团标记二抗。然后，科学家就可以使用激光扫描仪或配备有适用光源和滤光片的 CCD 成像仪直接检测荧光信号。使用荧光法进行总蛋白归一化 (TPN) 更为可靠，因为它可以在同一印迹上复用目标信号和对照信号。此外，较新的成像系统，如 Amersham™ ImageQuant™ 800，可将目标蛋白质的化学检测与荧光染色多重结合，从而检测出总蛋白质。

Cytiva 和蛋白质印迹

自 1990 年推出第一款用于蛋白质印迹法的增强化学发光 (ECL™) 检测试剂 Amersham™ ECL™ 以来，Cytiva 提供的产品组合经过不断改进和优化，现已能满足从电泳和转印设备到高灵敏度检测系统和软件的所有相关要求。您可以从用于蛋白质印迹法的 Cytiva 产品组合中选择最佳的凝胶、膜、标记物、封闭剂、二抗、检测试剂、成像系统和软件，轻松获得最佳实验结果。

符号

-  该符号表示有关如何改进程序的一般性建议，或在特定情况下推荐采取的措施
-  该符号表示应特别注意的地方
-  突出显示化学品、缓冲液和设备。
-  实验方案概要

参考文献

1.Towbin, H. et al. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels tonitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 76, 4350–4354 (1979).

Cytiva为您的蛋白质印迹工作流程提供一站式支持



所需产品

- | | | | | | |
|---|--|--|---|--|---|
| <ul style="list-style-type: none">• 脱盐层析柱• 离心层析柱• 提取试剂盒和缓冲液 | <ul style="list-style-type: none">• MW 标记物 | <ul style="list-style-type: none">• Amersham™ WB 膜• 印迹纸 | <ul style="list-style-type: none">• ECL™ 二抗• 荧光 二抗• 封闭剂 | <ul style="list-style-type: none">• Amersham™ ECL™ WB 检测试剂 | <ul style="list-style-type: none">• Amersham™ 成像仪 |
|---|--|--|---|--|---|

样品产品

- | | | | | | |
|--|--|--|--|---|--|
| <ul style="list-style-type: none">• SDS-PAGE 清洁试剂盒• HiTrap™ 脱盐层析柱• PD MiniTrap™ G-25 | <ul style="list-style-type: none">• Pharmalyte™ 3 – 10• Amersham™ ECL™ Rainbow™ Markers• Amersham™ Quickstain™ | <ul style="list-style-type: none">• Amersham™ Hybond™ PVDF• Amersham™ Protran™ NC 膜• Whatman™ GB 和 3MM CHR 印迹纸 | <ul style="list-style-type: none">• Amersham™ HRP 和 CyDye™• 偶联二抗(ECL Plex™、CyDye™ 700 和 800 nm) | <ul style="list-style-type: none">• Amersham™ ECL™ Prime• Amersham™ ECL™• Amersham™ ECL Select™• Amersham™ Start | <ul style="list-style-type: none">• Amersham™ ImageQuant™ 800• Amersham™ Typhoon™ 激光扫描仪 |
|--|--|--|--|---|--|

02

样品制备

样品制备的重要性无需赘述。了解起始样本的性质并清楚地知道蛋白质印迹实验所需的信息，分析成功的几率就会大大增加。本章重点介绍样品制备的优秀示例，以确保分析从一开始就走上正轨。有关样品制备的更多详细信息，请参阅 Cytiva 《蛋白质样品制备手册》(1)。本章重点讨论对蛋白质印迹法影响最大的因素。



2.1 简介

原则上，所有来源的蛋白质，从单细胞到整个组织，以及细胞外基质、生物液体和体外分泌的蛋白质，都可以用蛋白质印迹法进行分析。尽管悬浮状态的哺乳动物细胞在温和条件下易于被破坏并释放其蛋白质，但从完整组织或固体肿瘤细胞中提取蛋白质更加困难。植物、细菌和真菌的细胞壁坚硬且富含碳水化合物，对活细胞起着保护作用，这使得从中提取蛋白质变得更加复杂。

然而，无论蛋白质的来源和用途如何，我们的目标都必须是设计出一种足够有效的提取方法，既能进入和破坏细胞，又不会对我们感兴趣的蛋白质造成不可逆转的改变。与此同时，该方法还要确保兼顾合理的得率与纯度。

 样品制备 - 动作要轻柔！头脑要冷静！

使用尽可能温和的提取方法。过度粗暴地破坏细胞或组织可能会使目标分子变性、形成永久性蛋白质复合物、产生化学修饰，或导致分区蛋白水解酶的释放。

尽可能在冰上快速提取蛋白质，提取时要使用适当的缓冲液以维持 pH 值、离子强度和稳定性，从而防止蛋白质降解。使用预冷设备并将样本始终放在冰上。

生物基质非常复杂。除了核酸、多糖和脂质等可能干扰分析的物质外，目标蛋白质也可能是样品中成千上万种蛋白质中的一种。提取和纯化所需的精力取决于最终目标；例如，如果目的是检测一种低丰度蛋白质，建议使用免疫沉淀等技术从样品中亲和分离出该特定蛋白质。另一方面，使用几乎天然的样本也能实现对稳定且高丰度蛋白质的有效分析。

提取方法的选择主要取决于样品，以及分析的目标是细胞中的所有蛋白质，还是只针对特定亚细胞组分的蛋白质。

此外，细胞被破坏时释放的任何内源性蛋白酶都可能降解目标分子。为避免损失不受控的蛋白质，在细胞破碎和随后的纯化过程中，应使用混合蛋白酶抑制剂来保护样品。

有许多方法可用于破坏细胞并对细胞内容物进行初步处理，以用于蛋白质印迹分析。表 2.1 列出了一些最常用的提取方法，并说明了这些方法对处理特定细胞或组织的适用性。总体而言，当样品由易于裂解的培养细胞或血细胞组成时，可采用温和的方法。要破坏更稳定的细菌或植物细胞，或嵌入结缔组织中的哺乳动物细胞时，则需要采用更强大的方法。

表 2.1.不同细胞和组织的提取方法概览

样品	常见裂解方法
组织培养	去垢剂裂解
细胞悬浮液	超声波处理
大多数动植物组织	机械均质(如Waring™搅拌器或Polytron™搅拌器)
动物软组织和细胞	Dounce (手动)和/或 Potter-Elvehjem (机械)均质
细菌和哺乳动物细胞	冷冻/解冻裂解
细菌、红细胞、培养细胞	渗透性休克溶解
实体组织和植物细胞	用研钵和研杵动研磨
细胞悬浮液、酵母细胞	用磨料组件研磨(如砂、玻璃珠、氧化铝)细菌、酵母、
植物组织、真菌细胞	酶消化
细菌、酵母、植物细胞	爆炸性减压(氮空化)
有细胞壁的微生物	层I压细胞破碎仪
植物组织、真菌细胞	玻璃珠研磨

2.2 蛋白质提取方法

2.2.1 基于去垢剂的裂解

去垢剂裂解法是处理哺乳动物细胞最常用的方法。将细胞悬浮液温和离心并重新悬浮在含有去垢剂的裂解液中。细胞膜被溶解，从而裂解细胞并释放其内容物。可通过加入裂解液直接溶解在组织培养表面上的贴壁细胞(如成纤维细胞)；也可以在有非溶解缓冲液的情况下，用橡胶手术刀从表面刮下贴壁细胞，离心后作为细胞悬浮液处理。使用温和的非离子去垢剂，如 Tween™ 20、壬基酚聚氧乙烯醚乙醇(NP40)或两性离子去垢剂，如 3-([3-胆酰胺丙基]二甲基氨基)-1-丙磺酸盐(CHAPS)，可最大限度地减少目标蛋白质的变性。

2.2.2 冷冻/解冻裂解

这种方法适用于哺乳动物或细菌细胞的悬浮液。冷冻/解冻裂解法的主要优点是操作简单、成本低廉。冰晶的反复形成会破坏细胞，这种方法通常与酶裂解相结合。细胞悬浮液可使用液氮快速冷冻。然后解冻样本，在室温下用移液管或轻轻涡旋将样本重悬于裂解缓冲液中，并重复此过程数次。在每个循环中，对样本离心并保留上清液。

2.2.3 渗透性休克

这是一种非常温和的方法，无需使用去垢剂即可裂解悬浮的哺乳动物或细菌细胞。这种方法通常与机械破坏法相结合，依赖从高渗透介质到低渗透介质的转换，非常适合后续将裂解物精细分离为亚细胞组分的应用。

2.2.4 超声处理

这种蛋白质提取方法最常用于细胞悬浮液。通过插入样本的探针用高频声波(通常为 20 至 50 kHz)破碎细胞声波会产生一个低压区域，从而破坏探针尖端附近的细胞膜。细胞悬液应通过短促的超声波处理来避免加热，并且每次处理间隔应将样品置于冰上冷却。该方法适用于小规模样品制备。必须对蛋白质聚集体(包涵体)进行溶解。超声处理虽然相对简单，但却是一种严格的样品制备方法，必须持续控制产生的热量，敏感的目标分子很容易受到剪切力的影响。

 对于蛋白质制备来说，DNA 的释放会导致样品高度粘稠，难以处理。加入 DNase 可降低粘度。

2.2.5 机械方法

可以通过一些粗糙但有效的粉碎和研磨从细胞和组织中提取蛋白质。例如，当样品被迫通过狭窄的间隙时，细胞膜会受到液体剪切力的破坏；间隙越窄，剪切力越大。液体剪切力可通过 Dounce(手动)或 Potter-Elvehjem (机械)均质法实现。这种温和的方法非常适合小体积和培养细胞。

可使用 Waring™ 搅拌器或 Polytron™ 对在冷冻缓冲液中切碎或绞碎的组织进行均质化处理。Polytron™ 与 Waring™ 搅拌器的不同之处在于，它会将组织卷入一个装有旋转刀片的长轴中。有不同容量的转轴可供选择，适用的最小样品量可为 1 mL。

研钵和研杵：组织或细胞通常在液氮中冷冻，然后磨成细粉。添加氧化铝或沙子有助于研磨。细胞壁会被机械力破坏。

玻璃珠研磨：用细玻璃珠快速搅拌细胞可破坏细胞壁。研磨珠可裂解大多数革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌，包括分枝杆菌。

2.2.6 酶消化

从细菌、酵母或其他细胞膜被坚固的保护结构包裹的生物体中提取蛋白质时，经常使用酶消化法。这类酶能溶解细胞壁、包衣、荚膜、囊壳或其他仅靠机械力不易剪切的结构。酶消化后通常会在裂解缓冲液中对细胞进行均质、超声或剧烈涡旋处理。该方法最常用于细菌和酵母。它还可用于从嵌入纤维组织的真核细胞中提取蛋白质，例如，胶原酶可促进纤维胶原的分解。表 2.2 概述了相关酶及其用途。

表 2.2.用酶消化细菌和酵母细胞

酶	描述	注释
溶菌酶	又称胞壁酸酶(muramidase)或N-乙酰胞壁质聚糖水解酶(N-Acetylmuramide glycanhydrolase)。溶菌酶是通过催化水解N-乙 酰胞壁酸和肽聚糖中的N-乙酰基氨基葡萄糖残基之间以及壳聚糖中的N-乙酰基氨基葡萄糖残基之间的1,4书糖昔键来破坏细菌细胞壁的一种酶。	主要用于细菌细胞
酵母裂解酶	主要酶活性为阳1,3葡聚糖酶和 P-1,3-葡聚糖昆布五糖水解酶，它们能够水解B-1,3-葡聚糖键的葡萄糖聚合物， 主要产物为昆布五糖	主要用于酵母
溶葡萄球菌酶A拟葡萄球菌金属内肽酶，对葡萄球菌细胞壁肽聚糖具有特异性		主要用于葡萄球菌可发挥出极强的抗葡萄球菌作用

2.2.7 爆炸性减压

这种技术通常用于细菌、酵母、植物细胞或其他结构牢固的样品。在高压(通常为 5500 kPa/800 psi)下用氮气等惰性气体对细胞进行平衡。该方法会用到高压细胞破碎仪， 其原理是当样品从高压腔通过孔口进入低压腔时，压力会迅速下降。这是一种快速高效的方法，适用于大批量处理。

2.2.8 预制裂解缓冲液

Cytiva 提供一系列用于从哺乳动物细胞、酵母、细菌和动物组织中提取蛋白质的产品。

哺乳动物蛋白质提取缓冲液专为从哺乳动物培养细胞中高效、温和地提取具有生物活性的全溶性蛋白质而设计。这种缓冲液以有机缓冲剂为基础，可用于细胞悬浮液和贴壁细胞。

酵母蛋白质提取缓冲液试剂盒可用于提取酵母细胞中的可溶性蛋白，是改进了基于酵母裂解酶(Zymolyase)的原生质球制备和酵母细胞可溶性蛋白提取法的专利产品。该试剂盒提供了一套方案，用于制备原生质球，并在裂解和提取酵母蛋白质之前去除裂解酶 Zymolyase。该缓冲液以有机缓冲剂为基础，含有温和的非离子去垢剂，以及各种盐和制剂的专利组合，可提高蛋白质的提取率和稳定性。此外，还提供了一种即用型酵母裂解酶(Zymolyase)制剂。根据不同的应用，还可以添加还原剂、螯合剂和蛋白酶抑制剂等其他试剂。酵母蛋白质提取缓冲液试剂盒免去了用玻璃珠裂解酵母细胞的麻烦。

2.2.9 样品制备试剂盒

样品研磨试剂盒可用于破坏小组织和细胞样本，以提取蛋白质。每支试管最多可处理 100 mg 样品，耗时约 10 分钟。试剂盒由微离心管和一次性研杵组成，每个离心管都装有少量悬浮在水中的研磨填料。首先对试管进行离心，使填料颗粒化，然后除去水分。然后在试管中加入所选的提取溶液和样品，并用研杵研磨样品。离心后，细胞碎片和研磨填料会牢牢地粘在试管的锥形底部，让您轻松移除上清液。

illustra™ triplePrep™ 试剂盒的设计专用于从未分离的动物组织和哺乳动物细胞样本中快速分离和纯化高得率基因组 DNA、总 RNA 和总变性蛋白质。该工作流程减少了总步骤数，可在 1 小时内制备出所有三种分析物。缓冲液、层析柱和实验方案可确保从活检、存档组织和肿瘤等有限样本中获得高回收率。通过从同样本源中提取 RNA、DNA 和蛋白质，可以比较 RNA 水平和蛋白质表达等特性。这在样本稀缺的情况下非常有用。

2.2.10 保护样品

裂解缓冲液中必须加入蛋白酶抑制剂，以防止细胞裂解过程中内源性蛋白酶释放后蛋白质降解。

蛋白酶抑制剂混合物：样品制备通常需要抑制蛋白酶的活性。Cytiva 提供竞争性和非竞争性蛋白酶抑制剂的独特组合，从动物组织、植物组织、酵母和细菌中提取的蛋白质在纯化过程中不被蛋白水解。这种混合物包含丝氨酸、半胱氨酸和钙蛋白酶抑制剂，能有效抑制超过 95% 的蛋白酶活性。可选择添加乙二胺四乙酸(EDTA)来抑制金属蛋白酶。

虽然在蛋白质提取过程中保持蛋白酶处于非活性状态非常重要(表 2.3)，但也应考虑到其他可能会影响提取的污染物。例如，如果蛋白质印迹的目的是检测磷酸化蛋白，则必须确保在制备样品过程中释放到裂解液中的磷酸酶的去磷酸化作用不会影响样品。保护样品的一种方法是在裂解缓冲液中加入钒酸钠等磷酸酶抑制剂。可能还需要保护目标蛋白质免受不必要的修饰，如乙酰化、泛素化或糖基化。

表 2.3.裂解缓冲液中的蛋白酶抑制剂

抑制剂	靶点	注释
抑肽酶	丝氨酸蛋白酶	也能抑制相关的蛋白水解酶
胰凝乳蛋白酶抑制剂	糜蛋白酶、类糜蛋白酶的丝氨酸蛋白酶、肥大细胞蛋白酶和溶酶体半胱氨酸蛋白酶	植物提取物的常见混合物成分
亮抑酶肽	半胱氨酸、丝氨酸和苏氨酸蛋白酶	常见混合物成分
Pefabloc™	丝氨酸蛋白酶，如糜蛋白酶、激肽释放酶、纤溶酶、凝血酶和胰蛋白酶	不可逆抑制剂。特异性与苯基甲基磺酰氟 (PMSF)相似，但在低pH值下更稳定
胃酶抑素	天冬氨酰蛋白酶	高效力抑制几乎所有酸性蛋白酶 常见混合物成分
PMSF	丝氨酸和硫基蛋白酶	在水中很快降解。原液通常在二甲基亚砷 (DMSO)等溶剂中制成 可用还原剂灭活，如二硫苏糖醇(DTT)和缶筑基乙醇

2.3 样品净化

通常无需在 1D 凝胶电泳前对样品进行处理。但是，如果分离出现问题，如条带模糊，样品净化可以去除潜在的干扰化合物，如核酸、多糖和盐类，从而提高分离效果。例如，添加 DNase 可解决核酸释放造成的粘度过高问题。表 2.4 列出了常见污染物及其去除方案。

表 2.4.影响下游分析的污染物

污染物	清除原因	技术
核苷酸、代谢物、磷脂等内源性小离子分子	这些物质通常带负电荷，会干扰某些下游分析	三氯乙酸(TCA) /丙酮沉淀用TCA、硫酸铯〔或苯酚/乙酸铯沉淀样品，然后离心在十二烷基硫酸钠(SDS)或高pH值条件下溶解样品 ²
不溶性物质	样品中的不溶性物质会堵塞凝胶的孔隙	离心或过滤
离子去垢剂	在蛋白质提取和溶解过程中，通常会使用SDS等离子去垢剂，但它们会对某些下游分析产生强烈干扰	稀释成含有两性离子或非离子去垢剂的溶液，如 CHAPS、Tween-20 或 NP40 蛋白质的丙酮沉淀可部分去除SDS,室温沉淀可最大限度地去除SDS,但蛋白质在-20° C 时沉淀得更彻底。 用TCA、硫酸铯或苯酚/乙酸铯沉淀样品，然后离心 ¹ 高pH值下溶解 ²
脂质	许多蛋白质，尤其是膜蛋白，会与脂质复合，导致溶解度降低，同时影响等电点(pI)和分子量。 脂质与去垢剂形成不溶性复合物，降低了去垢剂作为蛋白质增溶剂的功效 在离心富含脂质的组织提取物时，通常会有一层难以去除的脂质层	强变性条件和去垢剂可最大限度地减少蛋白质与脂质之间的相互作用，因此可能需要过量的去垢剂 用丙酮沉淀可去除部分脂质 用TCA、硫酸铯或苯酚/乙酸铯沉淀样品，然后离心 ¹ 在SDS或高pH值条件下溶解样品 ²

表 2.3.裂解缓冲液中的蛋白酶抑制剂

污染物	清除原因	技术
酚类化合物	酚类化合物存在于许多植物组织中，可 通过酶催化的氧化反应修饰蛋白质	在提取过程中加入还原剂，如DTT或缶筑基乙 醇，可减少酚类物质的氧化。
		通过沉淀快速分离蛋白质和酚类化合物
		用二乙基二硫代氨基甲酸或硫服等抑制剂使多酚 氧化酶失活 通过吸附到聚乙烯吡咯烷酮(PVP)或聚乙烯聚 毗咯烷酮(PVPP)上去除酚类化合物
多糖	多糖可能堵塞凝胶的孔隙 有些多糖带负电荷，可通过静电作用与蛋白质复合	用TCA、硫酸铪或苯酚/乙酸铪沉淀样品，然后离心 ¹
		超速离心可去除高分子量多糖
		在SDS或高pH值条件下溶解样品 ²
盐分、残留缓冲液和 其他样品制备过程中 携带的带电小分子	盐分会干扰某些下游分析	透析
		离心透析
		凝胶过滤
核酸	扰乱迁移并堵塞样品孔	沉淀/再悬浮
		添加DNase

1.使用硫酸铵沉淀后续需要进行脱盐。
2.对于 2D 凝胶电泳，必须去除 SDS。

2.3.1 样品净化产品

SDS-PAGE 净化试剂盒专为制备因含有盐分或蛋白质浓度较低而难以分析的样品而设计(图 2.1)。本试剂盒使用沉淀剂和共沉淀剂的组合来定量沉淀样品蛋白质，同时将去垢剂、盐分、脂质、酚类和核酸等干扰物质留在溶液中。蛋白质通过离心作用沉淀为颗粒。进一步清洗颗粒以去除非蛋白质污染物，然后再次离心。重新悬浮沉淀颗粒，与用于聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)的 SDS 样品缓冲液合并加热。然后样品就可以进行 SDS-PAGE 了。整个流程可在 2 小时内完成。

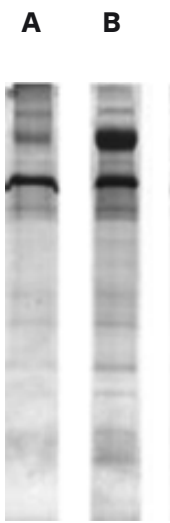


图 2.1.SDS-PAGE 净化试剂盒与乙醇沉淀法的比较。(A) 用 10 体积乙醇沉淀尿蛋白。(B) 用 SDS-PAGE 净化试剂盒沉淀的尿蛋白。使用 SDS-PAGE 净化试剂盒后, 由于试剂盒采用了高效的沉淀程序, 因此能检测到更多更强的条带。凝胶: 8 × 9 cm, 12.5% 丙烯酰胺, 0.1% SDS, 在 SE 260 迷你型垂直电泳仪上运行。染色: 考马斯蓝 R-250。

2-D 净化试剂盒专用于制备 2D 凝胶电泳样本(图 2.2), 也可用于蛋白质印迹应用。这些试剂可定量沉淀蛋白质, 同时将去垢剂、盐分、脂质、酚类和核酸等干扰物质留在溶液中。使用 2D 净化试剂盒处理样品可大大提高 2D 凝胶电泳结果的质量, 减少拖尾、背景染色和其他伪影。有关 2D 净化试剂盒的更多详细信息, 请参考 Cytiva 的 2D 电泳、原理和方法手册(2)。

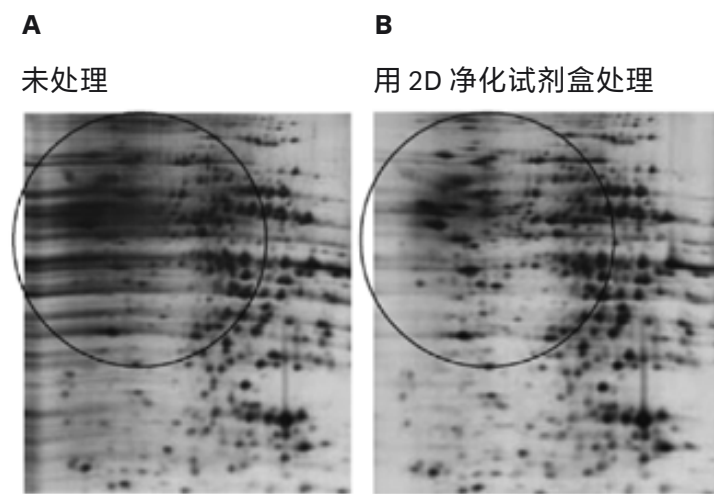


图 2.2.2D 净化试剂盒可消除残留 SDS 造成的大部分水平拖尾。样品: 用 4% SDS 和 40 mM Tris 碱提取大鼠肝脏。第一维度: 约 20 µg 大鼠肝脏蛋白、Immobiline™ DryStrip(pH 值 4-7, 7 cm)。Ettan™ IPGphor™ 3 等电聚焦电泳仪 17.5 kVh。第二维度: SDS-PAGE(12.5%), 在 SE 260 迷你型垂直电泳仪(8 × 9 cm 凝胶)上运行。染色: PlusOne 银染试剂盒, 蛋白质。

2.3.2 去除血清或血浆样本中的高丰度蛋白质

用蛋白质印迹法检测血浆或血清时，丰富的血浆蛋白(如白蛋白和 IgG)会掩盖含量较少的蛋白的信号。预填充层析柱可去除样品中这些可能存在问题的蛋白质，HiTrap™ Albumin 可去除 > 95% 的白蛋白，IgG Depletion 则可去除 > 90% 的 IgG。

1 mL 规格的 HiTrap™ Albumin and IgG Depletion 层析柱适用于去除体积约为 150 µL 的未稀释人体血浆或血清样本中的白蛋白和 IgG，其中白蛋白(约 40 mg /mL)和 IgG(约 15 mg/mL)含量正常。去除过程大约需要 35 分钟，可使用 ÄKTA™ 平台的液相层析系统、蠕动泵或手动注射器进行。在处理较小体积的血浆或血清时，建议使用专为处理约 50 µL 人体血浆或血清而设计的 Albumin and IgG Depletion SpinTrap™ 层析柱。

2.3.3 脱盐和浓缩样品

在将样品上样到电泳凝胶上之前，必须确保溶剂中不含有浓度过高的盐分或其他低分子量污染物。样品中盐分浓度过高会导致蛋白质迁移的不一致性和不可预测性。通过凝胶过滤，只需一步即可实现脱盐，同时将样品转印到所需的缓冲液中。然而，脱盐和缓冲液置换往往会导致样品稀释。在电泳应用中，要获得良好的实验结果，则需要相对较高浓度的样品，因此有必要进行样品浓缩。可通过膜超滤高效、轻松地浓缩样品。

表 2.5 概述了 Cytiva 提供的脱盐和浓缩柱。

表 2.5.Cytiva 提供的脱盐产品

产品	样品体积(mL)	脱盐能力 (%)	回收率 (%)	排阻极限(M.)	化学稳定性
一次性PD-10脱盐层析柱	1.0 至 2.5	>90	70 至 95	5000	所有常用缓冲液
PD MidiTrap™ G-25/G-10	0.5 至 1.0 (G-25) 0.4 至 1.0 (G-10)	>90	70 至 90	5000 (G-25) 700 (G-10)	所有常用缓冲液
PD MiniTrap™ G-25/G-10	0.1 至 0.5 (G-25) 0.1 至 0.3 (G-10)	>90	70 至 90	5000 (G-25) 700 (G-10)	所有常用缓冲液
HiTrap™脱盐层析柱	0.25 至 1.5	>99	95	5000	所有常用缓冲液
Vivaspin™	0.1 至 20	1	>95	3000 至 100 000	所有常用缓冲液

1 Vivaspin™ 层析柱专为样品浓缩而设计，但也可用于缓冲液置换。

2.4 总蛋白质浓度的测定

在比较同一凝胶中不同泳道或不同凝胶中样品的蛋白质含量时，所有泳道的蛋白质总量必须相同。如果相邻泳道之间的总蛋白量存在明显差异，相关蛋白表达量的实际差异就会被掩盖，从而产生误导。

有几种常规的分光光度法可用来测定溶液中的蛋白质浓度(3)。这些方法包括测量蛋白质的固有紫外线(uv)吸光度，以及基于蛋白质依赖性颜色变化的方法，如经典的铜基 Lowry 测定法(4)、Smith 铜/二喹啉甲酸测定法(BCA)(5)和 Bradford 染料测定法(6)。虽然这些方法被广泛使用，但都不是特别方便。

例如，紫外吸光度的测量需要在没有干扰(紫外线吸收)物质的溶液中获得已知消光系数的纯蛋白质。使用以下任一方程式可估算出溶液中蛋白质的大致浓度(假设使用管路长度为 1 cm 的样本池)；

A₂₈₀ = 1 A* (mL/cm mg) × [Conc.†] (mg/mL) × 1 (cm)

A₂₀₅ = 31 A* (mL/cm mg) × [Conc.†] (mg/mL) × 1 (cm)

* A₂₈₀ 代表蛋白质在 280 nm 波长处吸收的光，主要是由于环状氨基酸酪氨酸和色氨酸的存在。A₂₀₅ 代表蛋白质在 205 nm 波长处吸收的光，主要是氨基酸之间肽键的结果。

† 蛋白质浓度 (mg/mL) = A₂₈₀/1

‡ 蛋白质浓度 (mg/mL) A₂₀₅/31

然而，不同蛋白质在 280 nm 和 205 nm 波长处的消光系数差别很大，因此用这种方法得出的浓度估值充其量只是一个粗略估计。紫外吸光度要求蛋白质溶液不含核酸等其他吸收紫外线的物质，并使用石英样本池进行测量。

铜/BCA 测定法基于通过酰胺将 Cu²⁺ 还原成 Cu⁺。这些测定方法虽然相当精确，但需要新鲜配制的试剂溶液，在测定过程中必须仔细测量和混合。随后，在严格控制的高温条件下进行长时间、精确定时的孵育，然后立即进行测量吸光度。这两种测定方法都会受到生化溶液中常见的其他物质的影响，包括去垢剂、脂质、缓冲液和还原剂 (3)。因此，在进行铜/BCA 测定时，最好使用一系列标准溶液，每种溶液都含有不同的已知浓度的蛋白质，但其他成分与样品溶液相同。

Bradford 染料测定法基于三种形式的考马斯蓝 G 染料之间的平衡。在强酸性条件下，染料的双质子化形式(红色)最为稳定，但与蛋白质结合后，则是非质子化形式(蓝色)最为稳定。

与上述其他方法相比，Bradford 染料测定法速度更快、混合步骤更少、无需加热，而且比色反应更稳定。不过，这种测定方法容易受到非蛋白质来源(尤其是去垢剂)的影响，而且在其有效蛋白质浓度较高时，其线性度会逐渐降低。反应也因蛋白质的结构而异。由于这些局限性，这种测定法必须使用蛋白质标准溶液。

Bradford 染料试剂主要与精氨酸残基发生反应，其次与组氨酸、赖氨酸、酪氨酸、色氨酸和苯丙氨酸残基发生反应。因此，该检测法对碱性或酸性蛋白质的准确性较低，对牛血清白蛋白的敏感度比“普通”蛋白质高出约两倍。IgG 是 Bradford 染料测定法首选的蛋白质标准品。

2.4.1 用于测定总蛋白质浓度的产品

2-D Quant 试剂盒可用于多种不同的应用，包括准确测定样品中的蛋白质浓度。测定过程的工作原理是定量沉淀蛋白质，同时去除干扰物质。该测定方法基于铜离子与任意蛋白质的多肽骨架的特异性结合。将沉淀的蛋白质重新悬浮在含铜溶液中，用比色剂测量未结合的铜。480 nm 波长处的吸光度与蛋白质浓度成反比。该测定对 0 至 50 µg/mL 范围内的蛋白质浓度具有线性反应，推荐的样品体积为 1 至 50 µL。此外，2D Quant 试剂盒还与 SDS 等多种样品制备技术中使用的大多数试剂兼容。

2.5 参考文献

1. Protein Sample Preparation: Principles and Methods, GE Healthcare, 28988741.
2. 2-D Electrophoresis: Principles and Methods, GE Healthcare, 80642960.
3. Stoscheck, C. Quantification of Protein. Methods in Enzymology Vol. 182 (Colowick, S. P. and Kaplan, N. O., eds.), Academic Press, New York (1990).
4. Lowry, O. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265–275 (1951).
5. Smith, P. K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal. Biochem. 150, 76–85 (1985).
6. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248–254 (1976).

03

凝胶电泳

电泳是根据蛋白质的大小、形状和/或电荷分离蛋白质的常用方法。本章旨在帮助您为实际蛋白质分析选择正确的实验条件。本章将主要介绍从凝胶转印到膜上进行蛋白质印迹前的 1-D 凝胶电泳。

在规划电泳分离时，我们将考虑一些最重要的变量，如使用天然条件还是变性条件、最合适的凝胶密度(丙烯酰胺百分比)以及最合适的缓冲液体系。



3.1 电泳

电泳是一种基于带电分子在电场中流动性的分离技术。它主要用于分析和纯化蛋白质或核酸等大分子。

电泳通常是指将含有相关分子的样品装入多孔基质的孔中，然后施加电压。不同大小、形状和电荷的分子以不同的速度通过基质。分离结束后，可以在基质的不同位置检测到分子带(图 3.1)。基质可由多种不同材料组成，包括纸、乙酸纤维素或聚丙烯酰胺、琼脂糖或淀粉制成的凝胶。在聚丙烯酰胺和琼脂糖凝胶中，基质还可以在分离过程中起到片段筛选的作用。

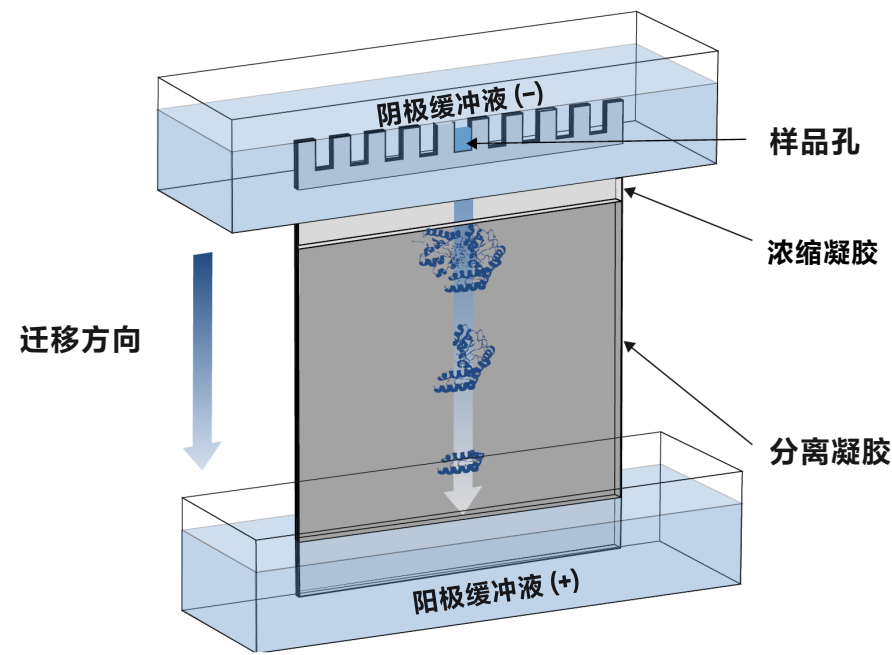


图 3.1. 垂直电泳仪的上室装有阴极(-)缓冲液，下室装有阳极(+)缓冲液。样品孔中的分子向着电场中向阳极(+)迁移。经过一定时间后，分子将根据其大小、形状和电荷迁移到相应的位置。除垂直电泳系统外，还可使用水平电泳系统。

聚丙烯酰胺凝胶和琼脂糖凝胶分别是科研实验室最常用的蛋白质和核酸分离基质。这些凝胶的孔径大小与许多蛋白质和核酸的大小相似。分子在外部电压的作用下被迫穿过凝胶，大分子比小分子更容易受到凝胶的阻滞。对于任何特定的凝胶来说，比基质中的样品孔小得多的分子根本不会受到阻滞；它们几乎就像在自由溶液中一样迁移。反之，大于样品孔径的分子根本无法进入凝胶。

在大多数电泳装置中，凝胶被安装在两个缓冲室之间，这样阳极(+)和阴极(-)之间的唯一电连接就是通过凝胶。凝胶密度和样品孔数有多种选择，凝胶有多种尺寸，预制或手工制作，最佳搭配取决于达到满意分离效果所需的距离和样品量。目前已开发出水平和垂直两种电泳系统。

3.1.1 聚丙烯酰胺凝胶

聚丙烯酰胺凝胶(图 3.2)是一种惰性交联结构。这些凝胶中的孔径大小与许多蛋白质的分子半径相似。当分子在电场中被挤压通过凝胶时，大分子比小分子更容易受到凝胶的阻滞。

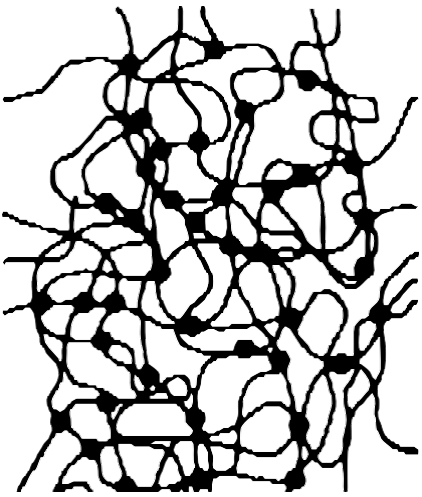


图 3.2. 聚丙烯酰胺凝胶由丙烯酰胺聚合物链之间的双丙烯酰胺(•)形成共价交联。

在丙烯酰胺和双丙烯酰胺单体溶液中加入化学引发剂和催化剂 (如过硫酸铵 [APS] 和 TEMED) 以促进交联链式反应，从而形成凝胶 (表 3.1)。另外，还可以通过光化学方法，使用核黄素和长波紫外线(UV) 作为引发剂诱导交联反应。聚丙烯酰胺凝胶是电泳应用的理想选择，主要因为聚丙烯酰胺是一种恒温介质，而且它透明、稳固且化学惰性较强。其用途的广泛性主要得益于它可以制备出各种孔径的凝胶，而孔径正是凝胶的固有特性，是决定不同大小的蛋白质如何迁移的关键。凝胶的孔径可由用户控制，并由丙烯酰胺单体和双丙烯酰胺交联剂的浓度决定。

平均孔径由所使用的交联剂量和丙烯酰胺总量的百分比决定。聚丙烯酰胺适用于分离分子量 (Mr) 在 5000 到 200 000 之间的大多数蛋白质。

表 3.1.聚丙烯酰胺凝胶中所用的化学物质

丙烯酸酰胺	凝胶基质的单体单元
APS	聚合引发剂
双丙烯酰胺(NN-甲叉双丙稀酰胺)	用于形成聚丙烯酰胺的交联剂
TEMED (N, N, N'f N七四甲基乙二胺)	聚合催化剂
Tris (C4HiqNO3f 分子量 121.14)	制备凝胶时常用作溶剂。它在环境温度下的pKa值为8.3,在7 至9的pH值范围内具有良好的缓冲能力。
丁醇(水饱和)或异丙醇	用于在浇铸后聚合前立即覆盖分离凝胶，防止形成不均匀的上边 缘 聚合后，倾析丁醇/异丙醇层，留下一个平面
甘氨酸尾随隅子源，pKa为9.7	

常见凝胶由两个不同密度的部分组成，浇铸在两块玻璃板之间。第一个被浇铸的部分又称分辨或分离凝胶，由丙烯酰胺和双丙烯酰胺的高浓度溶液制备而成。当这层凝胶凝固后，在其上方再浇铸一层由低浓度丙烯酰胺和双丙烯酰胺溶液制备而成的凝胶，称为堆积凝胶或间隔凝胶(图 3.1)。堆积凝胶的高度应至少是每个孔中样品高度的两倍。将电泳梳插入玻璃板之间未聚合的堆积凝胶中，形成装载样品的孔。凝胶凝固后小心取下电泳梳，用移液管或注射器注入运行缓冲液冲洗样品孔。首先将样品通过密度较低的堆积凝胶，当样品内容物到达分离凝胶时，蛋白质在几分钟内就会浓缩到一个较薄的起始区；这一过程被称为等速电泳。因此，两种凝胶密度之间的界面可被视为每孔中所有蛋白质的起始线，进入分离凝胶后，蛋白质开始按大小分离。

凝胶的密度(孔径)是影响蛋白质分离曲线的一个重要因素。在任何给定密度的凝胶中，快速迁移的小分子蛋白质会比缓慢迁移且几乎无法穿透凝胶的大分子蛋白质解析出更多的离散条带。如果需要在较广泛的分子量范围内进行分离，则应使用梯度凝胶。在这种凝胶中，聚丙烯酰胺网状结构的密度向阳极(+)方向增加。在给定时间内，较小的蛋白质会到达凝胶的致密区域，而较大的蛋白质则会迁移到密度较低的区域(表 3.2 和图 3.3)。因此，条带位置的分辨率足以精确测量广泛分子量范围内的蛋白质大小。

如果已知样品中相关蛋白质的大小，则可选择合适的分离凝胶密度，以实现特定分子量的蛋白质的最佳分离效果。密度较低的基质能为更大的蛋白质提供更高的分辨率。如果不知道样品中蛋白质的大小，可能需要测试几种丙烯酰胺浓度来优化分离条件。表 3.2 列出了能在不同分子量范围内能够线性分离蛋白质的丙烯酰胺浓度。

虽然尺寸超出指定范围的蛋白质也会在凝胶中迁移，但其移动并不符合线性迁移模式。

表 3.2.含 SDS 的聚丙烯酰胺凝胶中丙烯酰胺的推荐含量，用于在指定尺寸范围内线性分离目标蛋白质

目标蛋白质大小范围(M r)	丙烯酰胺的推荐浓度(%)
36 000 至 205 000	5
24 000 至 205 000	7.5
14 000 至 205 000	10
14 000 至 66 000	12.5
14 000 至 45 000	15

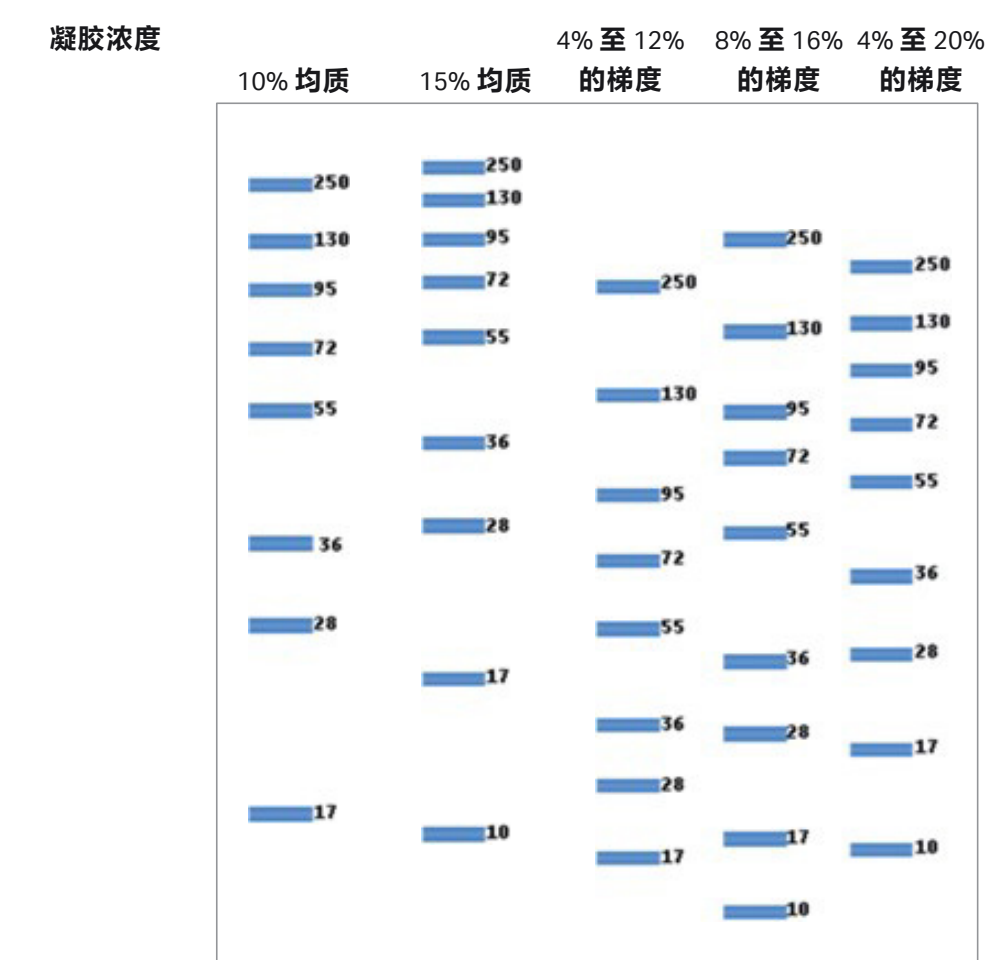


图 3.3. 在选择凝胶时，使用的丙烯酰胺浓度必须能使样品中的蛋白质达到最佳分离效果。高分子量蛋白质在丙烯酰胺含量较低的凝胶中分辨效果最佳，而较小的蛋白质在丙烯酰胺含量较高的凝胶中的效果最佳。图片显示了每种丙烯酰胺浓度下九种不同蛋白质的分离模式。

不过，实现所有相关蛋白质的严格线性分离对不同应用来说不一定同等重要。例如，在涉及两种目标蛋白质的蛋白质印迹应用中，更重要的是选择聚丙烯酰胺浓度最高的凝胶，以便更好地区分这两种蛋白质。图 3.3 为不同大小的蛋白质在均质凝胶(单一百分比)和梯度凝胶中的迁移模式示意图。

3.1.2 缓冲液系统和 pH 值

蛋白质是两性(或两性离子)化合物。因此，它们要么带正电，要么带负电，因为它们含有酸性和碱性氨基酸残基。蛋白质上的大部分电荷来自氨基酸侧链上的羧基和氨基基于 pH 值发生的电离。由于这些基团可在正常电泳 pH 值范围内滴定，因此蛋白质的净电荷取决于周围介质的 pH 值以及带有氨基或羧基的氨基酸的数量和类型。巯基交联等翻译后修饰(PTM)和封闭氨基或羧基末端也可能影响蛋白质的整体电荷。

每种蛋白质都有一个让分子不带电荷的 pH 值。在这个 pH 值(称为等电点 (pI))下，弱酸和弱碱被滴定到分子上正负电荷数量相等的水平。每种蛋白质都有其特有的 pI。在 pH 值高于 pI 值的溶液中，蛋白质带有净负电荷，并在电场中向阳极(+)迁移。在 pH 值低于 pI 值的溶液中，蛋白质带有净正电荷，并在电场中向阴极(-)迁移。对于基于蛋白质迁移率的电泳分离，溶液的 pH 值必须保持恒定，以维持电荷，从而保持蛋白质的迁移。由于水在电极上电解会产生离子(如 H⁺)，电泳中使用的溶液都是缓冲溶液。

蛋白质凝胶电泳使用两种缓冲液系统--连续缓冲液和非连续缓冲液系统。在连续系统中，电泳槽和凝胶中使用的缓冲液相同。在非连续系统中，两层凝胶分别用不同的缓冲液制成，电泳槽和凝胶中的缓冲液不同。连续式系统比非连续式系统更容易设置，并且更不容易出现样品沉淀和聚集等问题。但是，非连续系统的分辨率更高，在蛋白质电泳研究中应用更为广泛。

最常用的是 Laemmli(Tris-甘氨酸)非连续缓冲系统，由 pH 值为 6.8 的堆积凝胶和 pH 值为 8.0 至 9.0 的分离凝胶组成。这种常用系统的一个潜在缺点是，在相对较高的 pH 值下，半胱氨酸残基之间容易形成二硫键，不过在样品中加入还原剂即可缓解这一问题。另外，也可以通过使用能在较低 pH 值下分离蛋白质的缓冲液来解决这个问题。例如，甲基甘氨酸是一种有效缓冲范围 pH 值为 7.4 至 8.8 的两性离子氨基酸，已被用作非连续系统中的尾随离子，用于分离分子量低于 10,000 的多肽 (1)。

事实证明，在缓冲系统中加入反离子有利于分子量在 1000 到 100,000 之间的蛋白质的电泳分离 (2)。这种缓冲系统在堆积和分离阶段分别使用 N-二甘氨酸和硫酸作为尾随离子和前导离子，并使用 Bis-tris 和 Tris 作为反离子。与更常用的 Laemmli 系统相比，应用反离子能够分离更多的快速迁移蛋白质。

3.1.3 变性凝胶：SDS-PAGE

蛋白质会自然折叠成各种形状，从而影响其在凝胶等筛分介质中的迁移速度。蛋白质变性可消除这些结构影响，并提供反映蛋白质质量/电荷比的分离效果。为了使蛋白质变性，凝胶电泳通常在有去垢剂十二烷基硫酸钠(SDS)的情况下进行。只需将 SDS 添加到样品中，它是凝胶和运行缓冲液的成分之一。每克蛋白质将与 1.4 g SDS 结合，因此蛋白质上的任何固有电荷都会被带负电荷的去垢剂束涂层所掩盖。

当需要保持蛋白质的天然结构以便进一步分析时，变性凝胶可在非还原条件下使用(不煮沸样品，不添加还原剂)。另一种方法是在还原条件下使用变性凝胶，即在样品缓冲液中加入还原剂(如二硫苏糖醇(DTT)或β-巯基乙醇)并加热。这些试剂通过裂解半胱氨酸残基之间的二硫键，破坏蛋白质的四级和三级结构，形成线性多肽链。用这种方法处理的蛋白质的迁移率是其分子量对数的线性函数。

此外，最好能从三维结构的角度对蛋白质进行标准化处理。蛋白质的功能在很大程度上取决于多肽链如何折叠成特定形状，以形成识别和与结合对象相互作用所需的裂隙、凹陷和通道。以不同方式折叠的蛋白质所占的体积也不同；短肽如果以特定方式折叠，可能会比更大但折叠更紧密的多肽占据更多空间。在这种情况下，较短的多肽在凝胶中的迁移速度比较大的多肽慢，会给人造成分子量较高的错误印象。

因此，样品中的 SDS 和二硫还原剂可确保蛋白质仅根据大小而非电荷或三维结构进行分离。在将样品添加到凝胶孔中之前，应先与含有溴酚蓝的上样缓冲液混合，这有助于用户观察样品的上样情况，并在电泳过程中监测蛋白质的迁移。表 3.3 概述了上样缓冲液中常用的化学物质。

表 3.3.上样缓冲液中使用的辅助化学物质

化学物质	功能
溴酚蓝	使用户能够监测先导染料前沿(以及最小的蛋白质)在凝胶中的迁移，并指示何时应该关闭电流，结束凝胶运行
甘油	增加样品的密度，从而实现上样，并在电场作用于凝胶之前将样品固定在样品孔中。(这一点至关重要；如果没有甘油，样品会迅速与运行缓冲液混合，并不可逆转地流失)
还原剂	切断链间和链内的二硫键，使多肽线性化，破坏蛋白质的四级和三级结构
SDS	能与蛋白质结合的去垢剂。蛋白质的固有电荷会被带负电荷的去垢剂胶束涂层所掩盖，从而以其分子量对数的线性函数的速率迁移。

3.1.4 天然凝胶：PAGE

天然或非变性凝胶电泳在无 SDS 的情况下进行。在 SDS-PAGE 中，蛋白质的电泳迁移率主要取决于分子质量，而在天然 PAGE 中，迁移率则取决于电荷和流体力学尺寸。

蛋白质在运行缓冲液 pH 值下的固有电荷取决于蛋白质的氨基酸组成以及翻译后修饰 (PTM)，如添加唾液酸。由于蛋白质在天然条件下能够保持折叠构象，因此其在凝胶上的流体力学尺寸和迁移率也会随构象的性质而变化(构象更紧凑的迁移率更高，结构更大的迁移更慢)。如果天然 PAGE 在接近中性 pH 值的条件下运行，以避免酸性或碱性变性，那么它就可以用来研究构象、自缔合或聚集以及其他蛋白质或化合物的结合。

因此，天然凝胶对改变蛋白质电荷或构象的任何过程都很敏感，是适用于以下应用的理想工具：

- 化学降解(如脱酰胺基)导致的电荷变化
- 折叠/解折导致的构象变化
- 聚合(共价和非共价)
- 结合事件(蛋白质-蛋白质或蛋白质-配体)

天然凝胶是分析加速稳定性样品、展示不同批次或工艺的可比性或检验赋形剂影响的绝佳工具。天然凝胶的另一个优点是可以在分离后恢复蛋白质的天然状态。不过，在进行任何固定或染色之前，可能需要回收活性生物物质。

3.1.5 二维 (2D) 凝胶电泳

在本手册中，我们主要介绍一维电泳后的印迹技术，即根据蛋白质的大小进行分离。但随着蛋白质组学领域的分析技术的日益强大，凝胶中蛋白质的分辨率需要得到进一步提高。为此，2D 凝胶电泳得到了广泛应用。它还可用作蛋白质印迹前的分离步骤。

蛋白质首先通过等电聚焦(IEF)法分离。这是一种根据等电点(pI)分离蛋白质的电泳方法。蛋白质是两性分子，这意味着它们带有正、负或零净电荷，具体取决于氨基酸组成和周围介质的 pH 值。pI 是蛋白质净电荷为零时的特定 pH 值。在 IEF 中，使用的是 pH 梯度值。在电场的影响下，蛋白质会移动到梯度中其净电荷为零的位置。

分离分辨率取决于电场强度，因此 IEF 需要在高电压下进行(通常超过 1000 V)。当蛋白质到达其在 pH 梯度中的最终位置时，系统中的离子运动非常少，因此最终电流非常低(通常低于 50 μ A)。

可在天然或变性条件下，在条状或棒状基质中运行 IEF。当需要蛋白质在分离后维持天然状态时(例如要进行活性染色时)，首选天然条件。然而，由于许多蛋白质在低离子强度下不溶解，或在 pH 值接近其 pI 时只能部分溶解，因此天然 IEF 的应用往往受到限制。在这种情况下，应使用变性 IEF。尿素是首选的变性剂，因为这种不带电荷的化合物可以溶解许多在 IEF 条件下无法溶解的蛋白质。

最好使用水平电泳仪进行 IEF，因为这样可以实现高效冷却，这是抵消高电压影响所必需的。

完成第一维分离后，将得到的条状或棒状物在 SDS 溶液中平衡，然后应用 SDS-PAGE，根据分子量对蛋白质进行分离。由于蛋白质是根据 pI 和大小这两种不同的特性进行分离的，因此二维凝胶电泳的分离能力要比一维电泳强很多。

二维凝胶电泳作为一种生化分离技术，其效果自问世以来就已得到广泛认可。随着蛋白质组学领域的快速发展，得益于其同时分离数千种蛋白质的出色能力，二维凝胶电泳的应用已变得越来越重要。该技术还能检测无法通过基因组序列预测的 PTM 和共翻译修饰。

除了蛋白质组学，二维凝胶电泳的应用还包括细胞分化、疾病标志物检测、治疗监测、药物发现、癌症研究、纯度检验和微量蛋白质纯化。此外，二维蛋白质印迹法也是研究 PTM 的一项非常有用的技术，第 10 章将举例说明此类应用。

有关二维凝胶电泳的更多详细信息，请参阅 Cytiva 手册 2-D 电泳、原理和方法(3)。



Ettan™ IPGphor™ 3 IEF 系统

3.2 分子量标记物

分子量标记物用于确定凝胶中蛋白质的大小。标记物由已知大小的不同蛋白质组成，运行过程中迁移的距离提供了一个对数刻度，据此可估算未知蛋白质的大小。对于大多数应用，在凝胶上至少保留一条单独的泳道来运行分子量标记物是较为方便的做法。除了尺寸估算外，加入可见分子量标记物还能在整个电泳过程中监测蛋白质的移动，并评估蛋白质从凝胶转印到膜上的效率。

通过 Cytiva 提供的多种预染色和未染色分子量标记物，您可以估算出印迹蛋白的分子量，从 3500 到 669 000 不等 (表 3.5)。

表 3.5.适用于 PAGE 和蛋白质印迹的分子量标记物概览

产品特性	
全范围、高范围和低范围彩虹分子量标记物	凝胶和印迹上可见的彩色条带
Amersham™ ECL DualVue™ 蛋白质印迹标记物	用于EC®应用的组合标记物；包括用于监测迁移和转印的预染色标记物， 以及通过化学发光检测的标签蛋白，可在胶片上或通过电荷耦合(CCD)成像 仪进行检测
Amersham™ ECL PI ex™ 荧光彩虹标记物	凝胶和印迹上可见的彩色条带。在Typhoon™等荧光成像仪(激光扫描仪) 的Cy™5和Cy™3通道中检测荧光
蛋白质分子里标记物	具有多种染色方案的未标记的蛋白质标记物。可使用考马斯亮蓝或银染法 显现条带

3.2.1 彩虹分子量标记物

彩虹分子量标记物(图 3.8)可通过 SDS- PAGE 对蛋白质进行快速简单的鉴定。这些可直接上样的标记物可在凝胶和印迹上形成清晰鲜艳的条带，而且条带间距离散，可准确测定分子量。标记物颜色鲜艳，区别显著，可用于确认蛋白质转印到印迹膜上的情况和方向。标记物由单独着色的蛋白质混合物组成，这些蛋白质组合在一起会产生颜色强度相同的条带。彩虹分子量标记物有三种尺寸范围：全范围(10 种蛋白质，Mr 12 000 至 225 000)；高范围(8 种蛋白质，Mr 12 000 至 225 000)；或低范围(7 种蛋白质，Mr 3500 至 38 000)。



图 3.4.彩虹分子量标记物有三种尺寸范围, 可搭配 SDS-PAGE 使用。全范围、高范围和低范围(从左至右)。

3.2.2 Amersham™ ECL DualVue™ 蛋白质印迹标记物

Amersham™ ECL DualVue™ 蛋白质印迹标记物 (图 3.9) 有两个主要功能。首先, 预染色标记蛋白质除了能清楚地确定印迹方向外, 还能让您监测整个电泳过程并确认蛋白质已从凝胶转印到膜上。其次, 可通过胶片或 CCD 成像仪搭配目标蛋白检测重组标签蛋白, 从而实现高精度的分子量测定。通过特异性偶联物可以轻松检测特定标签标记物, 从而避免目标蛋白质与标记物之间的交叉污染。

标记物包含三种分子量明确的预染色彩色标记物 (Mr 15 000、16 000 和 100 000) 和七种标签重组蛋白(Mr 15 000 至 150 000)的混合物。该产品与任何 HRP 底物以及聚偏氟乙烯(PVDF)膜和硝酸纤维素膜兼容。建议使用 Amersham™ ECL™、Amersham™ ECL™ Prime 和 Amersham™ ECL Select™ 等试剂对 Amersham™ ECL DualVue™ 蛋白质印迹标记物进行化学发光检测。

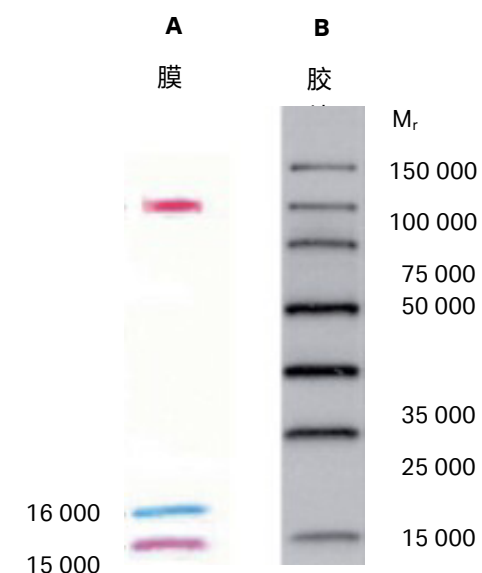


图 3.5. Amersham™ ECL DualVue™ 蛋白质印迹标记物在 4%-20% SDS 凝胶上电泳后, 转印到 Amersham™ Hybond™ ECL™ 硝酸纤维素膜上 (现已换成 Amersham™ Protran™ Premium 0.45 硝酸纤维素印迹膜)。预染色的指示蛋白用膜的照片显示 (A), 用 Amersham™ ECL™ 检测后的标签重组蛋白用曝光 1 分钟后的胶片照片显示 (B)。

3.2.3 Amersham™ ECL Plex™ 荧光彩虹标记物

这些蛋白质分子量标记物经过优化, 可与 Amersham™ ECL Plex™ 蛋白质印迹检测系统搭配使用, 在凝胶和膜上形成清晰可见的标记带, 并通过 Typhoon™ 等荧光成像仪的 Cy™3 和 Cy™5 通道生成图像。

使用 10 × 10 cm 的微型凝胶时, 每条泳道使用 Amersham™ ECL Plex™ 荧光彩虹标记物 (图 3.10) 的量最少应为 1.5 至 3 μL。过载会干扰相邻泳道的样品分析。如果要检测低丰度蛋白, 则只需添加 1.5 μL 标记物, 或者在样品和标记物之间的一条泳道中加入上样缓冲液。

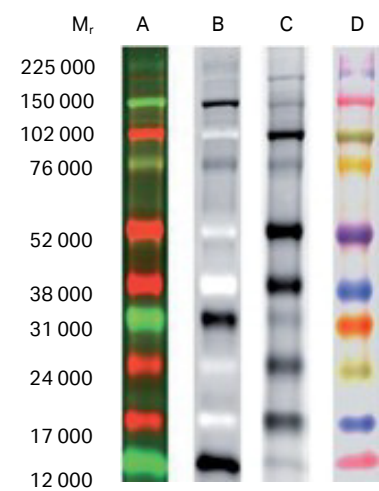


图 3.6.在 Typhoon™ 扫描仪上成像的 Amersham™ ECL Plex™ 荧光彩虹标记。从左向右: (A) 全彩 Cy™3 和 Cy™5; (B) Cy™3 通道; (C) Cy™5 通道; (D) 可见光谱。

3.2.4 未标记的蛋白质分子量标记物

电泳后可使用总蛋白染色法(如 SYPRO™ Ruby、考马斯亮蓝或银染法)观察未标记的分子量标记物。标记物可提供低分子量(LMW)-SDS 标记物试剂盒(Mr 14 000 至 97 000)、高分子量(HMW)-SDS 标记物试剂盒(Mr 53 000 至 220 000)和高分子量天然标记物试剂盒(Mr 66 000 至 669 000)三种产品。

3.3 通过分子量标记物确定未知蛋白质的分子量

经 SDS 处理的蛋白质在聚丙烯酰胺凝胶中迁移时, 分子量的对数与迁移距离呈线性相关。

描绘出标记物的相对迁移距离(Rf)与其分子量的对数之间的关系图, 即可计算出未知蛋白质的分子量 (图 3.11)。从校准图中可以计算出样品中蛋白质的含量。

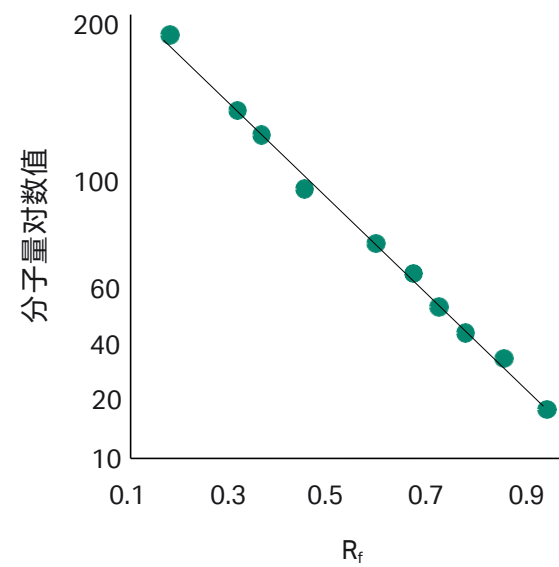


图 3.7. 迁移距离与分子大小之间的关系图。

使用 ImageQuant™ TL 软件可以轻松地自动进行大小测定 (见第 8.3 章)。

3.4 总蛋白染色

由于蛋白质在凝胶中无法直接显现， 因此必须对凝胶进行染色。蛋白质通常使用考马斯蓝 (Coomassie Blue)等染料染色或采用银染法。凝胶染色后， 可使用合适的仪器对凝胶进行成像(见第 7 章)， 以获得永久记录。可通过适用的软件程序对捕捉到的图像进行图像分析。

转印后对凝胶进行染色可确保蛋白质成功地从凝胶迁移到膜上。如果蛋白质没有迁移到膜上， 则无需继续印迹步骤。在某些应用中， 电泳后直接分析凝胶中的整个蛋白质模式就足够了， 例如， 检查蛋白质纯化的质量。另一种方法是在电泳前用荧光化合物等对样品进行标记， 因为可以在分离后直接进行图像捕捉。

银色：银染是对聚丙烯酰胺凝胶中的蛋白质进行永久可见染色的最灵敏的方法。在银染法中， 凝胶中浸渍了可溶性银离子， 并通过甲醛处理使银离子还原， 形成不溶性的棕色金属银沉淀。蛋白质会促进这种还原反应。银染蛋白质可使用 Amersham™ ImageQuant™ 800 等系统进行成像。

考马斯蓝：考马斯蓝染色法基于染料考马斯亮蓝的结合， 它几乎能与所有蛋白质非特异性结合。虽然灵敏度不如银染法， 但因其方便性而被广泛使用； 只需将凝胶浸泡在染料溶液中， 未结合的染料就会在脱色步骤中从凝胶中扩散出来。可使用 Amersham™ Typhoon™ 系列和 Amersham™ ImageQuant™ 800 等系统对考马斯蓝染色过的蛋白质进行成像。

荧光预标记：荧光预标记是指在电泳前将 CyDye™ 等荧光染料耦联到蛋白质上 (4)。Amersham™ Quickstain™ 试剂盒含有 Cy™5 荧光基团和标记缓冲液， 可在 SDS-PAGE 后直接检测蛋白质， 无需后期染色。此外， 多余的 Cy™5 荧光基团在凝胶中的迁移速度比蛋白质更快， 最终会到达凝胶底部， 因此无需对凝胶进行脱色。详见 11.2.5 中的实验方法。

图 3.12 显示了在转印和随后的蛋白质印迹分析前用 Cy™5 预标记过的细胞裂解液样本的分离情况。除了操作便捷， 它还比银染法更灵敏， 在所有染色技术中动态范围最广(图 3.13)。经 Amersham™ Quickstain™ 染色的总蛋白还可转印到蛋白质印迹上， 用于总蛋白的归一化。可使用 Amersham™ Typhoon™ 5 和 Amersham™ ImageQuant™ 800 等系统分析荧光标签。

表 3.6 概述了一些常用蛋白质染色剂和标签的特性。

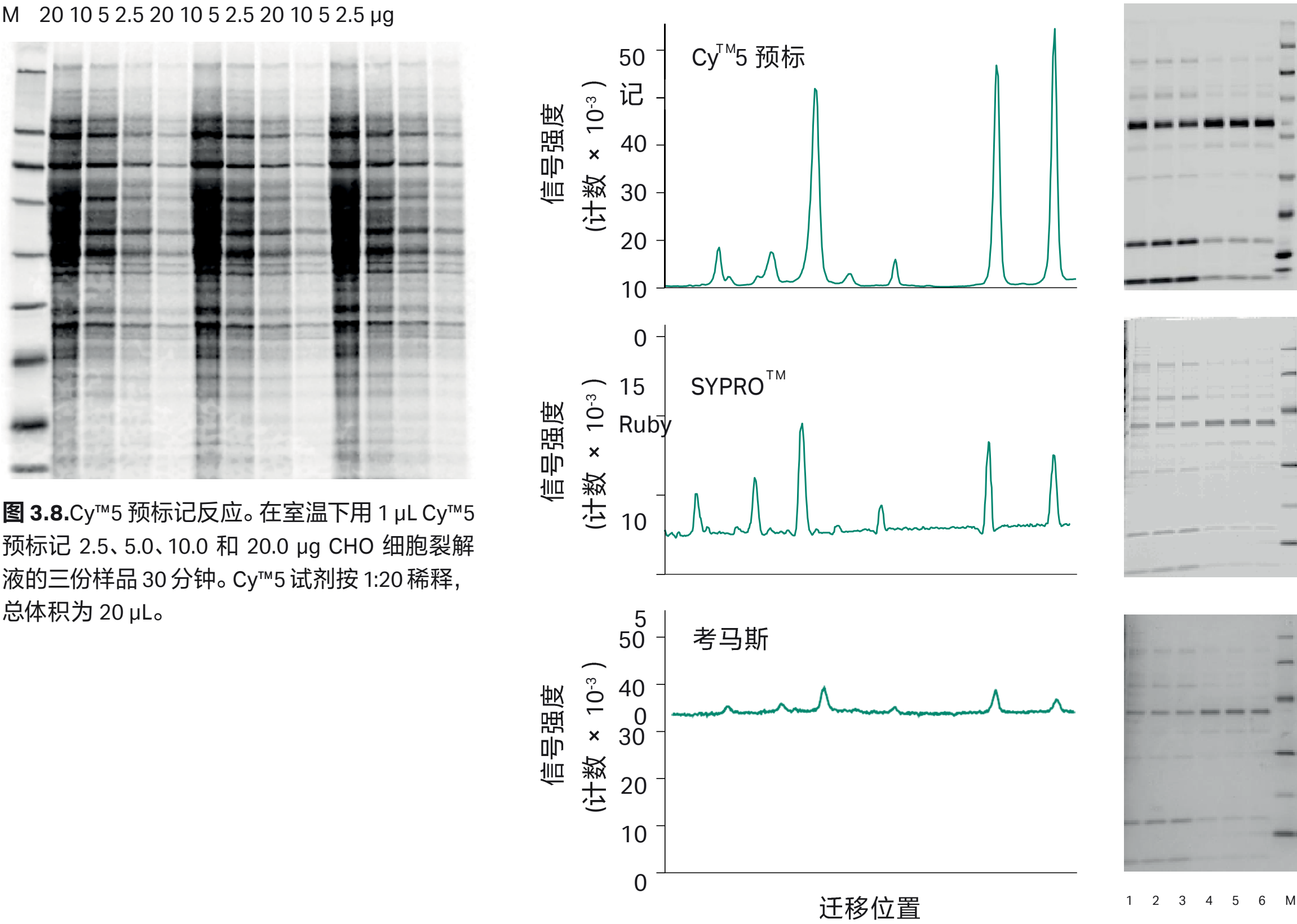


图 3.8.Cy™5 预标记反应。在室温下用 1 μL Cy™5 预标记 2.5、5.0、10.0 和 20.0 μg CHO 细胞裂解液的三份样品 30 分钟。Cy™5 试剂按 1:20 稀释，总体积为 20 μL。

表 3.6.常见蛋白质染色剂和标签的特性

蛋白质染色或标签	检测方法	检测极限	动态范围
			染色水平与浓度呈线性关系的范围
银色	密度测定、荧光成像仪	~ 1 ng	~10
考马斯蓝	密度测定、荧光成像仪	~ 10 ng	~10 ²
SYPRO™ Ruby	荧光成像仪	~ 1 至 2 ng	~10 ^{2.5}
Amersham™ Quickstain™	荧光成像仪	100pg	~10 ⁴

3.5 参考文献

1. Schagger, H. and von Jagow, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1-100 kDalton. Anal. Biochem. 166, 368–379 (1987).
2. Wiltfang, J. et al. A new multiphasic buffer system for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of proteins and peptides with molecular masses 100,000-1000, and their detection with picomolar sensitivity. Electrophoresis 12, 352–366 (1991).
3. 2-D Electrophoresis, Principles and Methods, Cytiva, 80642960.
4. Bjerneld, E. et al. Prelabeling of diverse protein samples with a fixed amount of Cy5 for SDS-PAGE analysis, Anal. Biochem. 484, 51–57 (2015).

04

转印

通过凝胶电泳分离蛋白质后，在固相载体上固定和检测蛋白质的方法，起源于斯坦福塔克大学的乔治·斯塔克实验室(1)。

蛋白质印迹法(Western blotting)一词专门用于描述蛋白质的转印和抗体对蛋白质的检测(2)。它的出现可能是仿照一种用于检测 DNA 的类似技术——DNA 印迹法(Southern blotting)，该术语以其发明者的名字命名。这一系列相关技术不断扩展，包括 RNA 印迹法(Northern blotting)、Eastern 印迹法(翻译后修饰)、蛋白质-蛋白质印迹法(Far Western blotting)和 Far Eastern 印迹法(脂质检测)。本章节只关注蛋白质印迹法(Western blotting)，主要介绍用于将蛋白质从凝胶转印到膜上的不同方法。不过，重点还是放在电转印上，因为这是目前蛋白质印迹法工作流程中最常用的方法。



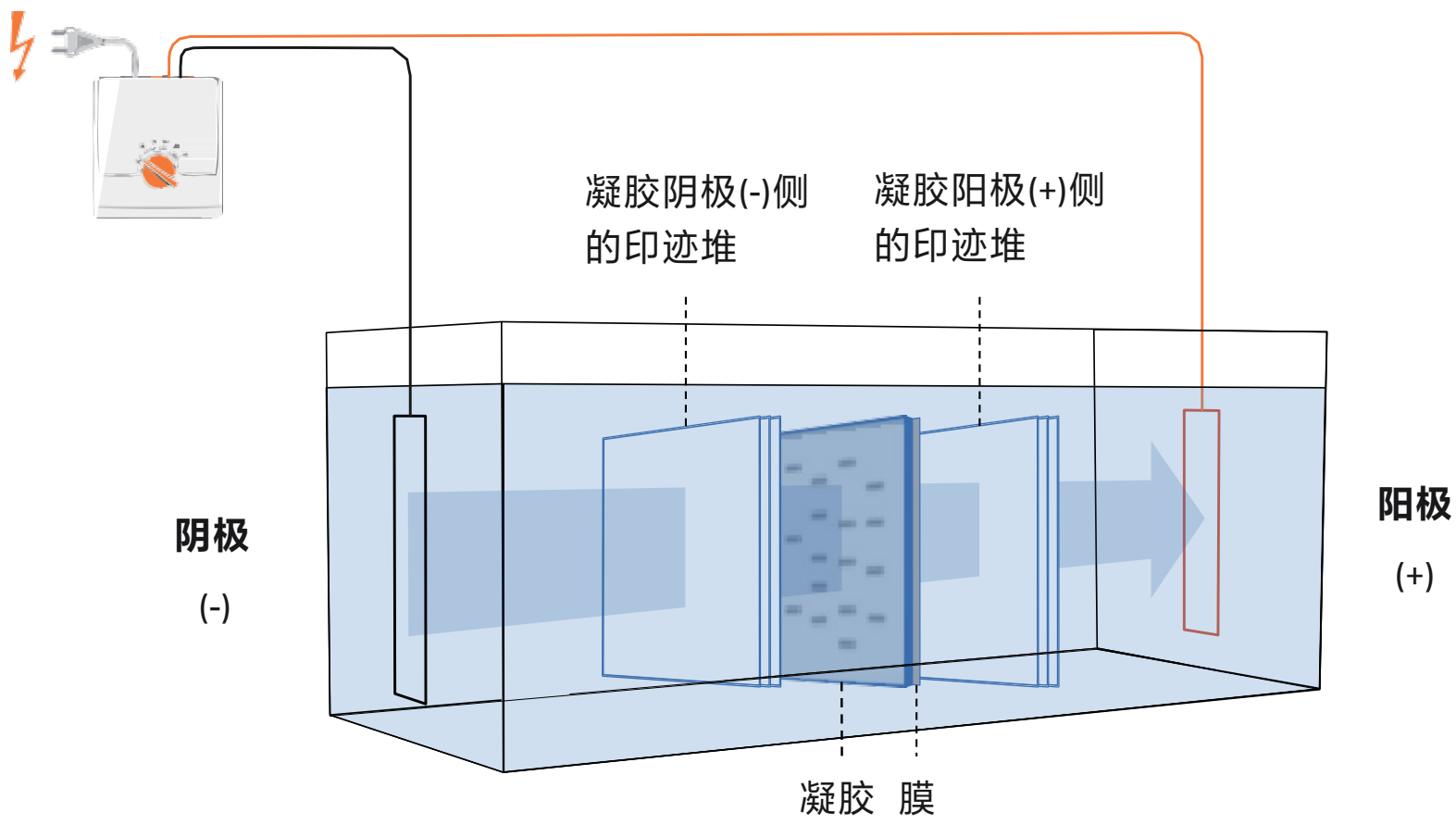
4.1 蛋白质转印

通过聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)完成蛋白质分离后，下一步是将凝胶中的蛋白质转印到固相载体膜上，此类膜通常由硝酸纤维素或聚偏氟乙烯(PVDF)等化学惰性物质制成。通过转印，可以使用特异性抗体检测膜上的蛋白质。凝胶运行电流停止时，从凝胶中转印出来的蛋白质被固定在各自的相对迁移位置上。

4.1.1 电转印

电转印因其速度快、转印均匀和效率高，在现有转印方法中占据绝对主导地位(3)。电转印所依赖的电迁移原理与 PAGE 分离过程中的蛋白质迁移原理相同。凝胶、膜和电极组装在一个夹层中，这样蛋白质就能从凝胶移动到膜上，并在膜上以完美反映蛋白质在凝胶中的迁移位置的模式被捕获(图 4.1)。

转印设置



转印后

凝胶：有效电	将凝胶上的
转印后无蛋白	蛋白质条带
质条带残留	复制到膜上

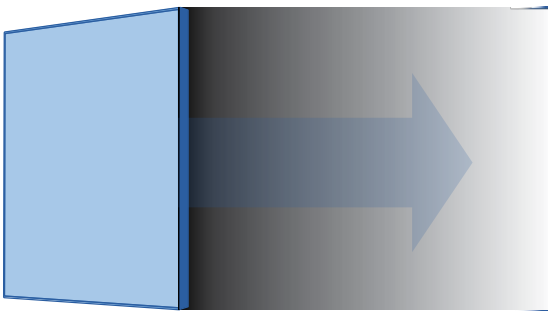


图 4.1.将凝胶上的蛋白质转印到膜上。将凝胶与膜接触，蛋白质就会在电场中向带正电的阳极(+)迁移。

4.1.1.1 全湿转印

在这种转印方式中，凝胶和膜都完全浸没在转印缓冲液中，电流从凝胶方向流向膜。一般来说，全湿转印需要冷却装置，并通过搅拌磁铁实现转印缓冲液的内部再循环。对于大型蛋白质，建议采用全湿转印，但这是一种相对较慢的技术，需要大量缓冲液。当需要获得最高质量的印迹时，应优先选择全湿转印,而不是半干法，因为前者能获得更为清晰的条带且转印效率更高。在全湿转印过程中，大多数缓冲液都会受热，温度升高可能会对蛋白质造成不可逆转的损害。因此，使用冷却缓冲液开始转印过程并保持低温非常重要。因此，许多商用全湿转印系统在连接到外部温控再循环水浴槽时，都采用了冷却线圈或陶瓷换热板等增强型设计，以实现高效冷却。另一种常见的做法是在 4°C 的环境中(如冷藏室)进行全湿转印。

全湿转印的设置如图 4.2 所示。

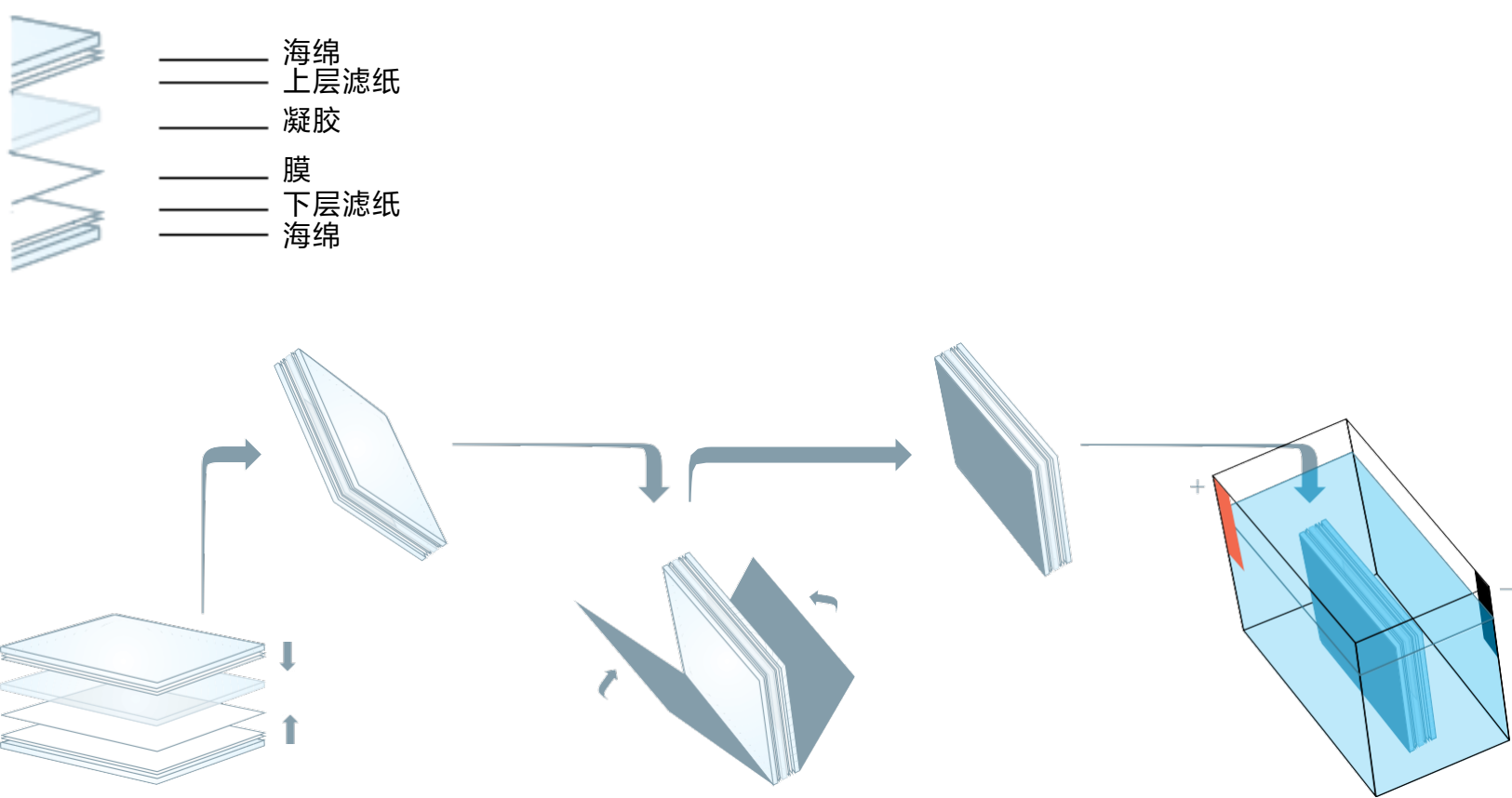


图 4.2.全湿转印系统。转印夹层的组装最好在装有转印缓冲液的槽中进行, 深度至少 3 cm。夹层安装在转印盒朝向阳极(+)的一侧，首先是一块海绵，然后是两张润湿的滤纸、所选的膜、凝胶、另外两张润湿的滤纸，最后是第二块海绵。注意避免各层之间出现褶皱、折叠或气泡。然后将该夹层牢牢固定在转印盒中，并浸没在装有转印缓冲液的电转印槽中。夹层的方向必须确保膜位于凝胶的阳极(+)侧。

4.1.1.2 半干转印

半干转印比全湿转印更快，消耗的缓冲液也更少。将膜与凝胶直接接触，并在凝胶和膜的上下放置几层浸泡在转印缓冲液中的滤纸。然后，滤纸：凝胶：膜：滤纸层被夹在两块电极板之间，并在施加电场时分别形成阳极(+)和阴极(-)。半干转印的效率通常低于全湿转印，尤其是对于大分子蛋白质而言(图 4.3)。在正常转印时间内，半干转印的升温问题较小，因为电极板会吸附热量；但如果转印时间较长，应避免使用半干转印法，因为这可能会导致设备过热，并因缓冲液耗尽而导致凝胶干燥。

应小心裁剪滤纸和滤膜，使其长度和宽度应比凝胶的长度和宽度小几毫米。这样可以确保滤纸和膜不会与凝胶重叠，造成潜在电流短路的风险，导致蛋白质转印效率低或不均匀。

 可使用开口大小与凝胶尺寸完全相同的塑料歧管来降低电流绕过滤纸层的可能性。

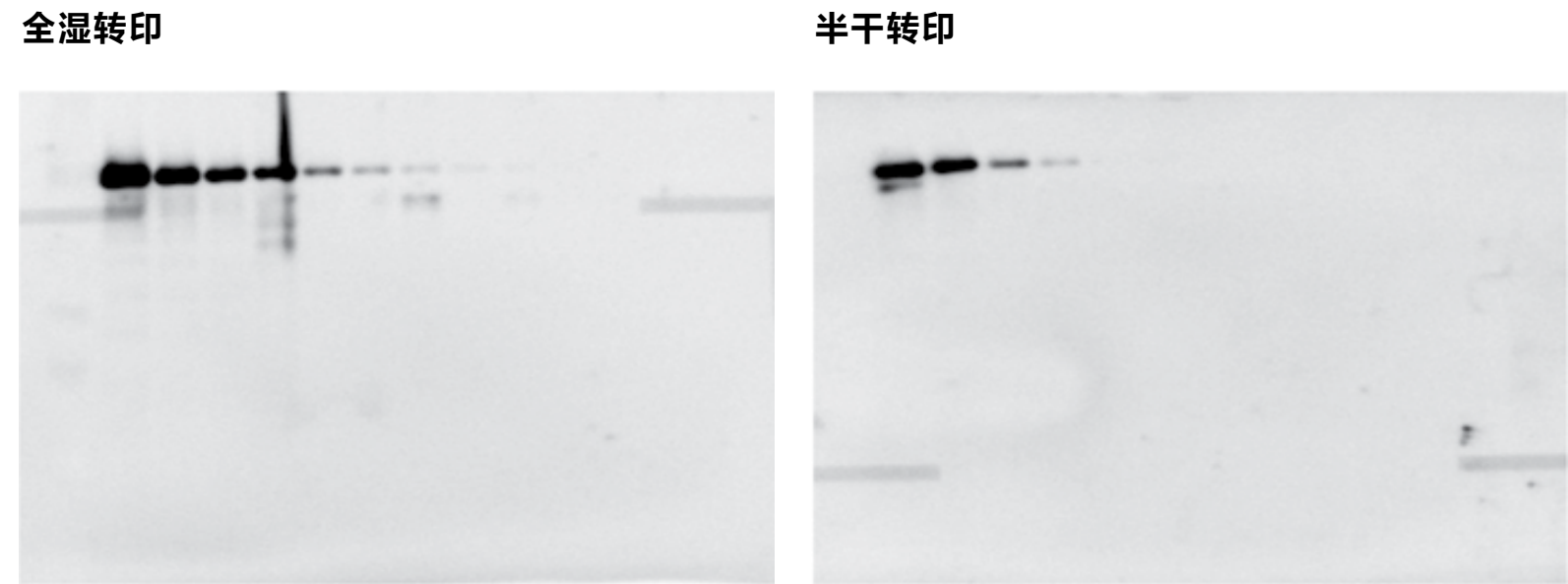


图 4.3.全湿法和半干法转印后的印迹对比。将起始浓度为 5 μg 的转铁蛋白逐步稀释两倍，然后转印到 Amersham™ Hybond™ P(现已被 Amersham™ Hybond™ P 0.45 取代)膜(PVDF)上。对于这种特殊蛋白质，半干转印的效率比全湿转印低；整个稀释系列中转印的蛋白质较少，导致灵敏度降低。

半干转印的设置如图 4.4 所示。

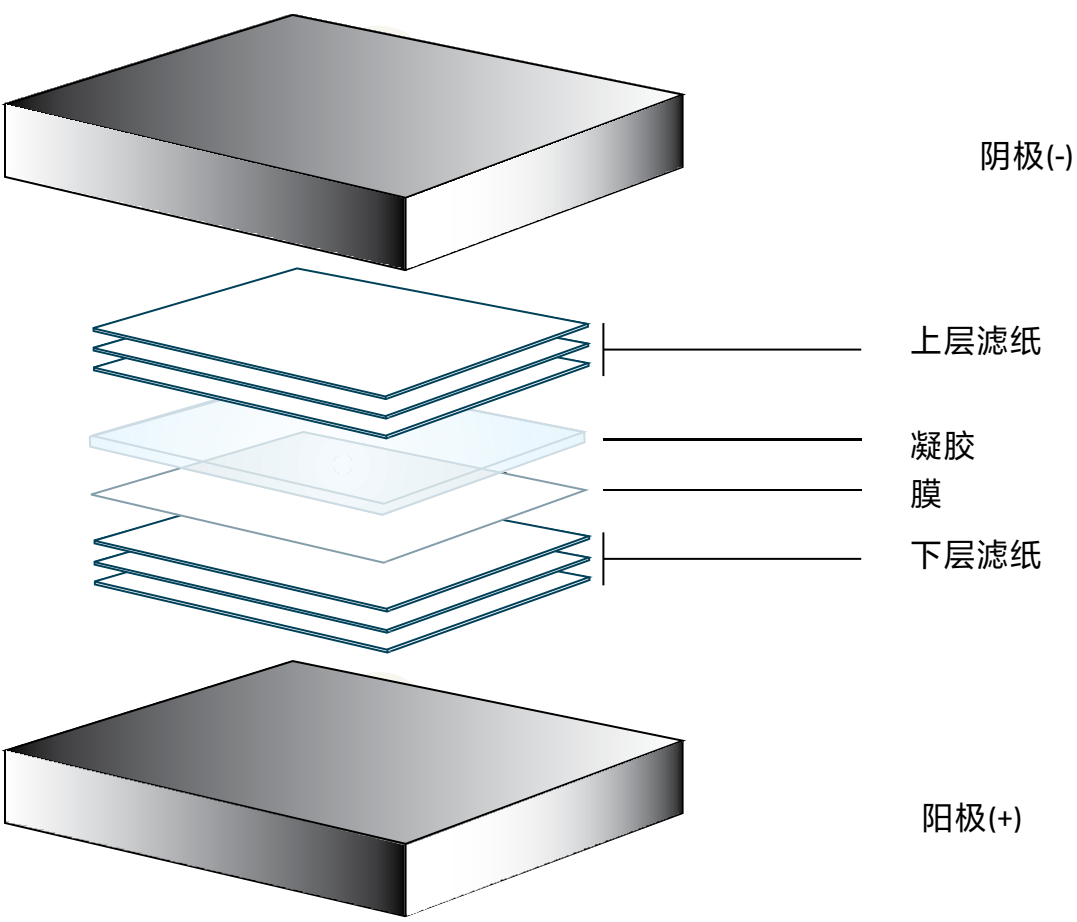


图 4.4.半干转印系统。夹层放置在下电极(阳极 [+])上。第一层至少由三张浸湿的滤纸组成, 然后是滤膜、凝胶, 最后是另外三张浸湿的滤纸。每添加一层, 都需要注意避免出现褶皱、折叠或气泡。夹层被放置并压缩在两块导电平板之间, 这两块平板同时也是阴极(-)和阳极(+). 夹层的方向必须确保膜位于凝胶的阳极(+)侧。

-  进行电转印时, 确保将膜平铺在凝胶上时不会产生气泡。气泡会导致膜上出现空白点, 蛋白质无法转印。
-  预冷却转印缓冲液, 防止产生潜在的破坏性热量。
-  在凝胶的两面都贴上一层膜, 避免因堆叠错误或电源连接错误造成的蛋白质损失。彩色标记物可帮助您确定蛋白质迁移到了哪一层膜上!
-  如果要处理较小的蛋白质, 请使用两层膜, 因为它们可以透过转印膜。

4.1.2 扩散转印

经验证, 这种方法在转印 DNA 结合蛋白时能产生高分辨率的条带(4)。扩散转印是一种非电泳转印技术, 其主要用途是从单块凝胶中获得多个印迹, 尽管其效率明显低于电转印。利用扩散转印技术最多可获得 12 个印迹, 其中包含分子量在 60 000 到 240 000 之间的蛋白质(5)。

扩散转印的另一个好处是它比较温和, 在需要保留蛋白质功能的情况下尤为适用。如果怀疑电转印过程会改变印迹蛋白的抗原性, 导致其不易被抗体检测到, 也应考虑进行扩散转印。

使用扩散印迹法时, 可能只能分析膜上转印蛋白质的有限部分, 因为这种转印方式的效率最多只有 30%。不过, 这种技术的优点是, 膜上只需存在少量蛋白质, 就能被印迹所用的高度灵敏的技术检测到。然后, 凝胶中残留的蛋白质可用于使用灵敏度较低的染色技术进行检测, 或切除用于质谱分析等操作。

4.2 转印缓冲液和运行条件

文献中描述了几种可供选择的转印缓冲液的配方, 哪种效果最佳取决于具体应用。转印缓冲液应用作可溶解蛋白质的导电介质, 不应干扰蛋白质与膜的结合。由于缓冲液的 pH 值不同, 转印方向可能会指向阴极(-)或阳极(+). 此外, 分子与膜结合的程度会受到缓冲液特性的影响, 如盐溶液的类型和浓度、甲醇浓度以及 SDS 等去垢剂的存在。

-  如果转印缓冲液和电泳缓冲液系统不同, 则应在转印前用转印缓冲液平衡凝胶, 以确保凝胶的任何膨胀或收缩现象发生在与膜接触之前。省略这一步骤可能会导致条带扭曲或分辨率降低。

大多数转印缓冲液都含有**甲醇**。要实现与膜(尤其是硝酸纤维素膜)的有效结合, 必须加入甲醇(6)。去除与蛋白质结合的 SDS 可以提高结合力。不过, 甲醇可能会导致凝胶收缩, 从而降低蛋白质的洗脱率。这种效应在转印较大的蛋白质时更为明显。因此, 在转印较大的蛋白质时, 建议使用低浓度甲醇, 并在转印前延长平衡时间。

 含有甲醇的缓冲液如果存放时间过长会变质，请在转印前添加甲醇。

 应适用分析级甲醇，低纯度甲醇含有金属杂质，会沉积在电极上。

SDS 不利于蛋白质与膜的结合，一般来说需要在转印缓冲液中平衡凝胶 15 至 30 分钟，以便在转印前去除所有多余的 SDS。不过，如果蛋白质因分子量高而仅部分不溶解，或含有过量的疏水性氨基酸，则可能需要在转印缓冲液中加入少量的 SDS(0.02% 至 0.1%)。

 如果样品洗脱速度较慢，则需要更长的转印时间。如果样品结合不充分，可尝试不同的缓冲液条件。

 乙醇可以代替甲醇，而且更加环保。

蛋白质转印最广泛使用的缓冲体系是经典的 Towbin 缓冲液(192 mM 甘氨酸、25 mM Tris、20% 甲醇 [V/V])。这种低离子强度缓冲液的 pH 值为 8.3，高于大多数蛋白质的等电点(pI)，导致带负电的蛋白质向阳极(+)迁移。在测序应用中，建议使用含有 3-(环己胺)-1-丙磺酸(CAPS)的 pH 值为 11 的缓冲液。使用这种缓冲液可以减少 Towbin 缓冲液中的甘氨酸与测序反应中的 Edman 化学反应结合使用时产生的高背景问题(7)。

一般准则是在连续缓冲液系统中使用 Towbin 缓冲液，但由于不同生产商的建议各不相同，因此应遵循每个系统提供的说明。非连续缓冲液系统与半干转印法一起使用可能有助于改善转印效果。有非连续缓冲液系统的其中一种是基于等速电泳理论 (8)。该系统使用两种浓度不同但 pH 值相同的 Tris 缓冲液作为阳极(+)缓冲液。阴极(-)缓冲液的 pH 值较低，且含有酸。阳极(+)缓冲液的作用是中和阳极(+)板表面产生的多余质子。在转印过程中，阴极(-)缓冲液中的酸通过凝胶向阳极(+)迁移，成为尾随离子。

 Towbin 和 Laemmli 缓冲液的 pH 值通常在 8.3 左右，而且绝不能用酸或碱来调节。否则会影响导电率，严重干扰实验并损坏仪器。

4.2.1 关于大小蛋白质转印的说明

转印缓冲液中 SDS 和甲醇的相对含量、蛋白质大小以及丙烯酰胺在凝胶中的比例都会影响转印效率。可以采取以下步骤来优化转印效率：

较大蛋白质($M_r > 100\,000$)

 **在凝胶中使用低浓度丙烯酰胺**

蛋白质从凝胶转印到膜的速度可能很慢，就像蛋白质在分离过程中在凝胶中的流动速度很慢一样。如果要转印较大的蛋白质，一定要在聚丙烯酰胺浓度较低的凝胶中运行样品。低密度凝胶易碎，必须小心处理。

 **多一点 SDS，少一点甲醇**

较大的蛋白质容易在凝胶中沉淀，阻碍转印。在转印缓冲液中加入最终浓度为 0.1% 的 SDS 可防止这种情况发生。此外，甲醇会减弱 SDS 与蛋白质之间的相互作用，因此将甲醇浓度降至 10% 或以下会降低沉淀的风险。

 **选择全湿转印**

.....慢慢来，例如，降低电压或电流，延长转印时间。此外，在温度为 4°C 的条件下进行转印将有助于消除产生的热量所带来的任何不必要的影响，如凝胶变形。

对于较小的蛋白质($M_r < 100\,000$)

 **去除转印缓冲液中的 SDS**

SDS 会阻碍所有蛋白质与膜的结合，但对于较小的蛋白质来说尤其如此。

 **将甲醇含量保持在 20%**

这将有助于尽可能多地去除 SDS 并提高转印效率。

4.2.2 电流和转印时间

电流和转印时间是重要参数。电流(或电压)不足以及转印时间不够可能导致蛋白质转印不完全；但转印时间过长则可能导致蛋白质流失，特别是对于直接穿过膜而不结合的较小蛋白质来说(这种现象被称为“流穿”)。过大的电流(或电压)可能会导致发热问题。

如果需要较长的转印时间，则应使用全湿转移法，因为有必要通过主动冷却来抵消不可避免的升温。半干转印不宜用于长时间转印，因为平板之间的少量缓冲液最终会变干，导致转印停止，并可能对实验本身和转印仪器造成不可逆转的损坏。一般来说，全湿转印是在恒定电压下进行的，转印过程中电流的增加会导致发热。为避免发热，请使用预冷却的转印缓冲液，并在冷藏室中进行转印。有些转印设备带有冷却模块或可与冰块一起使用。搅拌有助于在整个转印缓冲液体积中均匀分布调节温度。半干转印在 0.8 mA/cm² 的恒定电流下运行。电流过大可能会损坏实验和仪器。

4.2.3 监测和优化新型转印方法

上述全湿转印和半干转印的标准程序对大多数印迹实验都很有效，但如果某种蛋白质的转印出现问题，还可以尝试以下操作：

在转印缓冲液中加入 0.1% SDS 以增强和保持较大蛋白质的溶解度，并加入 20% 甲醇以增强对膜的吸附力。

 尝试双相转印(仅用于全湿转印)。这意味着要在低电流(1 mA/cm²)条件下进行 1 小时的首次转印，以降低转印率，延长蛋白质在膜中的停留时间。这可能会提高较小蛋白质的保留率。若要转印较大的蛋白质，可使用第二段较高的电流(3.5 至 7.5 mA/cm²)。

 转印后将凝胶染色，以确认所有蛋白质都已完全洗脱。通过加入预染色标记物的泳道，可以监测蛋白质转印到膜上的效率。此外，还可以用可逆性染色剂(如丽春红 S)对膜进行处理，以验证转印效果。

 将膜放在凝胶的阴极(-)面，以检测蛋白质(如组蛋白和核糖体蛋白)的转印，这些蛋白质在转印缓冲液中带正电荷。这种方法只有在不含 SDS 的情况下才适用，并且需要在转印缓冲液中进行较长时间的平衡，或者使用天然凝胶。该方法适用于转印 pI 值高于缓冲液 pH 值的蛋白质。

 依次放置两层膜，以捕捉通过第一层膜的较小蛋白质(流穿)。

4.3 印迹膜

除了 pH 值、盐类型、盐浓度等缓冲特性以及 SDS 等去垢剂的存在之外，分子与膜结合的程度还受到膜本身的物理和化学特性的影响。蛋白质的特性会影响其与膜表面结合的能力。要找出合适的膜，需要在不同的膜上测试特定的蛋白质。

一般来说，膜是多孔材料，孔径从 0.1 到 0.45 μm 不等。膜的结合能力主要取决于孔径大小。具有许多小孔的膜比大孔径膜具有更大的结合面，因此通常具有更高的结合能力。生物分子与膜相互作用的确切机制尚不清楚，但推测是非共价和疏水作用力的共同作用。需要注意的是，虽然蛋白质构象和缓冲液成分也会影响结合能力，但蛋白质印迹的总体灵敏度取决于固定在膜上并能被一抗识别的蛋白质量。但要注意的是，过多的蛋白质结合并不一定会改善免疫印迹的信号，甚至可能会产生相反的效果。这是因为高密度聚集的蛋白质往往会通过微弱的相互作用而不是与膜表面的相互作用进行自我结合。这就意味着，蛋白质与抗体复合物的形成是蛋白质印迹检测原理的核心，但在清洗步骤中很容易从膜上流失。

硝酸纤维素膜和 PVDF 膜是蛋白质印迹法最常用的膜，有时也会用到尼龙膜。

硝酸纤维素膜是最常用的膜，其主要优点是无论采用哪种检测方法，背景都很低。生物分子与膜相互作用的确切机制尚不清楚，但推测是非共价和疏水作用力的共同作用。请注意，在转印缓冲液中加入甲醇可提高蛋白质与硝酸纤维素膜的结合力。不建议反复剥离和再生检测硝酸纤维素膜，因为它在干燥后会变脆，难以处理。不过，通过在 Amersham™ Protran™ Supported 等膜中加入聚酯纤维支撑网，其机械强度得到了提高。

PVDF 膜具有更高的蛋白质结合能力和机械强度，是需要剥离和再生检测的蛋白质印迹应用的理想选择。由于 PVDF 膜具有高度疏水性，因此在使用前需要在甲醇或乙醇中预浸湿，以便与水溶液兼容。蛋白质通过偶极和疏水相互作用于 PVDF 膜结合。由于 PVDF 膜的蛋白质结合能力较强，因此其背景往往较高。

请务必戴手套或适用钳子处理膜，以免手指上的蛋白质污染膜体。手指接触膜造成的污渍和污染会干扰相关蛋白质的信号。

表 4.2 概述了硝酸纤维素膜和 PVDF 膜的一些最重要的特性和优点。

表 4.2.蛋白质印迹法常用膜的重要特征

膜	相互作用模式	最优固定条件	染色方法	优势
硝酸纤维素	非共价或疏水	高盐/低甲醇	氨基黑 苯胺蓝黑 丽春红S 胶体金 固绿 甲苯胺蓝	用途广泛 低背景
PVDF	偶极和疏水相互作用	与水性缓冲液一起 使用前 用甲醇预浸湿	氨基黑 印度墨汁 银色 考马斯亮蓝 丽春红S 胶体金	适用于小蛋白质 高蛋白质结合 载量 机械强度 化学稳定性

4.3.1 来自 Cytiva 的 Amersham™ Protran™ 硝酸纤维素膜

Amersham™ Protran™ 系列膜由高质量硝酸纤维素制成，纯度高达 100%。板材和卷材有三种孔径，表面积大，均匀性好。Amersham™ Protran™ 膜具有良好的结合特性，可用于蛋白质印迹法、斑点印迹检测和其他蛋白质或核酸实验。

Amersham™ Protran™ 硝酸纤维素膜的孔径为 0.1、0.2 和 0.45 μm，有多种包装规格，包括卷筒、预切片和三明治，适用于大多数应用。Amersham™ Protran™ 硝酸纤维素膜是一种用于蛋白质印迹的结合基质，对蛋白质有较高的亲和力和封闭能力，并能与一系列检测方法(如化学发光、显色、荧光)兼容。

一般来说，小肽的结合亲和力会随着孔径的减小而提高。因此，Amersham™ Protran™ 0.1 和 Amersham™ Protran™ 0.2 都是处理较小蛋白质和肽的不错选择。Amersham™ Protran™ 0.1 膜的最小孔径为 0.1 μm，对小肽(Mr < 10 000)和核酸(< 300 bp)具有极佳的结合亲和力，应用在化学发光蛋白质印迹法中产生的背景非常低。

Amersham™ Protran™ Premium(0.2 和 0.45 μm 孔径)膜对所有标记和检测系统(化学发光、荧光、比色和放射性)都具有高灵敏度、高分辨率和低背景的特点。其背景低和动态范围广的特点适用于复杂样品。

Amersham™ Protran™ Supported(0.2 和 0.45 μm 孔径)膜的惰性无纺支撑材料(聚酯纤维)两面均有硝酸纤维素涂层。支撑物不会影响转印条件或结果，但在用于再生检测时，会赋予膜卓越的处理性能。无支撑的硝酸纤维素在再生检测过程中会变脆，因此不建议用于这种应用。

Amersham™ Protran™ 膜与多种不同的染色方法兼容，如氨基黑、苯胺蓝黑、丽春红 S、胶体金、固绿和甲苯胺蓝。

4.3.2 来自 Cytiva 的 Amersham™ Hybond™ PVDF 膜

Amersham™ Hybond™(0.2 和 0.45 μm 孔径)是一种坚固耐用、化学性质稳定的膜，是剥离和再生检测的理想选择。0.2 μm 膜的孔径小，避免了流穿现象，提高了对各种不同分子量蛋白质的结合能力。这种膜与许多用于快速脱色的溶剂兼容。Amersham™ Hybond™ 应浸泡在 100% 甲醇或乙醇中，然后在超纯水或转印缓冲液中浸泡后再使用。

Amersham™ Hybond™ 0.45 具有低荧光特性，因此适用于多种荧光检测方法，如 CyDye™、红外染料和无染色凝胶技术。

Amersham™ Hybond™ LFP(0.2 μm 孔径)膜是一种疏水性 PVDF 膜，专门针对蛋白质印迹应用中的荧光检测进行了优化。它的背景荧光很低，因此灵敏度很高。该膜必须用甲醇激活， 特别推荐与 Amersham™ ECL Plex™ 检测结合使用。

Amersham™ Hybond™ SEQ(0.2 μm 孔径)膜专为蛋白质测序应用而设计。

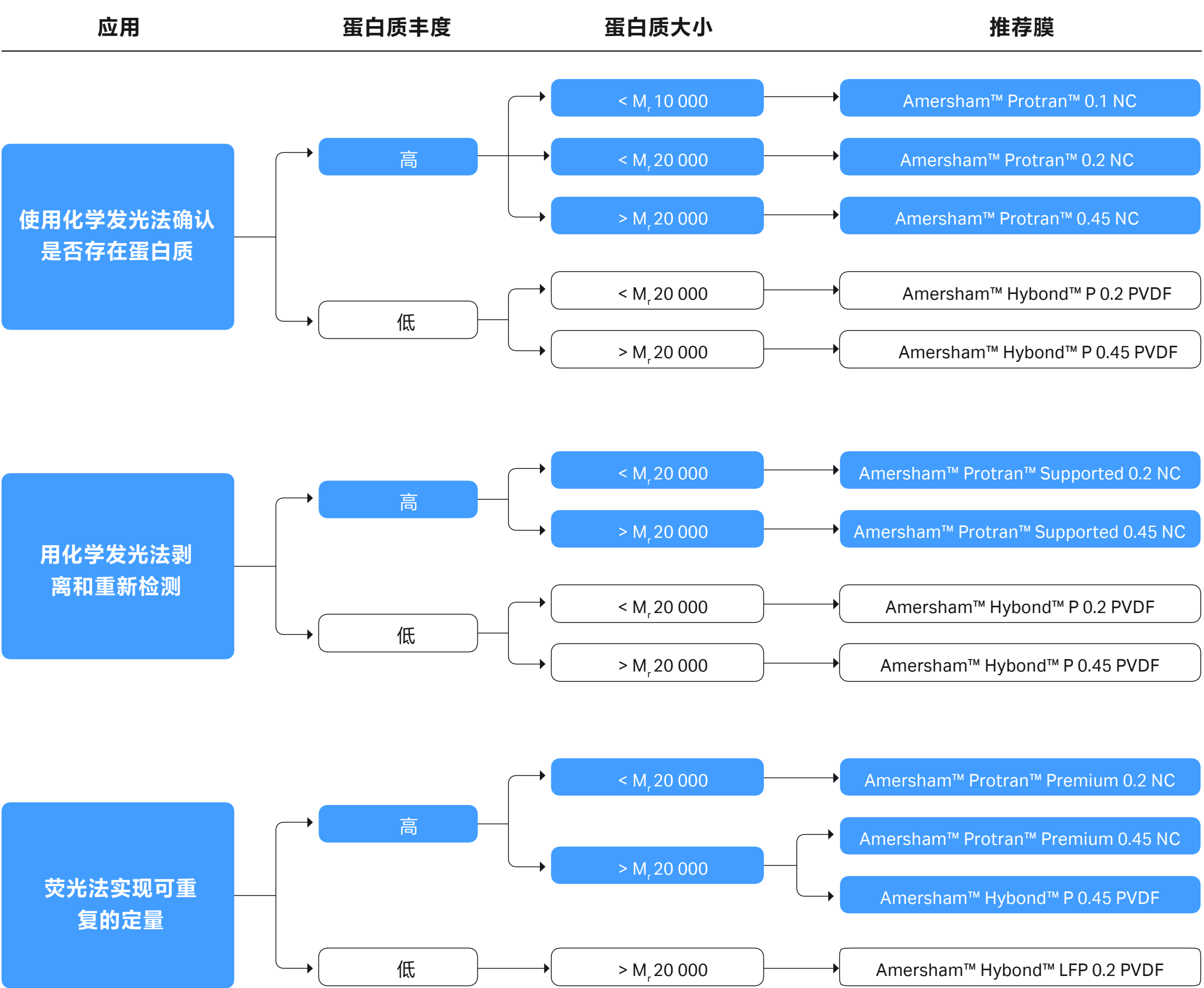
 在大多数情况下，可以用乙醇代替甲醇来制备 PVDF 膜。

 膜选择指南详见第 4.3.3 节、表 4.3 和图 4.5。

4.3.3 膜选择指南

表 4.3.适用于蛋白质印迹法的膜

	材料	孔径(pm)	物理强度	结合载量(pg/cm²)	最小蛋白质大小 (M _r)
Amersham™ Protran™	硝酸纤维素	0.1	-	>200	< 10 000
		0.2		>150	< 20 000
		0.45		> 100	> 20 000
Amersham™ Protran™ Premium	硝酸纤维素	0.2	-	>170	< 20 000
		0.45		>160	> 20 000
Amersham™ Protran™	带支持的硝酸纤维素	0.2	+	>120	< 20 000
Supported	纤维素	0.45		> 100	> 20 000
Amersham™ Hybond™ P 0.2	PVDF	0.2	+	>300	< 20 000
Amersham™ Hybond™ P 0.45	PVDF	0.45	+	>200	> 20 000
Amersham™ Hybond™ LFP 0.2	PVDF	0.2	+	>200	< 20 000
Amersham™ Hybond™ SEQ 0.2	PVD	0.2	+	> 300	< 20 000



4.4 确认蛋白质转印到膜上

电转印后，有必要确认凝胶中的所有蛋白质都已完全洗脱，没有通过或向相反方向迁移。可以通过第 3 章所述的 Cy™5 对样品进行预标记或在电转印后使用总蛋白染色法对凝胶进行染色来进行确认。使用可见(预染色)分子量标记物(如彩虹分子量标记物或 Amersham™ ECL DualVue™ 蛋白质印迹标记物)是一种非常简单方便的方法，可以检查凝胶上分子量范围内的所有蛋白质是否都转移到了膜上，因为在相似的电泳条件下，高分子量和低分子量蛋白质的迁移效率可能不同。Amersham™ ECL DualVue™ 标记物含有特殊标签蛋白，只有在化学发光检测时才会显现，使用这种标记物可确定相关蛋白质的分子量。

4.4.1 总蛋白染色剂和标记

除了检查是否完全转印外，还可使用总蛋白染色法或蛋白预标记法对特定条带的泳道进行定量比较(表 4.4)。下文列出并简要介绍了一些常用的染色法以及使用荧光染料进行蛋白质预标记的方法。

胶体金

对印迹蛋白质的高灵敏染料，检测限(LOD)低至 1 ng 蛋白质。胶体金可用于硝酸纤维素膜和 PVDF 膜。胶体金的低 pH 值可确保颗粒选择性地与膜上的蛋白质结合。使用银增强试剂可进一步增强信号。

考马斯亮蓝

考马斯亮蓝一般用于聚丙烯酰胺凝胶，但也适用于印迹膜。使用溶于 45% 甲醇和 10% 乙酸混合物中的 0.1% 考马斯染料对膜进行染色。然后使用 25% 甲醇和 10% 乙酸的混合物对背景进行脱色处理。

丽春红 S

为蛋白质印迹提供了一种快速简便的可逆染色法，但灵敏度较低，LOD 超过 250 ng 蛋白质。丽春红 S 与硝酸纤维素膜和 PVDF 膜兼容。丽春红 S 染色是一种快速简便的方法，可用于观察 PAGE 后转印到膜上的蛋白质。丽春红 S 很容易用水去除，被认为是一种“温和”的染色方法，不会干扰后续的免疫检测步骤。请注意，在结合 SDS-PAGE 使用 PVDF 膜时，必须确保转印后和在丽春红 S 溶液中孵育前用 100% 甲醇清洗膜，因为这种染色剂与 SDS 不兼容。

印度墨汁

这是一种廉价、灵敏的染色方法，不会干扰抗体与抗原的后续结合。染色前用 PBS-Tween(0.05%)封闭膜，以避免背景过高。或者，在 PBS-Tween(0.05%)中稀释，加入 1% 乙酸作为染色溶液。

氨基黑

专为快速染色膜上的蛋白质而设计。氨基黑的灵敏度与考马斯蓝相似，但染色速度更快。它是蛋白质测序和在位裂解蛋白质以确定内部序列的首选染色剂，因为温和的染色和脱色条件可将处理过程中蛋白质析出的可能性降至最低。使用 25% 的异丙醇和 10% 的乙酸可以很容易地对蛋白质进行脱色。

使用 Amersham™ Quickstain™ 进行 Cy™5 预标记

在电泳前用 Cy™5 对样品进行预标记，可在凝胶中和转印到膜上后检测蛋白质类型。用于蛋白质印迹法时，Cy™5 试剂的稀释倍数是用于 SDS-PAGE 分析时的 10 到 20 倍。进行稀释是为了避免膜上出现饱和信号，因为样品集中在膜的表面。更多详情，请参见 3.4。

表 4.4 总结了不同染色技术的优缺点。

表 4.4.用于检测膜上蛋白质的染色剂和标记

染色剂	优势	劣势	注释
胶体金	与硝酸纤维素膜和PVDF 膜兼容		对印迹蛋白质高灵敏染色剂
考马斯亮蓝	价格低廉，可重复使用	在背景脱色过程中，蛋白质可能会释放染料 蛋白质脱色的速度不同 耗费时间 动态范围相对较窄	使用热的染色和脱色溶液可缩短染色时 间 可以在脱色容器中加入吸附剂组织，这 样可以吸收染料，增加脱色步骤，缩短 脱色时间。用 0.25%的考马斯亮蓝和50%的三氯乙 酸对膜进行染色，可以提高灵敏度。
丽春红S	快速，储存稳定	灵敏度低	可用水逆转 建议用于免疫检测前染色
印度墨汁	快速、廉价的染色溶液，可在1个月内保持稳定	由于缺乏对比度，难以拍照记录	不可逆，但不干扰免疫检测
氨基黑	快速，储存稳定	膜变形的风险	不可逆 与免疫检测不兼容
Amersham™ Quickstain™	储存稳定，与硝酸纤维素膜和PVDF膜兼容		高灵敏度 有助于对目标信号进行归一化处理 无需脱色

4.5 参考文献

1. Renart, J. et al. Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76, 3116–3120 (1979).
2. Burnette, W. N. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Anal. Biochem. 112, 195–203 (1981).
3. Towbin, H. et al. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 76, 4350–4354 (1979).
4. Bowen, B. et al. The detection of DNA-binding proteins by protein blotting. Nucleic Acids Res. 8, 1–20 (1980).
5. Kurien, B. T. and Scofield, R. H. Multiple immunoblots after non-electrophoretic bidirectional transfer of a single SDS-PAGE gel with multiple antigens. J. Immunol. Methods 205, 91–94 (1997).
6. Gershoni, J.M. and Palade, G.E. Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to a positively charged membrane filter. Anal. Biochem. 124, 396–405 (1982).
7. Matsudaira, P. Sequence from Picomole Quantities of Proteins Electroblotted onto Polyvinylidene Difluoride Membranes. J. Biol. Chem. 262, 10035–10038 (1987).
8. Kyhse-Andersen, J. Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. J. Biochem. Biophys. Methods 10, 203–209 (1984).

05

抗体孵育

一旦蛋白质样本被分离并转印到膜上，就可以使用特异性抗体检测和定位目标蛋白质。通常来说，蛋白质印迹法会用到靶定目标蛋白的未标记一抗和靶定一抗恒定区的物种特异性标记二抗。二抗不仅是标签的载体，也是放大发射信号的机制，因为理论上许多二抗可以同时与一抗结合(图 5.1)。这是最大限度提高检测潜在灵敏度的最有效方法之一。因此，二抗通常是多克隆抗体，可靶定一抗框架区域上的表位；因此，其特异性仅限于物种和免疫球蛋白同种型。然后测量标记的二抗发出的信号，该信号与膜上相关蛋白质的数量成正比。

通过这种高度特异性的免疫检测，可以在复杂的样品中发现极少量的特定蛋白质。



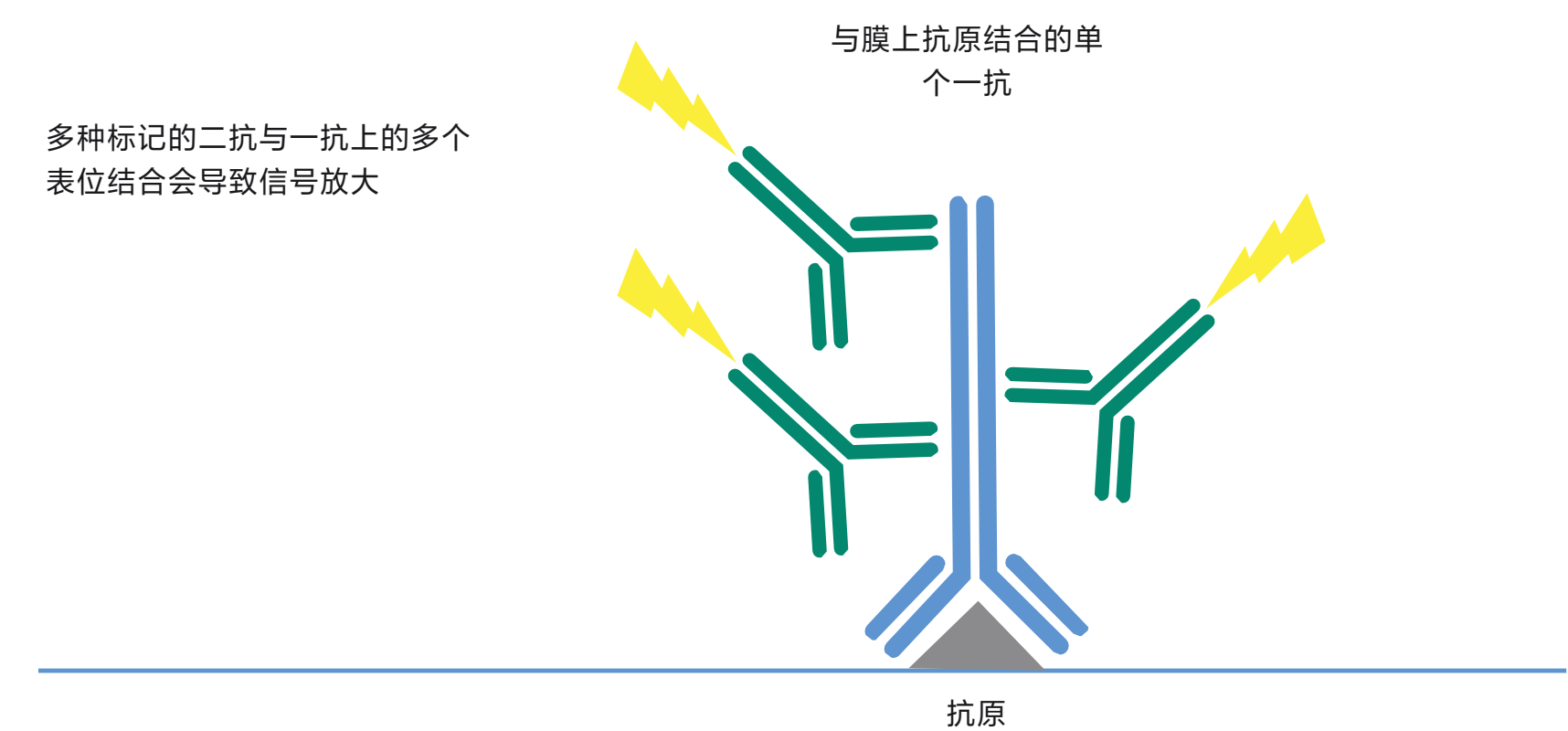


图 5.1.由于与酶或荧光基团偶联的多种二抗可与单个特异性一抗结合, 信号可被极大地放大, 从而提高蛋白质印迹法的灵敏度。

5.1 封闭

蛋白质印迹法是通过疏水相互作用将生物大分子固定在膜上。由于抗体与膜的非特异性结合不利于检测的特异性和灵敏度，因此必须“封闭”膜上尚未与蛋白质结合的部分。封闭策略的选择主要取决于样本和所用抗体。根据不同的系统，为优化封闭步骤，应考虑多种封闭剂和缓冲液。要选择封闭剂、缓冲液和最佳条件，首先应使用检测试剂生产商推荐的产品。

蛋白质和非离子去垢剂是蛋白质印迹法中常用的两大类封闭剂。

5.1.1 电转印

电转印因其速度快、转印均匀和效率高，在现有转印方法中占据绝对主导地位(3)。电转印所依赖的电迁移原理与 PAGE 分离过程中的蛋白质迁移原理相同。凝胶、膜和电极组装在一个夹层中，这样蛋白质就能从凝胶移动到膜上，并在膜上以完美反映蛋白质在凝胶中的迁移位置的模式被捕获(图 4.1)。

表 5.1.在蛋白质印迹法中用作封闭剂的蛋白质

蛋白质	推荐浓度	缓冲液	膜兼容性
BSA	0.2% 至 5% (W/V)	Tris缓冲盐溶液(TBS) /磷酸盐缓冲盐水(PBS)	硝酸纤维素PVDF
脱脂牛奶	3% 至 5% (W/V)	TBS, PBS	硝酸纤维素PVDF
Amersham™ ECL™ Prime 封闭剂(含脱脂奶)	2% 至 5% (W/V)	TBS, PBS	硝酸纤维素PVDF
酪蛋白	5% (W/V)	TBS, PBS	硝酸纤维素PVDF
鱼明胶	2% 至 10% (W/V)	TBS, PBS	硝酸纤维素PVDF

👉 请注意，不同供应商和不同批次的奶粉含量和质量各不相同。

由于每对抗体：抗原的特性不同，没有一种封闭剂是适用于所有蛋白质印迹法的最佳选择。确定最佳的封闭剂和浓度是免疫检测成功的关键步骤，因此值得在这一阶段投入时间进行开发，以优化信噪比。信噪比的测量方法是将含有目标蛋白的样品与不含目标蛋白的样品的信号进行比较。低浓度的封闭剂可能会导致高背景和信噪比降低。另一方面，过高浓度的封闭剂会掩盖抗体与抗原之间的相互作用，影响与低浓度相同。

👉 如果还 没有测试过最有效的封闭剂浓度，则应从生产商推荐的浓度开始。

👉 如果使用生物素化抗体或与伴刀豆球蛋白结合的抗体，则不应使用脱脂牛奶作为封闭剂，因为牛奶中同时含有糖蛋白和生物素，会导致信号减弱。

👉 请注意，粗蛋白制剂中可能含有磷酸酶(使蛋白质在特定氨基酸残基上去磷酸化)，因此在使用磷酸化特异性抗体检测磷酸化蛋白质时不适合将其作为封闭剂。如果磷酸化蛋白是目标蛋白质，则应在封闭溶液中加入磷酸酶抑制剂 (1)。此外，由于 PBS 中的磷酸盐会干扰并减少磷酸化特异性抗体的结合(见 5.1.3)，建议使用 TBS 作为稀释封闭剂的缓冲液。脱脂牛奶不应作为检测磷酸化蛋白的封闭剂，因为牛奶中含有酪蛋白(因此也含有磷酸表位)，会干扰抗磷酸酪氨抗体，导致背景信号增加。

以下列出的基于蛋白质的封闭溶液可用作优化基于增强化学发光(ECL™)的蛋白质印迹法检测。

Amersham™ ECL™ 封闭剂：这种封闭剂工作效率高，结果质量高，因此封闭时间更短。用于封闭与 Amersham™ ECL™ 系列检测试剂配合使用的 Amersham™ Protran™ 硝酸纤维素膜和 Amersham™ Hybond™ PVDF 膜。将膜浸泡在 PBS 或 TBS Tween™ (通常 0.1% 即可) 中 5%(w/v) 的封闭剂溶液中 1 小时，室温下放置在轨道摇床中，然后进行清洗。具体操作方法请参考该网站。

含 Tween-20 的干奶粉：奶粉和 Tween-20 的组合物价格低廉，通常在含有 0.1% Tween-20 的 PBS 中加入 5% 的奶粉。这种制剂可以获得非常干净的背景，但必须注意避免掩盖某些抗原。这种制剂是基于 ECL™ 的蛋白质印迹法检测中常用的封闭剂。

干奶粉：一种常见的封闭剂。干奶粉价格低廉，通常能提供非常干净的背景。干奶溶液通常以 5% 的浓度在 PBS 或 TBS 中配制。溶液会迅速变质，而且会掩盖某些抗原。将浓度降低到 1%，可以改善检测到的信号。

鱼明胶：鱼明胶与哺乳动物明胶相比，氢结合氨基酸基团较少，因此背景往往较低。鱼明胶的使用浓度通常为 2%，易于溶解，可在 40℃ 温度下使用而不会胶化。不过，它可能会掩盖某些蛋白质，并含有一些竞争性反应物，如生物素。鱼明胶也相对昂贵。

BSA：BSA 的价格相对较低，可以从特定的检测目标蛋白中得到最佳信号。它通常在 PBS 或 TBS (含或不含 0.1% 吐温-20) 中以 0.3% 至 3% 的浓度使用。如果使用靶定磷酸化蛋白的抗体进行探测，建议使用浓度为 2% 的 BSA。

血清：马血清或胎牛血清常用浓度为 10%、通常在含 0.02% 叠氮化钠的溶液中使用。这种封闭溶液价格昂贵，而且可能含有潜在的交叉反应免疫球蛋白。

无蛋白封闭剂：聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 是一种非蛋白质封闭缓冲液，可用于检测小分子蛋白质。PVP 是一种水溶性聚合物，可与硝酸纤维素膜和 PVDF 膜结合。PVP 的使用浓度一般为 0.5-2%，通常与纯化的酪蛋白或其他封闭剂结合使用。

5.1.2 用去垢剂做封闭剂

去垢剂可抑制蛋白质与膜的非特异性疏水结合 (表 5.2)。它们被认为是非永久性封闭剂，因为它们不会附着在膜上，只需简单的清洗步骤即可去除。通常使用 Tween-20 溶液，但也可考虑使用十二烷基硫酸钠 (SDS) 或 NP40 等替代品，它们对消除强背景信号特别有用。将去垢剂作为封闭剂使用时，通常需要搭配蛋白质封闭剂。

表 5.2.在蛋白质印迹法中用作封闭剂的去垢剂

去垢剂	推荐浓度	缓冲液	膜相容性
SDS	0.02% 至 0.05%(W/V)	TBS, PBS	硝酸纤维素 PVDF
Tween-20	0.05% 至 0.1%(V/V)	TBS, PBS	硝酸纤维素 PVDF
NP40	0.02% 至 0.05%(V/V)	TBS, PBS	硝酸纤维素 PVDF

5.1.3 适用于封闭剂的缓冲液

PBS 或 TBS 通常用作封闭剂的缓冲液。并非所有封闭缓冲液都能与每种封闭剂兼容。例如，在使用与碱性磷酸酶 (AP) 偶联的二抗时，应选用 TBS 中的封闭剂，因为 PBS 会干扰酶的活性。在检测磷酸化的目标蛋白时，TBS 缓冲液也比 PBS 缓冲液更好，因为一抗可能会争夺目标蛋白上和缓冲液中的磷酸盐。

5.1.4 时间与温度

将印迹膜浸泡在新鲜制备的封闭剂中 10 分钟至 2 小时，同时在室温下不断搅拌。还可以将膜在温度为 37℃ 的条件下浸泡 1 小时或在温度为 4℃ 的条件下浸泡整夜，同样有助于解决持续存在的背景问题。室温下的封闭时间不应超过 2 小时，否则有可能出现染色伪影和高背景等问题。如果需要延长封闭时间，则应在温度为 4℃ 的条件下进行。

5.2 一抗和二抗探测

在封闭步骤之后，可以使用抗体检测相关蛋白质。靶定目标蛋白质的一抗可以是被标记过的，也可以是未标记的。为了最大限度地提高灵敏度和信噪比，大多数蛋白质印迹法都使用未标记的一抗，这种一抗能被标记过的二抗特异性识别。根据所用检测系统的类型，二抗将产生信号，并可通过化学发光、化学荧光、显色、荧光或放射性标记法进行量化。

尽管有时需要针对新发现或罕见的靶点培育一抗，但市场上已有大量抗体可供选择。可能有几种抗体对您的目标蛋白具有特异性。

在选择一抗时，应考虑几个因素：

- 1. 抗体的选择取决于相关蛋白质的折叠方式，因为不同的表位在不同的条件下会被暴露出来。
- 2. 用变性抗原进行免疫处理的动物，可产生识别隐藏在蛋白质结构中的内部表位的抗体。在使用变性蛋白质的蛋白质印迹法系统中，使用这种抗体应能获得最佳效果
- 3. 如果相关蛋白质是原生形态，则必须识别位于蛋白质表面的表位。在这种类型的应用中，如果使用天然抗原进行免疫，那么便能取得很好的效果。

- 👉 如果购买的是市售的一抗，请确保该抗体已根据生产商的要求进行了蛋白质印迹法应用验证。
- 👉 重复使用一抗溶液以减少消耗，但要确保其保存条件不仅能维持其活性，同时能够防止细菌污染。使用干净的试管，不用时冷藏保存，培养膜时使用干净的箱盒。
- 👉 在较小的箱中孵育膜可以减少一抗的消耗。如果感兴趣的蛋白质特征明确，即已知分子量和蛋白质预计在膜上迁移的位置，则可在转印后将膜适当切割成较小尺寸。
- 👉 可在膜上孵育单个泳道(而不是切割条带)的印迹歧管适用于筛选抗体，所需的溶液体积也较小。

单克隆和多克隆抗体均可用于蛋白质印迹法分析 (图 5.2)。两种类型的抗体各有优缺点。虽然多克隆抗体的灵敏度更高，但其特异性却不如单克隆抗体。相反，单克隆抗体往往特异性更好，但灵敏度较低。选择多克隆抗体通常是因为其价格相对较低。单克隆抗体只与一种表位结合，通常具有高度特异性、纯度高、性能稳定等特点，一般背景较低。粗抗体制剂，如血清 (多克隆抗体) 或腹水 (单克隆抗体) 有时也用于蛋白质印迹法，但杂质会增加背景。为了提高信噪比，可以使用固定抗原或固定蛋白 A 或蛋白 G 对抗体进行亲和纯化。抗体亲和纯化主要基于蛋白 A 和 G 对各种物种的 IgG 的 Fc 区域具有高亲和力和特异性。蛋白 A 和 G 已被固定在几种不同的基质上，是从腹水、细胞培养上清液和血清中分离 IgG 和 IgG 亚类的理想方法。

Cytiva 提供用于抗体纯化的层析填料，包括即用型 HiTrap™ Protein A/HiTrap™ Protein G HP 层析柱。层析柱分别预填 Protein A- 或 Protein G Sepharose™ 高效层析填料。这些填料的设计非常适合使用注射器、泵或层析系统快速方便地纯化各种来源的抗体。还可提供其他规格的层析柱，如离心层析柱和重力流层析柱。有关抗体纯化的信息和全部产品列表，请参见亲和层析手册Vol. 1：抗体，18103746。

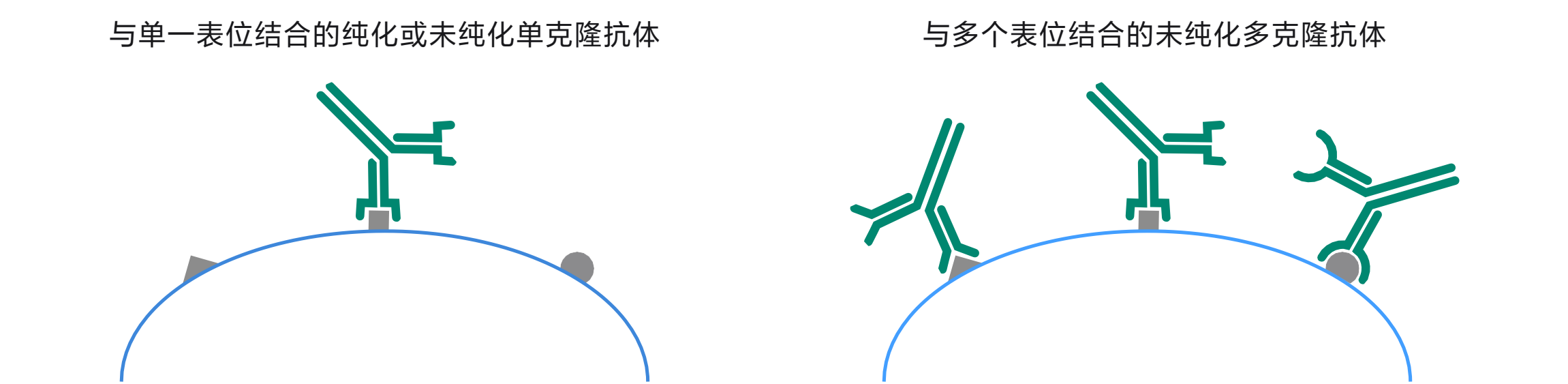


图 5.2. 单克隆抗体只与抗原上的单个特异性表位结合，而多克隆抗体往往由对多个表位具有特异性的混合物组成。可以通过亲和纯化目标蛋白质的片段来提高多克隆抗体的特异性。另外，也可以在免疫阶段通过使用工程化处理或截短的免疫原来影响抗体反应的特异性。在这些免疫原中，只有所需的目标表位才会暴露出来。

一抗的特异性需要有多高？一抗所需的特异性水平取决于所要检测的蛋白质片段。例如，如果要检测跨膜受体与生长因子结合的结构域，就需要针对该蛋白质的细胞外结构与制备抗体。另一方面，研究从受体到第二信使的构象依赖性信号转导需要针对受体胞内结构域特定目标片段的抗体。此外，在检测特定的磷酸化氨基酸残基等应用中，高特异性也至关重要，因此可能需要使用单克隆一抗。

此外，了解对不同物种蛋白质的相似性将有助于确定能否针对研究物种以外的其他物种的蛋白质培育出一抗。使用针对其他哺乳动物相同蛋白质的抗体，可以检测人类样本中的高保守蛋白，如胰岛素。此外，小鼠和大鼠的许多蛋白质高度相似。不过，一般来说，在实际可行的情况下，所培育的一抗应针对与研究对象相同物种的蛋白质。此外，还要注意生成抗体的物种。在同一膜上使用另一种一抗结合不同的蛋白质进行多重检测时，这一点尤为重要。在这种情况下，必须在不同的动物物种中生成一抗，这样才能被具有物种特异性的二抗识别。

 应尽可能在与样本物种不同的物种中培育一抗。例如，针对小鼠蛋白质的一抗最好用兔子而不是大鼠来培育。

在选择一抗时，必须优化聚集产生的浓度，以获得最佳结果。一抗浓度过高是导致结果不佳的常见原因，如背景高、非特异性条带或信号强度过大。一般来说，高灵敏度的化学发光检测系统 (如 Amersham™ ECL™ Prime 和 Amersham™ ECL Select™) 所需的抗体浓度较低。减少一抗的消耗可降低成本，在抗体稀缺或昂贵的情况下尤为有利。按照生产商的建议浓缩一抗是向着正确方向迈出的第一步。不同抗体批次之间的性能差异通常不大，通常只需进行一个滴定系列实验即可。然而，血清中的多克隆抗体浓度会因动物而异，或因血液采样而异。在这种情况下，或当观察到结果发生变化时，应再进行一次滴定系列实验。

另一个重要因素是一抗的孵育温度。温度越高，结合率越高，包括特异性结合 (增加信号) 和非特异性结合 (增加背景)。一般建议在室温下放置 1 小时或在 4°C 下放置整晚。通常在清洗缓冲液 (PBS 或 TBS) 中稀释抗体。如果遇到高背景问题，可在抗体溶液中加入 BSA 或脱脂奶等封闭剂和低浓度去垢剂，如 0.05% 至 0.1% V/V Tween-20 或 0.02% 至 0.05% w/v SDS。在选择稀释抗体的溶液时，必须确保能够维持抗体的生物活性：请务必遵循生产商的建议！

 附录中提供了更多关于如何改进蛋白质印迹法的指南。

5.2.1.1 清洗步骤

在一抗探测后，有必要对膜进行清洗，以去除可能导致高背景和低信噪比的多余抗体。通常使用低浓度去垢剂溶液，如 PBS 或 TBS 中 0.05% 至 0.1% 的 Tween-20 进行清洗，尤其是在用高浓度抗体溶液或粗提物孵育之后。PBS-Tween 溶液适用于大多数清洗应用。不过，在目标蛋白磷酸化的情况下，最好使用 TBS-Tween 溶液，因为 PBS 中的磷酸盐可能会干扰抗体的结合。

 请注意，去垢剂过多会导致目标蛋白质从膜上洗脱，导致信号减弱或消失。对于单克隆或高度纯化的多克隆抗体，最好使用不含去垢剂的清洗缓冲液。应根据经验确定优化信噪比所需的清洗次数。清洗不充分会导致背景过高，而过度清洗可能会导致抗体洗脱和信号降低。

 应按照工艺中使用的检测试剂的生产商推荐的方式进行清洗。一般情况下，应用每平方厘米膜 4 mL 清洗缓冲液的量至少进行三次洗涤 (5 min/次)，并不断搅拌。

5.2.2 二抗

市场上有多种二抗可供选择，选择哪种二抗首先取决于生成一抗的物种。例如，如果一抗是由山羊 IgG 同种型生成的抗体，那么二抗必须是由其他物种生成的抗山羊 IgG 的抗体，因为它将与一抗的 Fc 区域结合。虽然没有严格的规定，但在某些宿主物种中生成的二抗可能会导致高背景水平。在这种情况下，可能需要改变二抗的来源物种。

二抗溶液和膜的孵育过程与一抗基本相似。

 稀释比例从 1:100 到 1:500 000 不等，请务必遵循生产商的说明。为获得高质量的结果，建议优化二抗浓度。Amersham™ ECL™ Prime 和 Amersham™ ECL Select™ 等高灵敏度化学发光系统与其他检测系统相比所需的抗体量通常较少 (见附录)。

5.2.2.1 标记抗体的选择

在选择二抗时，必须考虑选择最适合蛋白质印迹法应用的检测系统。二抗可以使用试剂盒进行标记，这样就可以根据使用的蛋白质印迹法系统将抗体用于不同的检测方法。另一种解决方案是使用市面上经过优化的标记二抗，能够覆盖大多数应用。

 抗体的 Fab 或 F(ab')₂ 片段也有标记或未标记的形式。在必须消除抗体的 Fc 部分与蛋白样品复合物中存在的 Fc 受体之间的结合的检测中，这些片段尤其有用。

酶：碱性磷酸酶 (AP) 和辣根过氧化物酶 (HRP) 是蛋白质印迹法中最常用的两种检测蛋白质的酶。两者都可与化学发光、化学荧光或显色底物一起使用。AP 的优点是反应速率能够保持线性，因此可以通过延长与底物的孵育时间来提高灵敏度。然而，延长孵育时间往往会导致背景升高，从而导致信噪比降低。由于底物特异性非常高，HRP 的背景通常较低。在这两种酶中，首选 HRP，因为它活性高、稳定性好、价格低廉且适用的底物范围更广 (表 5.3)。

表 5.3.AP 和 HRP 作为二抗偶联物的一些主要特点

	AP	HRP
分子量(Mr)	140 000	40 000
目录价	高	低
稳定性	0°C 以下不稳定	0°C 以下稳定
底物数量	少	多
动力学	慢	快
最优 pH	8 至 10	5 至 7

荧光基团：荧光检测具有灵敏度高、可在较宽的蛋白质数量线性动态范围内进行检测以及信号稳定等优点，因此比较适用于定量检测法。

Amersham™ ECL Plex™：由于荧光基团的光谱分辨率高，使用 Amersham™ ECL Plex™ 可同时检测一种以上的蛋白质 (多重检测)。多重检测技术可同时检测相关蛋白和管家蛋白等，而无需剥离和重新检测膜。这种技术能够获得更可靠的定量结果。此外，信号的稳定性可以持续长达 3 个月，这为进行更大规模的实验系列以及更广泛、精确的定量分析奠定了基础。Amersham™ ECL Plex™ 的多重检测功能尤其适用于检测分子量相近的目标蛋白质。例如，在检测同一蛋白质的磷酸化和非磷酸化异构体时，由于检测通道之间的串扰极小 (见 6.2.1)，因此无论相对强度如何，都能对信号进行量化。另一种多重检测法是用一种荧光基团 (Cy™₅) 预标记样品，然后用 Cy™₃ 标记的二抗探测目标蛋白质。这样就能对整个蛋白质群进行可靠的归一化处理，并消除了在某些情况下管家蛋白可能出现表达偏差的不确定性。

Amersham™ CyDye™ 700 和 800：Amersham™ CyDye™ 700 和 800 二抗被发射光波长在 700 nm 和 800 nm 之间的近红外 (NIR) 荧光基团标记过。多重近红外荧光标记可准确识别和量化分子量相似的蛋白质，这对研究蛋白质磷酸化非常有用。使用 NIR 染料偶联抗体进行检测时，操作简便、信噪比高，且结果可重现。

生物素化二抗：通过使用生物素化抗体，可以使用生物素/链霉亲和素两步法系统来增加蛋白质印迹的信号强度，从而可以检测出低丰度靶点。这个三层系统应用了生物素标记的二抗。随后，可使用链霉亲和素/抗生物素蛋白标记的染料、荧光基团、放射性同位素或酶，使生物素与链霉亲和素/抗生物素蛋白之间产生不可逆的相互作用 (图 5.3)。此外，多个生物素分子可与抗体偶联，进而让多个链霉亲和素分子之间产生相互作用，放大信号并提高相关蛋白质的检测灵敏度。使用荧光三层蛋白质印迹法放大信号的示例见 9.2.5。

HRP 偶联链霉亲和素

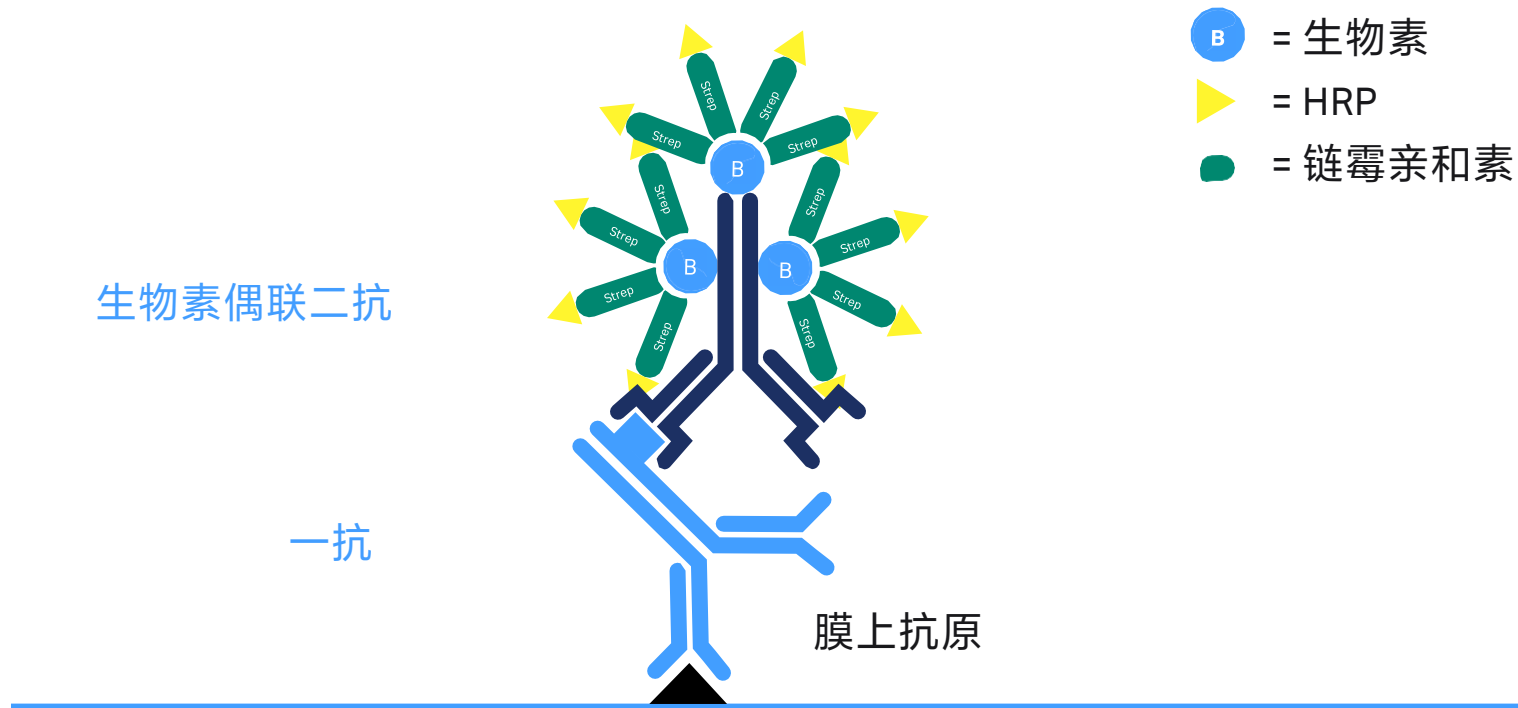


图 5.3. 链霉亲和素与生物素的结合力非常强。通过将链霉亲和素与 HRP 偶联, 可以利用这种相互作用来检测膜固定的抗原。如果每个二抗上附有多个生物素分子, 则每个生物素上的多个链霉亲和素分子的放大效果会进一步增强。

胶体金标记抗体: 胶体金颗粒可附在链霉亲和素或二抗上。此类颗粒带负电, 与膜的结合力很弱。蛋白质的特异性标记是通过疏水和离子相互作用实现的。通过胶体金颗粒的累积, 蛋白质会被染成暗红色。如果与银强化试剂一起使用, 效果可进一步增强 10 到 100 倍。AuroProbe 适用于由硝酸纤维素或 PVDF 等材料制成的带负电的膜。处理膜片时应戴上手套并使用钳子, 以避免弄花膜体。

放射性同位素: 放射性同位素偶联抗体已被广泛使用, 但其价格昂贵, 保存期有限, 需要特殊的废液处理和处置措施, 并要求安全、专业的工作环境。因此, 实际应用种通常使用酶和荧光基团等标记蛋白质。

5.3 剥离和再生检测膜

使用荧光基团标记的二抗同时检测一种以上的蛋白质已成为一种普遍做法。像 CyDyes™ 这样的多种荧光基团, 覆盖了 RGB 和 NIR 范围, 提供了丰富的多重检测机会。如果在进行定量分析时无法使用荧光复用技术, 那么另一种方法就是进行剥离和重新检测, 这样就能在同一张膜上检测到一种以上的蛋白质。不过, 这也有可能造成膜中总蛋白质的流失。剥离和重新检测法可以在同一个印迹上重新用不同的一抗进行检测, 节省了时间和样品量。不过, 剥离过程会导致膜上的蛋白质释放, 从而降低灵敏度。因此, 使用条件在确保抗体从抗原中释放出来的同时, 应尽量减少与膜结合的蛋白质样品的洗脱。

通过综合使用去垢剂、还原剂、加热和/或低 pH 值, 通常可以测出能够达成所需结果的使用条件。在以下章节中, 我们将讨论选择最适合蛋白质印迹的剥离和重新检测方法时的要点。注意, 抗体孵育前可能需要重新封闭。

除了剥离和重新检测外, 还可以使用荧光基团标记的二抗同时检测一种以上的蛋白质, 见 5.2.2.1。

5.3.1 通过加热和去垢剂进行剥离

在使用基于化学发光的蛋白质印迹检测试剂时, 已成功通过加热和去污剂(2)对膜进行了剥离 (详细步骤见第 11 章)。使用含有 2% SDS 和 100 mM β-巯基乙醇的 62.5 mM Tris-HCl(pH 6.8) 溶液在 70°C 的条件下剥离预清洗膜, 时间为 30 分钟。较低的温度 (50°C 至 70°C) 也可能有效, 但应基于经验决定所使用的抗体 (见 5.3.2)。

5.3.2 优化膜剥离的策略

首先要考虑的参数是温度。如果有足够量的纯蛋白, 可通过斑点印迹法确定最佳剥离温度, 然后再进一步操作。不过, 如果蛋白质数量有限, 可进行蛋白质印迹法, 将膜切成条状。随后, 在 50°C 的条件下进行剥离, 再用二抗重新检测膜的效率 (见 11.8)。如果发现在这些条件下膜的剥离不够充分, 可将温度升高 5°C, 然后重复该步骤。这一优化步骤应有助于确定剥离抗体的最佳条件, 同时最大限度地减少膜上目标蛋白的损失。

除温度外, 抗体亲和力和目标蛋白质的丰度也至关重要。图 5.4 展现了四种剥离策略。

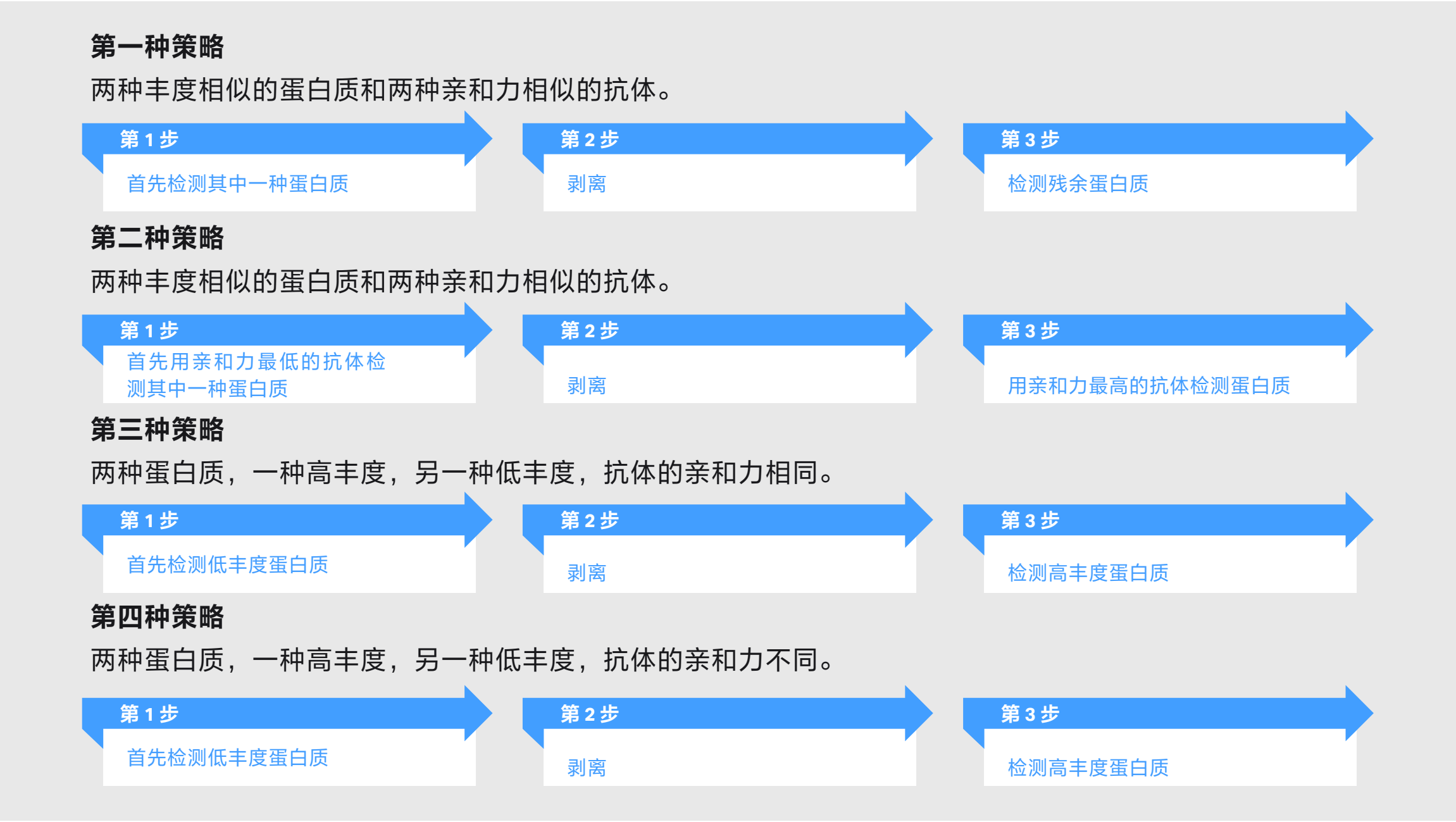


图 5.4. 优化膜剥离的策略

在第一种策略中，如果每种蛋白质的抗体亲和力和丰度大致相同，那么先检测哪种蛋白质并不重要。

第二种策略强调了先用亲和力最低的抗体检测丰度相似的蛋白质的重要性。这种策略可确保先进行强度较低的剥离，从而大大提高在剥离前后检测到两种蛋白质的几率。

第三种策略表明，如果使用的一抗亲和力相同，首先检测丰度最低的蛋白质非常重要。

第四种策略更难评估。一般来说，最好先检测丰度最低的蛋白质，因为目标蛋白质的损失可能对检测蛋白质的能力影响最大。

5.3.3 通过低 pH 值进行剥离

如果使用加热和去垢剂剥离的结果不尽如人意，另一种方法是使用 pH 值为 2.0 的 25 mM 甘氨酸-HCl 溶液搭配 1%的 SDS (见 11.8.2) 对膜进行剥离。膜应在剥离液中浸泡约 30 分钟，并不断搅拌。应采用与通过加热和去垢剂进行剥离相同的方法来确认该技术的效率。如果剥离不彻底，增加在剥离液中的孵育时间有助于去除抗体，但也有可能洗脱出相关蛋白质。

因此，建议在酸性剥离液中的孵育时间不要超过 1 小时。

对于化学发光应用，您也可以尝试使用温和的方法剥离您的膜 (Amersham™ Protran™ Premium 0.2 和 0.45 硝酸纤维素或 Amersham™ Hybond™ 0.2 和 0.45 PVDF)，方法是室温下在 0.2 M 甘氨酸 (pH 2.8) 中孵育 30 分钟，然后在 TBS-Tween 或 PBS-Tween 中清洗两次，每次 10 分钟。然后进行封闭和免疫检测。

5.3.4 通过高 pH 值进行剥离

如果第一次探测后仍有持续的信号，可通过将膜浸泡在高 pH 值的溶液中进行剥离实现补救。通常在 0.2 M NaOH 中孵育两次，每次 5 分钟，然后用水冲洗 5 分钟即可。如果仍有信号残留，可将 NaOH 浓度提高到 2 M，孵育时间延长至 30 分钟。使用 NaOH 剥离后通常无需再次封闭。不过，根据 NaOH 浓度和浸泡时间的不同，可能有必要在重新检测前再次封闭膜。

5.3.5 通过高浓度盐溶液行剥离

如果在剥离膜时出现问题，高浓度盐溶液是另一种有效的解决方法。将膜浸泡在添加了 0.5 M NaCl 和 0.2% SDS 的 PBS 或 TBS 缓冲液中 30 分钟至 2 小时。然后用水冲洗。使用盐溶液进行剥离后，通常不需要再次封闭。不过，根据浸泡时间的长短，在重新检测之前可能需要再次封闭膜。

5.3.6 提示和技巧

为了节省剥离时间，可使用 ECL™ 进行连续探测，以快速检测膜上的第二种相关蛋白质。用 ECL™ 检测第一个目标蛋白质后，使用过氧化氢 (H₂O₂) 使 HRP 失活 (淬灭)，然后清洗膜。这样就可以对第二种目标蛋白质进行标记和检测，而不会受到第一种标记的干扰。淬灭 HRP 标记蛋白质信号所需的 H₂O₂ 浓度取决于 HRP 的含量和膜培养的时间。通常情况下，用 15% 的 H₂O₂ 在 PBS 中孵育 30 分钟即可获得良好的剥离效果。然后用 PBS 冲洗膜三次，每次 5 分钟，并对膜进行重新检测，以便进行第二次蛋白质检测。

👉 有关蛋白质印迹实验方案，请参见第 11 章。

5.4 参考文献

- Sharma. S. K. and Carew, T. J. Inclusion of phosphatase inhibitors during Western blotting enhances signal detection with phospho-specific antibodies. Anal. Biochem. 307, 187–189 (2002).
- Kaufmann, S. H. et al. The erasable Western blot. Anal. Biochem. 161, 89–95 (1987).

06

检测

目前有多种基于化学发光、化学荧光、荧光、显色或放射性同位素等的检测方法 (图 6.1)。多年来，放射性同位素试剂和显色试剂一直被广泛使用，但由于处理放射性同位素存在安全问题，以及显色试剂的灵敏度较低，其受欢迎程度有所下降。因此，基于酶的化学发光法和直接荧光法得到了长足发展，由于其灵敏度更高、动态范围更广，现已成为检测的首选方法。

基于酶的检测方法，如化学发光法和化学荧光法，需要添加一种试剂，当试剂与与二抗偶联的酶发生反应时就会发光。另一方面，基于荧光的检测在结合标记过的二抗之后不需要添加额外的试剂。



最常用的酶检测系统是化学发光。化学发光主要基于与辣根过氧化物酶 (HRP) 偶联的抗体，HRP 在过氧化物存在的情况下会催化鲁米诺的氧化，从而发光。与碱性磷酸酶 (AP，表 5.3) 等其他酶相比，HRP 具有多种优势。HRP 可以很容易地与抗体或链霉亲和素偶联，并可与不同的化学发光试剂一起使用。为了获得更高的检测灵敏度、更强的光强度和更持久的信号，研发人员在开发基于 HRP 的检测试剂方面付出了巨大的努力。本章将对此作进一步介绍。

基于荧光的检测系统使用直接与抗体或链霉亲和素偶联的荧光实体或荧光基团。可使用特定波长的光源激发荧光基团，使其发光。与添加检测试剂相比，可以通过配备合适光源和发射光滤光片的设备 (如 CCD 成像仪或激光扫描仪) 直接检测荧光信号。

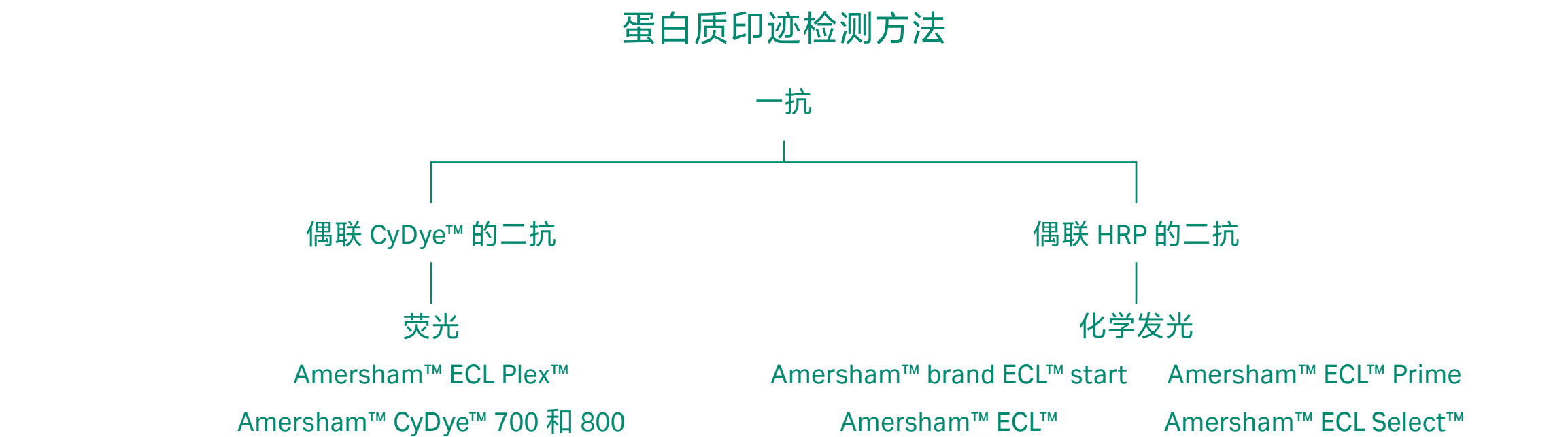


图 6.1. 用于蛋白质印迹法检测的 Cytiva 试剂组合。Amersham™ ECL Plex™ 包含一系列 CyDye™(Cy™3 和 Cy™5)标记的二抗，CyDye™ 700 和 800 包含 IR 长标记和 IR 短标记的二抗。无需其他检测试剂。使用激光扫描仪或 CCD 成像仪(如 Amersham™ Typhoon™ 和 Amersham™ ImageQuant™ Fluor)可直接检测这些抗体的荧光信号。Amersham™ ECL™ start、ECL™ Prime 和 ECL Select™ 是用于化学发光的检测试剂，需要与 HRP 偶联的二抗才能产生光信号，该信号可通过 Amersham™ ImageQuant™ CCD 成像仪系列设备检测。



6.1 化学发光

自 20 世纪 90 年代初以来，Cytiva (即 Amersham™ 公司) 开发了化学发光检测系统，目前已成为蛋白质印迹法应用最广泛的系统之一。如今，Cytiva 旗下有一系列不同的化学发光检测试剂可供选择，以满足不同的实验需求。

HRP 偶联二抗与和膜上目标蛋白质特异性结合的一抗结合。加入鲁米诺过氧化物检测试剂后，HRP 酶会在多步反应中催化鲁米诺的氧化。

反应过程中会发出 428 nm 的低强度光。若加入某些化学物质，发射的光会增强 1000 倍，使其更容易被检测到，从而提高反应的灵敏度，这一过程被称为增强化学发光 (ECL)。有几种增强剂可以达到此目的，但最有效的是改性苯酚，尤其是对碘苯酚，它能提高 HRP 的周转率，协助电子从鲁米诺转移到酶上。信号强度取决于反应酶分子的数量，因此与抗体量成正比，而抗体量又与印迹上的蛋白质质量有关 (图 6.2)。

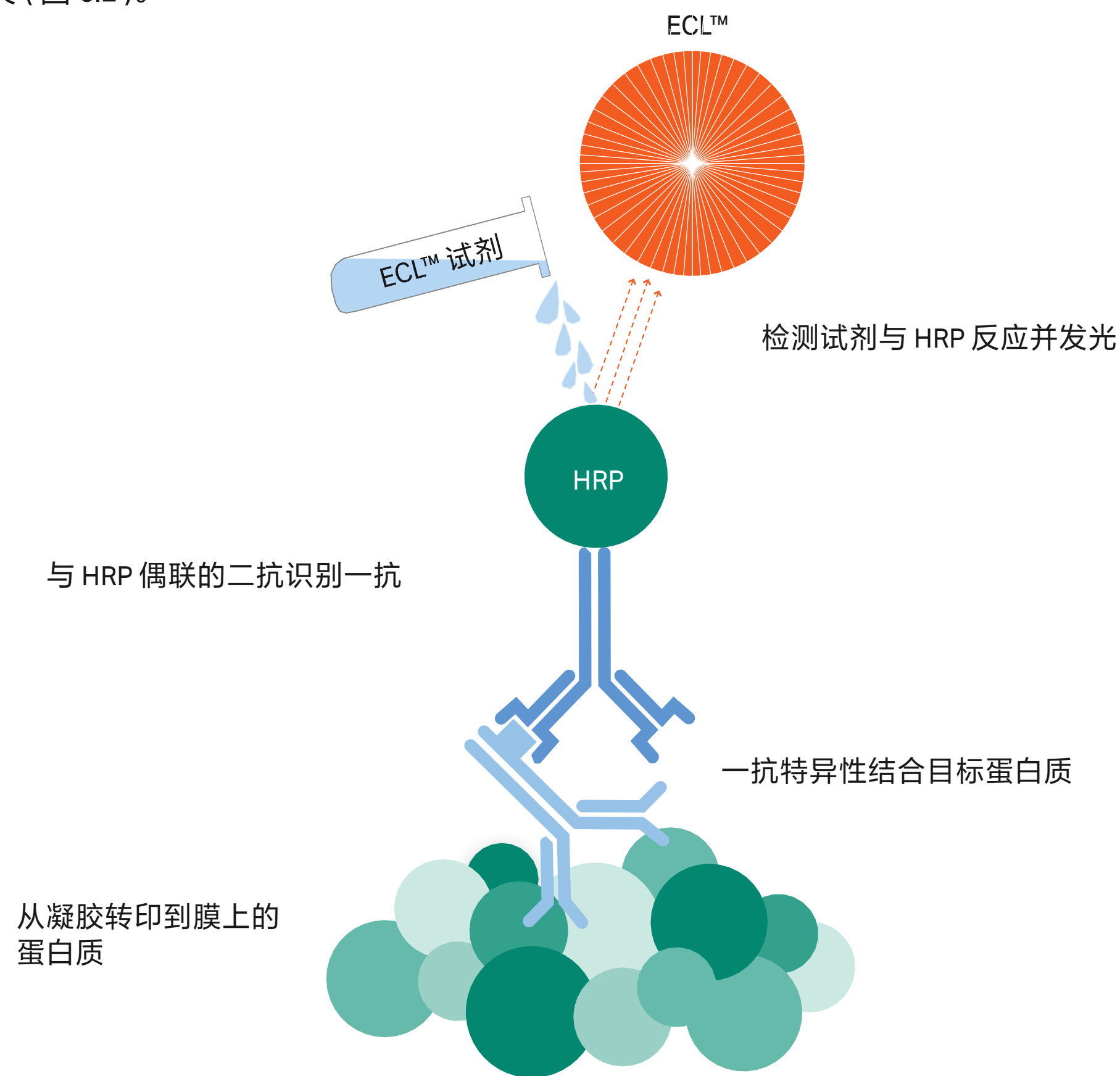


图 6.2. 蛋白质印迹法中的增强化学发光 (ECL) 检测原理。

选择最合适的 ECL™ 试剂取决于实验要求。例如，使用 Amersham™ ECL™ start 或 Amersham™ ECL™ 试剂，只需投入少量资金进行优化，就能快速、轻松地检测出高丰度蛋白质。

如果需要高灵敏度或更精确的定量，建议使用 Amersham™ ECL™ Prime 和 ECL Select™。Amersham™ ECL™ Prime 和 ECL Select™ 发出的信号非常强，因此可以检测极低浓度的蛋白质，也可用于重复曝光 (表 6.1)。

- 👉 在使用基于抗体的检测方法时，一抗的质量和来源及其对相关蛋白的亲和力在很大程度上决定了 LOD 值以及交叉反应的可能性。
- 👉 应始终按照生产商推荐的浓度使用抗体，但 Amersham™ ECL™ 试剂的使用指南请参考表 6.1。一般来说，抗体浓度越高，信号越强，但抗体过量也可能导致与膜的非特异性结合。花时间测试不同的抗体浓度(见附录)是非常有必要的。

表 6.1. Amersham™ ECL™ start、ECL™、ECL™ Prime 和 ECL Select™ 适用于不同的蛋白质印迹应用，具体取决于所需的灵敏度和一抗的可用性。与不同滤膜的兼容性见表 4.4

	Amersham™ ECL™ start	Amersham™ ECL™	Amersham™ ECL™ Prime	Amersham™ ECL Select™
应用	用于确证分析和检测中高水平的内源蛋白质	用于确证检测和分析或其他应用，目标蛋白质不受限制	可在广泛的蛋白质水平范围内实现高灵敏度和精确定量	可实现中低水平蛋白质的高灵敏度和精确定量
一抗，工作范围稀释	1:500 至 1:3000	1:100 至 1:5000	1:1000 至 1:30 000	1:5000 至 1:30 000
二抗，工作范围稀释	1:5000 至 1:30000	1:1000 至 1:50 000	1:50 000 至 1:200 000	1:100 000 至 1:300 000

6.1.1 Amersham™ ECL™ start

Amersham™ ECL™ start 蛋白质印迹法检测试剂是一种化学发光检测试剂，推荐用于确证分析和检测中高水平的内源性蛋白质。

Amersham™ ECL™ start 具有良好的信号持续时间，可对膜进行多次曝光，而且还能为实验和分析之间提供一个方便的时间窗口。该试剂非常适合用 X 射线胶片和 CCD 成像仪进行检测，如图 6.3 所示。

以 320 ng 为起始浓度，对重组 β-半乳糖苷酶蛋白进行一系列两倍稀释，最后在低浓度端重复检测到了 20 ng 的蛋白质 (图 6.3A)。低背景产生高信噪比，这清楚地表明了 Amersham™ ECL™ start 和 X 射线胶片之间的高度兼容性。以 10 μg 总蛋白为起始浓度，对 NIH/3T3 细胞裂解物进行一系列两倍稀释，ERK 1/2 的检测限度可低至 0.31 μg (图 6.3B)。使用 Amersham™ 系列 CCD 成像仪很容易检测到信号，且信号呈现线性响应曲线 (曲线未显示)。此外，叠加功能还可在蛋白质印迹过程中同时使用可见的 Amersham™ ECL™ start 标记蛋白质，从而快速验证蛋白质的分子量。

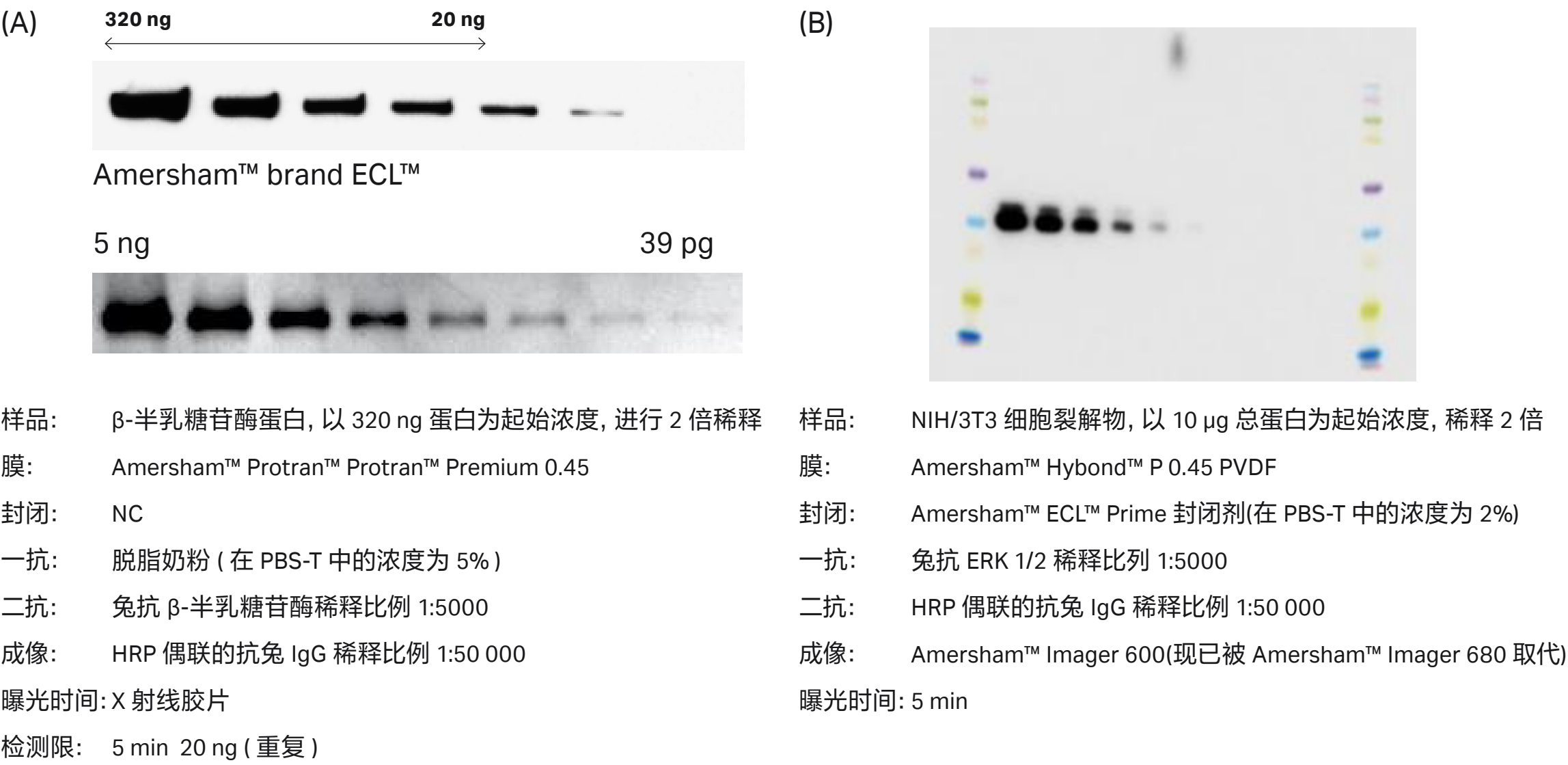


图 6.3. 使用 Amersham™ ECL™ start 进行蛋白质印迹法检测，途中所示为 β-半乳糖苷酶蛋白 (A) 和 NIH/3T3 裂解物中的 ERK 1/2(B) 的印迹结果。这些数据证明了 Amersham™ ECL™ start 和 X 射线胶片之间的兼容性。高信号强度充分发挥了 CCD 成像仪成像的优势。

该试剂可用于硝酸纤维素膜和 PVDF 膜的检测 (表 4.4)。应始终按照生产商推荐的浓度使用抗体，但根据 Amersham™ ECL™ start 的指导原则，一抗和二抗可分别按照 1:500 至 1:3000 和 1:5000 至 1:30000 的比例稀释。

Amersham™ ECL™ start 试剂的一个优点是工作溶液的稳定性非常好。将溶液保存在 2°C 至 8°C 的温度下，可使用长达 5 天，同时保持与最初相同的检测水平。另一个优点是保存期限长。Amersham™ ECL™ start 蛋白印迹法检测试剂自生产之日起有 18 个月的保质期，为那些不经常进行蛋白质印迹法检测的用户提供了方便。

6.1.2 Amersham™ ECL™

Amersham™ ECL™ 是全球首款商用化学发光检测试剂，能够检测数量低至 10 pg 的蛋白质。这种方法的使用率很高，尤其适用于以下应用领域：

- 验证重组蛋白质的表达
- 验证高表达蛋白
- 研究标签蛋白质
- 确证研究

在使用基于抗体的检测方法时，一抗的质量和来源及其对相关蛋白的亲合力在很大程度上决定了 LOD 值以及交叉反应的可能性。

图 6.4 展示了 Amersham™ ECL™ 在检测经过一系列稀释的转铁蛋白时的性能。Amersham™ ECL™ 也适用于蛋白质印迹的定量，但灵敏度低于 Amersham™ ECL™ Prime 和 Amersham™ ECL Select™。



图 6.4. 使用 Amersham™ ECL™ 对经过一系列两倍稀释的转铁蛋白进行蛋白质印迹法检测。图为使用 ImageQuant™ CCD 成像仪采集的图像。

使用 Amersham™ Hybond™ 和 Protran™ Premium 膜可实现 Amersham™ ECL™ 的最佳性能。应使用 Amersham™ ECL™ 或 Amersham™ ECL™ Prime 封闭剂对这些膜进行封闭，以尽量减少背景。

应始终按照生产商推荐的浓度使用抗体，但根据 Amersham™ ECL™ 的指导原则，一抗和二抗可分别按照 1:100 至 1:5000 和 1:1000 至 1:50 000 的比例稀释 (表 6.1)。发射的信号在 5 到 10 分钟后达到峰值，然后缓慢衰减，半衰期约为 60 分钟，可使用 Amersham™ Hyperfilm™ ECL™ 或 CCD 成像仪 (如 Amersham™ ImageQuant™ 800) 进行检测 (见第 7 章)。

6.1.3 Amersham™ ECL™ Prime

Amersham™ ECL™ Prime 是一种高灵敏度的化学发光检测系统，其特点是信号发射极其稳定，允许重复曝光，使同一实验运行中处理多个印迹变得更加容易。此外，高强度的发射信号意味着 Amersham™ ECL™ Prime 适用于处理低丰度蛋白质，或其他利用高灵敏度 CCD 成像仪优势的应用。此外，还可使用高度稀释的一抗和二抗，从而降低实验总成本，并将高背景的风险降至最低。

与其他化学发光试剂相比，Amersham™ ECL™ Prime 的性能有所提高，这是因为它含有高性能增强剂和催化剂，可提高信号强度、灵敏度和持续时间。Amersham™ ECL™ Prime 特别推荐用于定量分析，如：

- 需要高灵敏度的应用
- 蛋白质丰度的变化
- 蛋白质之间的相互作用
- 检测蛋白质异构体
- 蛋白质降解评估
- 翻译后修饰 (PTM)
- 同时检测低丰度和高丰度蛋白质

图 6.5 展示了 Amersham™ ECL™ Prime 的性能。以 12.5 µg 总蛋白提取物为初始浓度，对 IFNα 处理过的 HeLa 细胞裂解液进行一系列两倍稀释，Amersham™ ECL™ Prime 可从中检测出 pSTAT3。请注意，灵敏度的高低取决于特定抗体与蛋白质之间的相互作用。

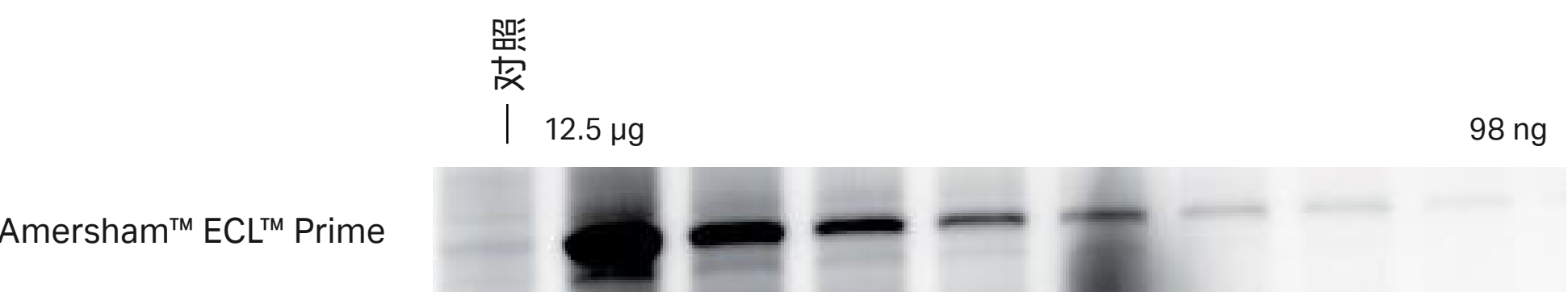


图 6.5. 使用 Amersham™ ECL™ Prime 检测 IFNα 处理过的 HeLa 细胞中的 pSTAT3。请注意，蛋白质数量指的是从细胞裂解液中提取的总蛋白质载量。pSTAT3 只占总量的一小部分。对照泳道含有 6.25 µg 来自未处理细胞的总蛋白。

6.1.3.1 灵敏度和精确度

Amersham™ ECL™ Prime 具有高灵敏度和线性动态范围，如果与 CCD 成像仪 (如 Amersham™ ImageQuant™ 800 系列中的一种) 结合使用 (见第 7 章)，单次曝光后就能检测并精确定量同一印迹上的低丰度和高丰度蛋白质。当需要高灵敏度的系统时，例如检测瞬时蛋白质磷酸化 (一种 PTM)，使用 Amersham™ ECL™ Prime 会更有优势。

Amersham™ ECL™ Prime 的另一个优点是信号强度强，可使用高度稀释的抗体，同时保持良好的性能(图 6.6)。因此，如果用于检测的抗体稀缺，Amersham™ ECL™ Prime 性价比很高。

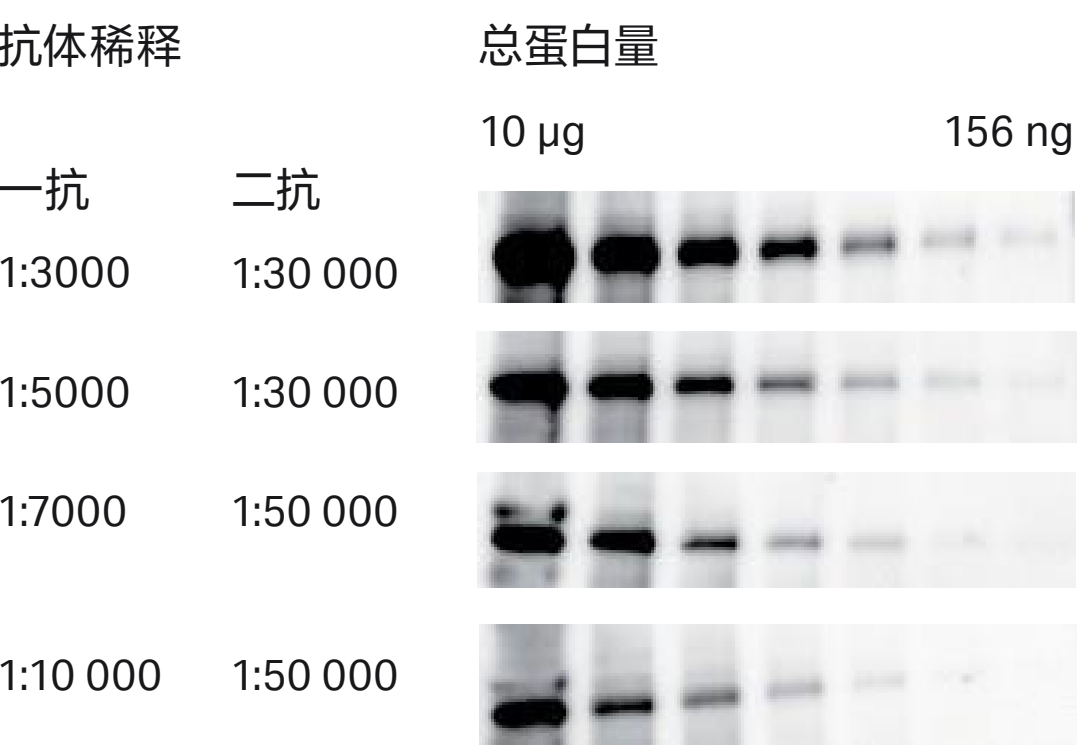


图 6.6. 使用 Amersham™ ECL™ Prime 通过蛋白质印迹法检测 NIH 3T3 全细胞裂解液中的 β-连环蛋白，采用不同稀释倍数的兔抗 β-连环蛋白 (一抗) 和 HRP 偶联的抗兔 IgG (二抗) 对裂解液进行一系列的两倍稀释。请注意，蛋白质数量指的是从细胞裂解液中提取的总蛋白质载量。β-连环蛋白只占总量的一小部分。

6.1.3.2 信号持续时间

Amersham™ ECL™ Prime 发出的信号持续时间长，即使是测试的最低蛋白质量，在加入底物 3 小时后仍能发出强烈的信号 (图 6.7 和图 6.8)。这样就可以进行多次曝光，并为添加试剂和检测信号之间提供一个方便的时间窗口。

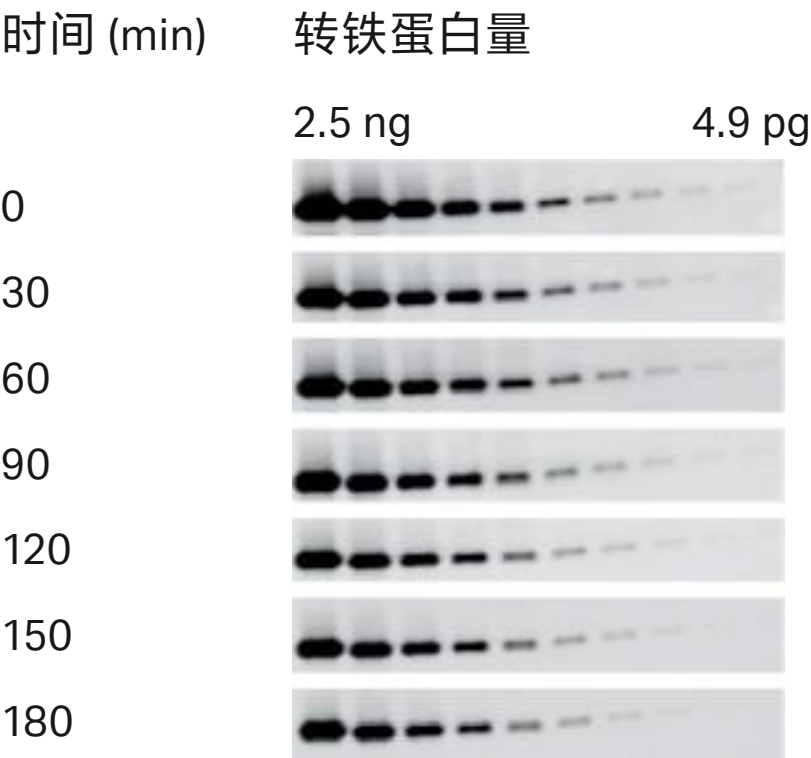


图 6.7. 对起始浓度为 2.5 ng 的转铁蛋白进行一系列两倍稀释，结果显示加入 Amersham™ ECL™ Prime 试剂后 3 小时内各时间点的信号有所增强。时间 0 相当于添加试剂后 5 分钟。每个时间点检测信号 3 分钟。

将 Amersham™ ECL™ Prime 与 CCD 成像仪结合使用，并执行与 Amersham™ ECL™ 类似的优化流程 (但最好使用 Amersham™ ECL™ Prime™ 封闭剂进行封闭)，可使 Amersham™ ECL™ Prime 的性能达到最佳。此外，推荐使用 Amersham™ Hybond™ PVDF 膜，因为这类膜蛋白质结合能力强，可实现高灵敏度。一抗和二抗应分别按照 1:1000 至 1:50000 和 1:30000 至 1:200000 的比例稀释。如果首选检测方法是胶片，Amersham™ ECL™ Prime™ 也可以与胶片兼容。

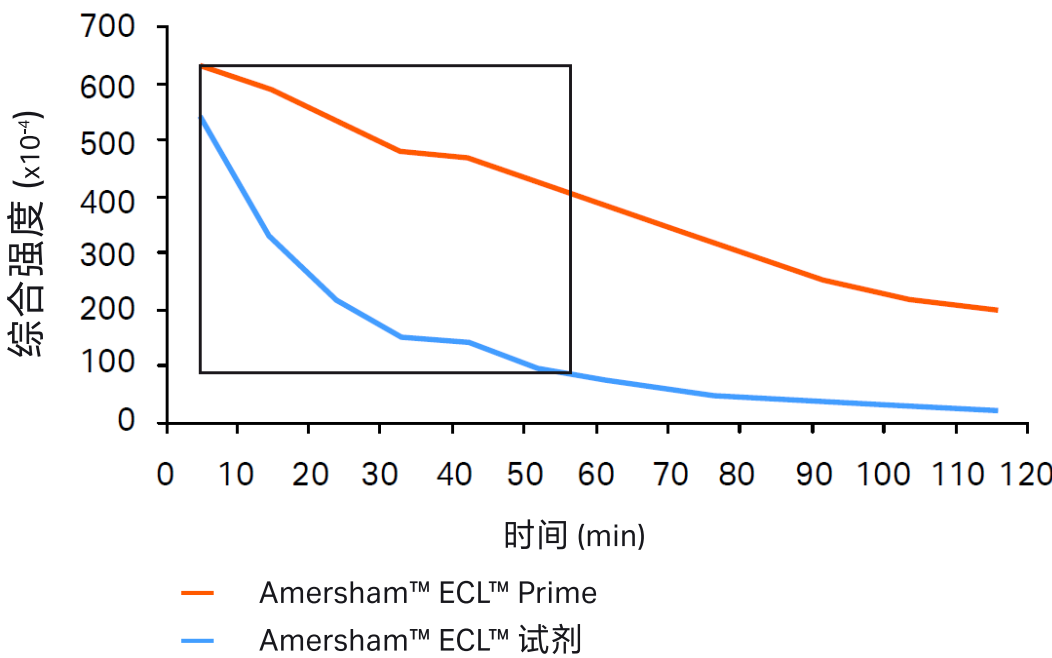


图 6.8. 信号随时间变化的稳定性。Amersham™ ECL™ Prime 与另一种化学发光检测试剂的信号持续时间比较。Amersham™ ECL™ Prime 的高稳定性为保持更高灵敏度提供了更充裕的时间间隔。

Amersham™ ECL™ Prime 发出的信号持续时间长，即使是测试的最低蛋白质量，在加入底物 3 小时后仍能发出强烈的信号 (图 6.7 和图 6.8)。这样就可以进行多次曝光，并为添加试剂和检测信号之间提供一个方便的时间窗口。

6.1.3.2 Amersham™ ECL Select™

Amersham™ ECL Select™ 是一种用于化学发光蛋白质印迹法检测的高灵敏度试剂。它是 Amersham™ ECL™ 产品系列中灵敏度最高的化学发光检测试剂。Amersham™ ECL Select™ 的动态范围与 Amersham™ ECL™ Prime 互补。Amersham™ ECL Select™ 具有出色的信号强度，适用于要求最严格的蛋白质印迹法应用，包括微量蛋白质的检测。由于光输出与检测到的蛋白质量成正比，因此可在单个印迹上对各种蛋白质水平进行精确定量。

Amersham™ ECL Select™ 通常用于蛋白质印迹法工作流程的检测阶段，但也会对上游程序产生影响。例如，如果使用 Amersham™ ECL Select™ 进行检测，印迹膜上用作探针的一抗可能会被高度稀释。这样既可降低成本，又可避免背景信号水平熄灭较弱的、特定的相互作用。

Amersham™ ECL™ Prime 特别适用于定量分析，如：

- 需要高灵敏度的应用
- 蛋白质丰度的变化
- 蛋白质之间的相互作用
- 检测蛋白质异构体
- 蛋白质降解评估
- 翻译后修饰 (PTM)
- 同时检测低丰度和高丰度蛋白质

Amersham™ ECL Select™ 的性能如图 6.9 所示。以 2 μ g 总蛋白提取物作为起始浓度，对 293 T 细胞裂解液进行一系列两倍稀释，最终在其中检测到了内源性 TAB 1。请注意，灵敏度的高低取决于特定抗体与蛋白质之间的相互作用。

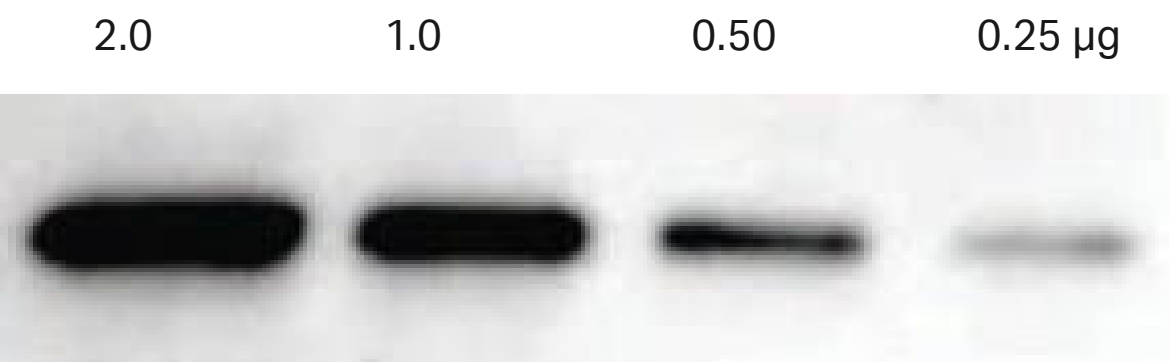


图 6.9. 用蛋白印迹法检测 293 T 细胞裂解液中的内源性 TAB 1。Amersham™ ECL Select™ 的高信号强度可提供颜色鲜明的条带和高灵敏度的检测。

6.1.4.1 灵敏度和精确度

得益于高灵敏度和信号强度以及宽泛的线性动态范围, Amersham™ ECL Select™ 既适用于定性分析, 也适用于定量分析。Amersham™ ECL Select™ 可产生极高的光输出, 因此可在实验中使用高度稀释的抗体。

图 6.10 为使用蛋白质印迹法在经过一系列两倍稀释的 NIH/T3T 细胞裂解液中检测 PP2A, 该图证明 Amersham™ ECL Select™ 可用各种稀释度的一抗检测微量蛋白质。

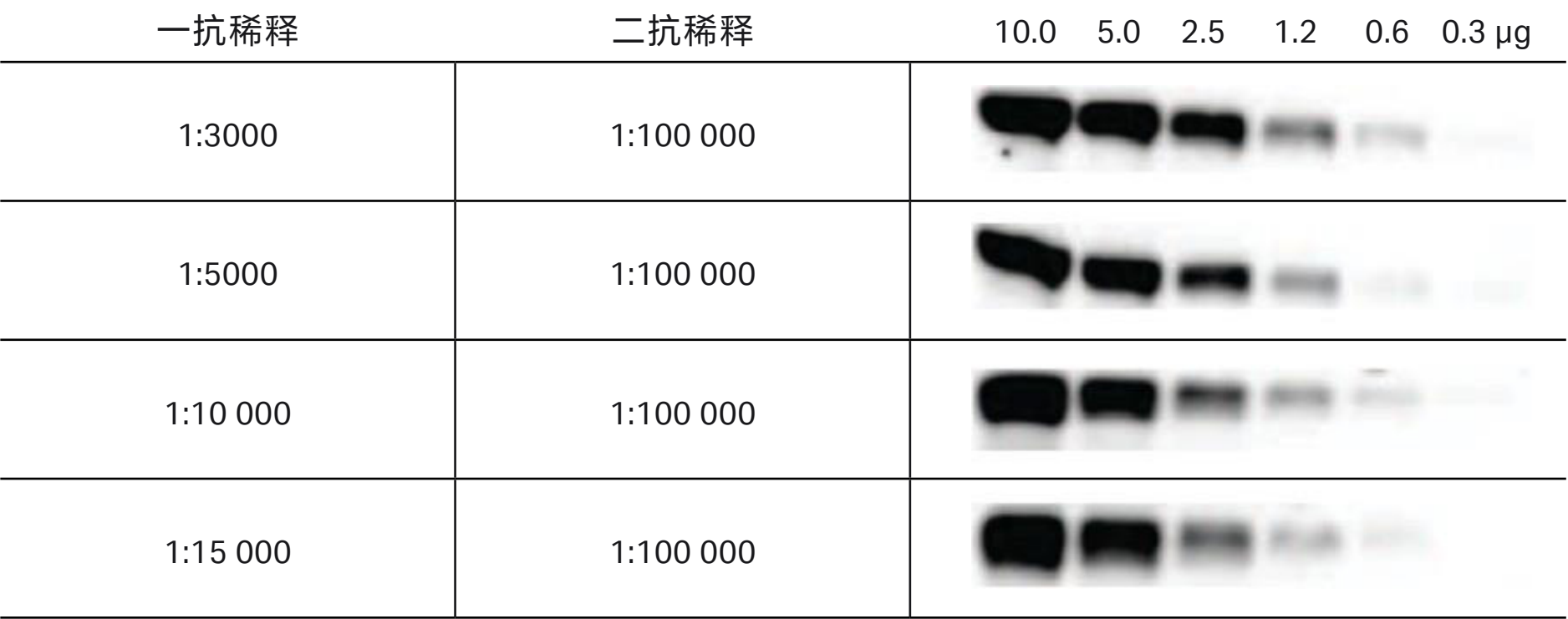


图 6.10. Amersham™ ECL Select™ 可使用多种稀释度的一抗实现高灵敏度。

6.1.4.2 信号持续时间

在检测 HeLa 细胞裂解液中 ERK 1/2 的蛋白质印迹法模型系统中评估了 Amersham™ ECL Select™ 的信号持续时间。即使测试的蛋白质量极少, 也能在添加试剂 2 小时后获得高信号输出和充足的剩余信号(图 6.11)。这样, 在实验结束和检测开始之间就有了一个方便的时间窗口, 从而可以进行多次曝光。

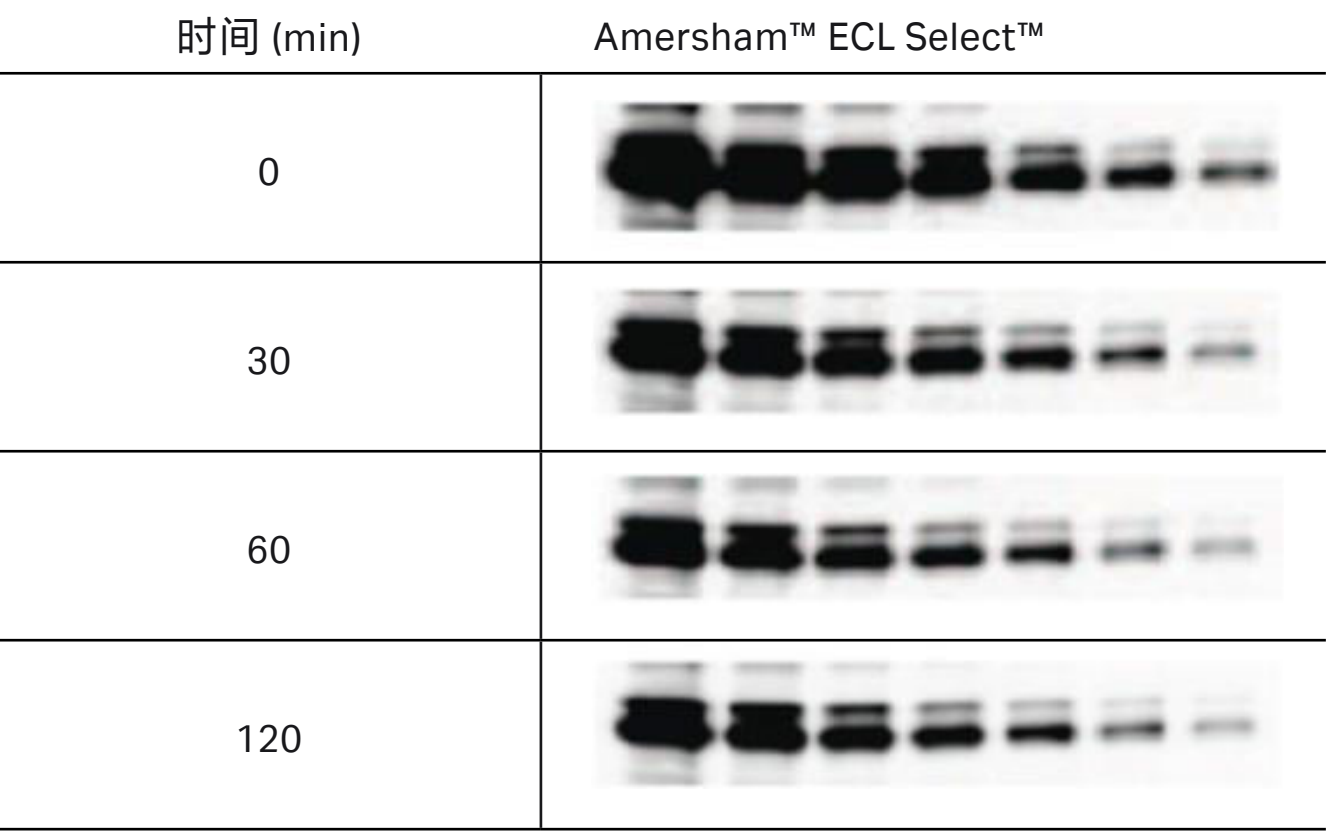


图 6.11. 以 5 µg 总蛋白为起始浓度, 对 ERK 1/2 进行一系列两倍稀释, 在不同时间点监测 Amersham™ ECL Select™ 输出信号的下降情况。Amersham™ ECL Select™ 的高信号强度可持续检测极低水平的蛋白质长达 2 小时。

6.1.5 化学发光提示和技巧

- 为了提高信噪比，花时间优化封闭剂和抗体十分有必要。刚开始一定要遵循生产商的建议（见附录）。
- 不要使用叠氮化钠作为缓冲液的防腐剂，因为它是一种强效的 HRP 抑制剂。技巧：在 Amersham™ ImageQuant™ 800 上使用 SNOW 检测模式和 ECL™ Prime，可提高信噪比并避免条带饱和。
- 使用 ECL™ 进行检测时，为尽量减少信号不均匀，应首先混合检测溶液并倒入干净的容器中。然后将探测膜放入检测溶液中，轻轻搅拌以覆盖整个表面。
- 如果要重复使用膜片，请将其放在塑料材料夹中，以防成像前干透。务必去除气泡。
- 在免疫检测过程中或两轮免疫检测之间的任何时候都不要让膜变干。如果膜干透，任何残留分子都会永久地与膜结合，使膜无法剥离。这一点在使用 PVDF 膜时尤为重要。
- 为保证性能的可重复性，使用前应让所有试剂平衡至室温。
- 虽然 Amersham™ ECL™、ECL™ Prime 和 ECL Select™ 刚混合的活性溶液是稳定的，但我们建议等到使用前再混合试剂。如果混合试剂在使用前必须储存，请用铝箔纸包裹容器或储存在阴暗处避光。不过，Amersham™ ECL™ start 的工作溶液在 2°C 至 8°C 的条件下可稳定保存 5 天。
- 许多化学发光底物发出的信号强度会减弱。如果信号很弱，即使在 ECL 检测后立即对印迹进行成像也请遵循以下原则：
 - 确保检测试剂未过期并已妥善保存；溶液不应直接暴露在光线下
 - 确保检测溶液烧瓶的瓶盖未被混用，以免污染溶液
 - 不要交叉污染溶液；使用新鲜、干净的移液器吸头
- 如果要剥离膜并重新检测，不要让它变干。

- 如果检测涉及链霉亲和素-生物素-HRP 复合物，请勿使用低脂牛奶作为封闭剂或稀释剂。牛奶中的内源性生物素可能会抑制链霉亲和素与生物素之间的相互作用，从而导致信号减弱。此外，牛奶中可能含有磷酸表位，会干扰磷酸特异性抗体，导致背景增加。
- 要检查 ECL 试剂是否正常工作，可以进行“蓝光测试”。在暗室中，只需在试管中准备 1 mL ECL™ 试剂，加入 1 至 3 μL 与 HRP 偶联的二抗并充分混合。功能性试剂会发出清晰可见的蓝白色光。或者，将 2 至 5 μL 1:100 稀释的与 HRP 偶联的二抗点在膜上。加入 ECL 试剂并将膜暴露在 CCD 成像仪下或 X 射线胶片上即可。

6.2 荧光

荧光基团是一种分子，当它们吸收光线时，就会产生荧光。在基态下，荧光基团不发光，但当接收到光(激发)时，它们的能级被提升到短暂但不稳定的激发状态。当荧光基团回到它们的基态时，它们以比激发光更低的能量、更高的波长（发射）释放光。

荧光检测是一种直接方法，其中二抗与荧光基团偶联，从而避免了对辅助检测试剂的需要。不同的荧光基团可用于检测可见光波长或近红外波长的信号。荧光检测法灵敏度高，线性动态范围广，非常适合蛋白质印迹法的定量检测。此外，荧光基团还可用于同时检测一种以上的蛋白质（多重检测），这在许多应用中都非常有用。

与 Amersham™ 品牌旗下的 CyDye™ 荧光染料偶联的抗体在可见光光谱中有各自特定的激发和发射波长。同时，它们的光谱各不相同，能够将交叉干扰降至最低（图 6.12）。

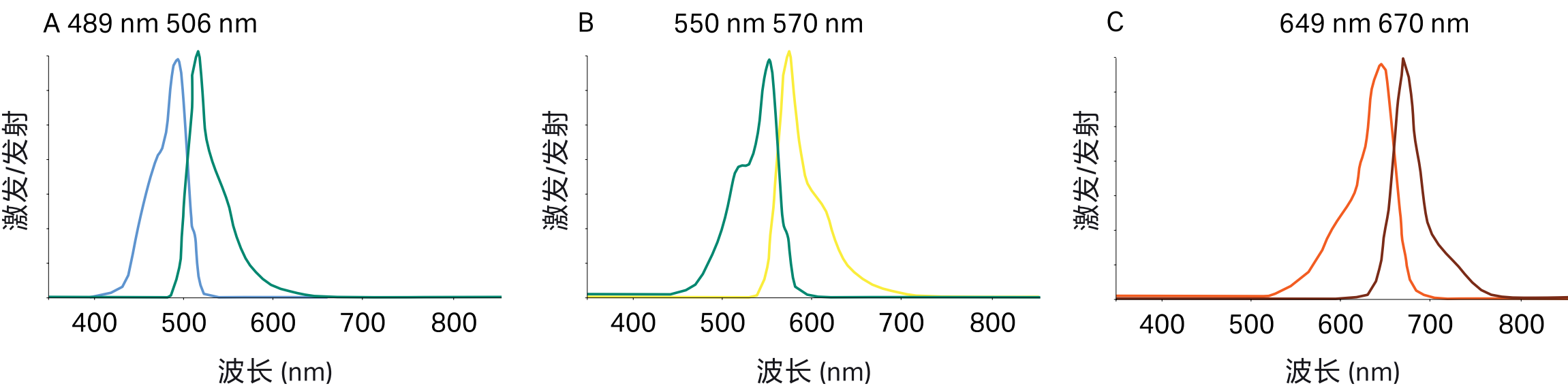


图 6.12. 荧光 CyDye™ (A) Cy™2、(B) Cy™3 和 (C) Cy™5 的激发和发射光谱。每个例子都展示了产生最大激发效率的光波长的影响。

激发后, 使用配备适当光源和滤光片的多通道荧光扫描仪 (如 Typhoon™) 或 CCD 成像仪 (如 Amersham™ ImageQuant™ 800 Fluor) 捕获荧光发射信号 (见第 7 章)。

与荧光素等其他荧光基团相比, CyDye™ 的一个优点是光稳定性高。此外, CyDye™ 具有较宽的 pH 值耐受性 (3 至 10), 可与大多数蛋白质印迹缓冲液兼容。其他优点还包括: 处理步骤简单, 信号寿命长 (> 3 个月), 可将多项实验的数据进行比较。

如前所述, 荧光检测非常灵敏, 动态范围广。如图 6.13 所示, 使用 Cy™3 标记的二抗检测经过一系列稀释的转铁蛋白, 检测限为 1.2 pg。

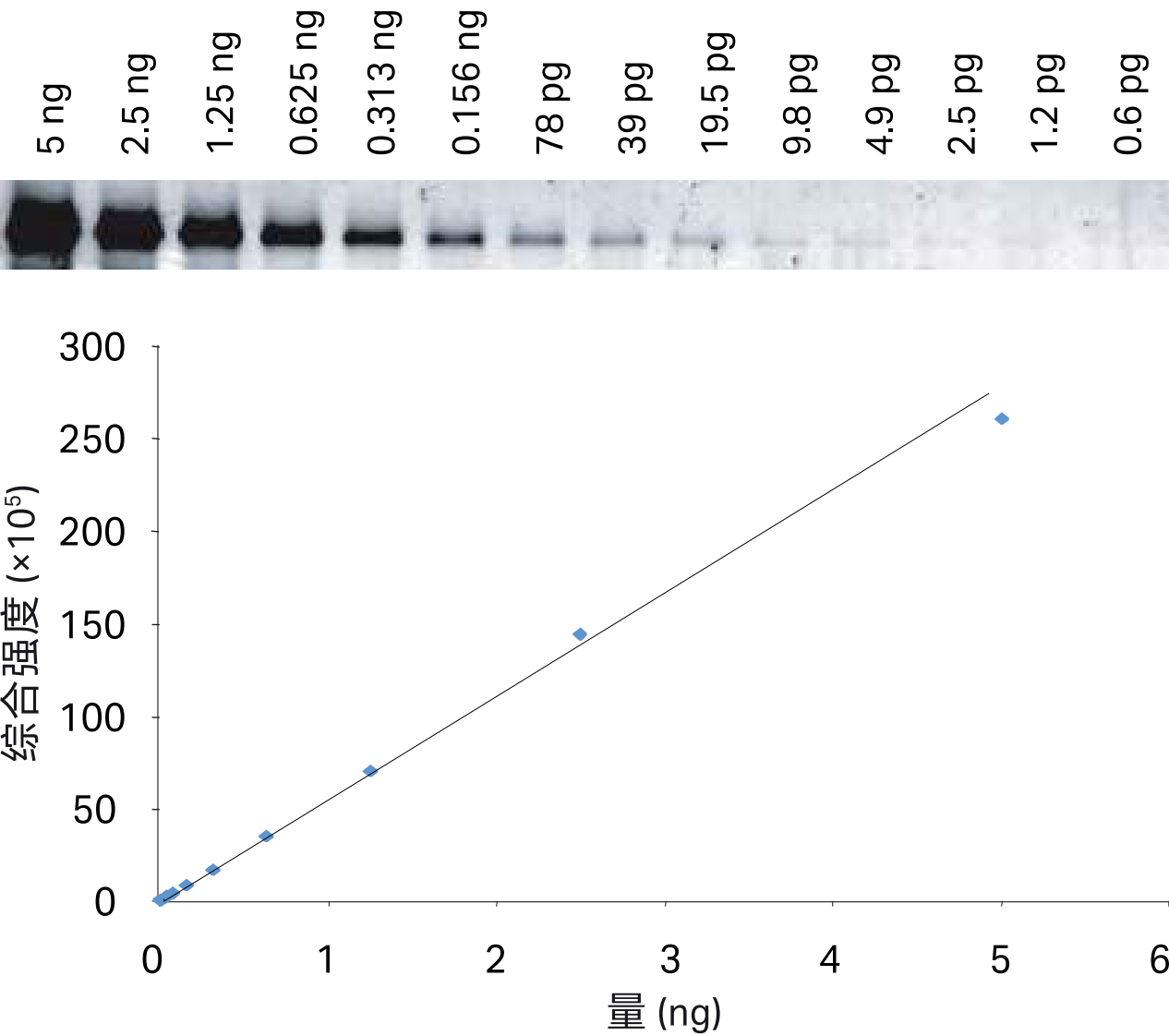


图 6.13. 荧光检测具有广泛的线性动态范围, 因此可以检测和比较同一膜上的强弱条带。上图为用 Cy™3 标记的二抗 (Amersham™ ECL Plex™ 试剂) 检测经过一系列两倍稀释的转铁蛋白。动态范围为 3.6 个数量级, 响应非常线性, LOD 为 1.2 pg。

推荐将荧光检测用于:

- 同时检测一种以上的蛋白质 (多重检测)
- 检测分子量相同的不同蛋白质
- 蛋白质印迹法应用定量
- 需要高灵敏度的应用
- 蛋白质丰度的变化
- 蛋白质之间的相互作用
- 检测异构体
- 蛋白质降解评估
- PTMs
- 同时研究低丰度和高丰度蛋白质
- Cytiva 提供用于荧光检测的 Amersham™ ECL Plex™ 和 CyDye™ 700 和 800 (见 6.2.2)。

6.2.1 多重检测

多重检测要求在不同物种中培养一抗。该技术便于研究相似大小的蛋白质或检测 PTM, 因为这些研究无需剥离和重新检测印迹膜 (如前所述, 剥离和重新检测有可能造成膜上蛋白质的不均匀损失)。因此, 多重检测提高了蛋白质印迹法的定量潜力。它还适用于所有类型的定量分析, 因为无需剥离监便可测管家蛋白质的水平。荧光检测具有灵敏度高、线性动态范围广、发射信号稳定等优点, 这些都是该技术的定量优势所在。

图 6.14 举例说明了用于 PTM 分析的多重检测法。另一种利用蛋白质总量进行上样对照的方法是对样品进行荧光预标记 (Cy™5, Amersham™ Quickstain™ 标记试剂盒, 见 3.4)。染料通过共价键与蛋白质结合, 因此当蛋白质转印到膜上时, 这些染料也会随之转印, 并可用于通过 Cy™3 或 CyDye™ 800 检测的特定目标蛋白质的上样对照。

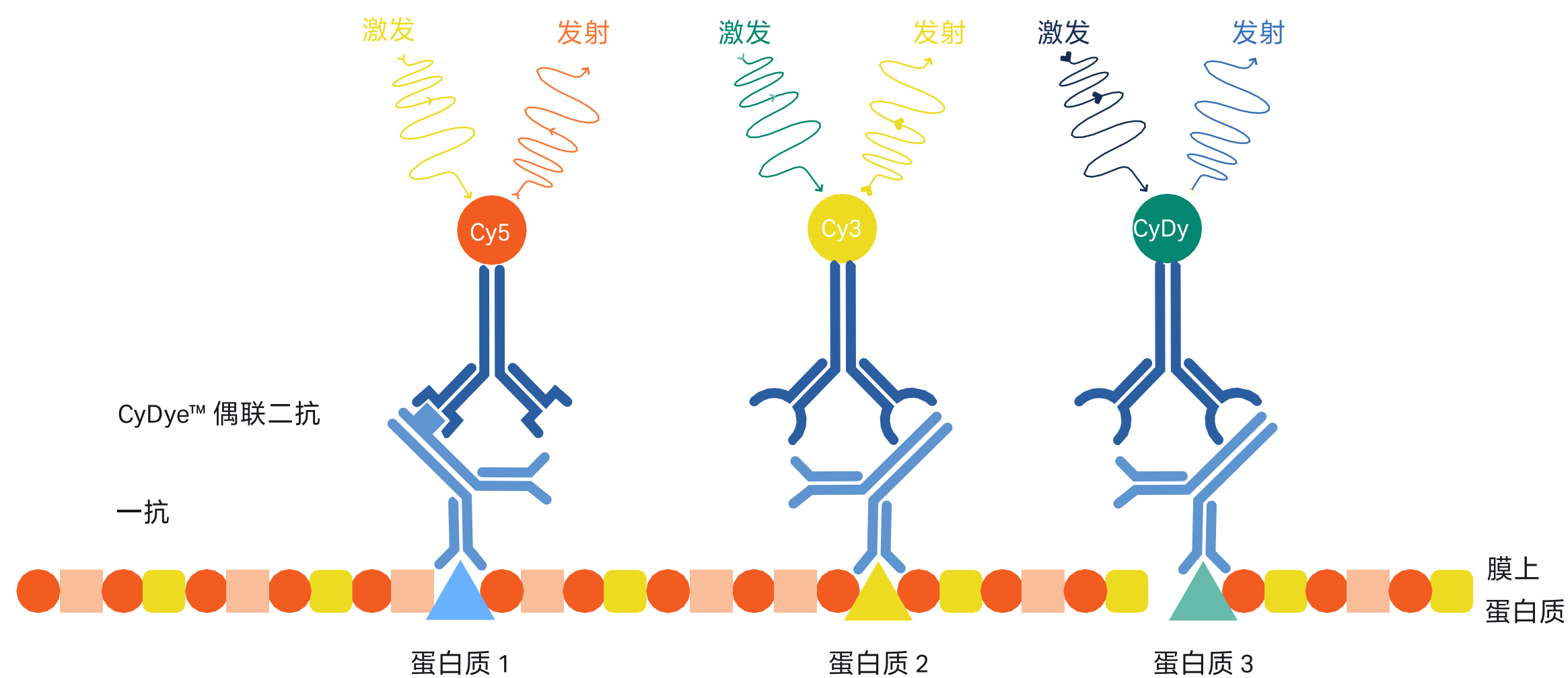


图 6.14. 上图显示了多重检测的原理。针对两种蛋白质的一抗被与荧光 CyDye™、Cy™3 和 Cy™5 偶联的物种特异性二抗识别。直接荧光检测减少了处理和成像步骤，从而节省了时间，同时降低了定量误差。



图 6.16. 用于蛋白质印迹法的硝酸纤维素膜的三色叠加图像。目标 ERK 蛋白的检测使用了红色的红外 (IR) 长波 LED 和滤光片组合，而 GAPDH 的检测则使用了绿色的红外短波通道。裂解液预先用 Cy™3 (蓝色) 标记。

6.2.2 利用荧光多重复用实现归一化

用 Cy™3 或 Cy™5 CyDye™ 荧光染料进行标记的 Amersham™ ECL Plex™ 二抗, Amersham™ 品牌旗下的 CyDye™ 700 和 800 分别近红外短波和长波标记。它们可靶定兔子和小鼠的一抗 (图 6.15)。此外, 还可以使用 Cy™2、Cy™3 或 Cy™5 Ab 标记试剂盒标记特定的抗体。通过使用 CyDyes™ RGB 和近红外标记二抗的任意组合, 可以检测同一膜上的三种蛋白质 (三重检测)。

Amersham™ ECL Plex™ 荧光彩虹标记物既适用于监测电泳进程, 也适用于监测转印效率和预估印迹膜上的分子量, 因为它们在 Cy™5 和 Cy™3 通道中均显示荧光。只有在严格控制蛋白质负载的情况下, 对蛋白质表达微小变化的研究结果才是准确可靠的, 例如分析细胞内信号分子在接触生长因子后的表达情况。虽然应注意通过测量总蛋白水平对凝胶中的泳道进行等量上样, 但由于不同样品之间总蛋白量的差异或转印效率不高而导致的移液误差或定量误差, 很难获得准确的数据。

为获得尽可能高的精确度, 应通过与稳定的内标、管家蛋白质或最好是预标记样本的总蛋白 (如 Amersham™) 进行比较来定量蛋白质水平。一般来说, GAPDH 或 β -肌动蛋白等管家蛋白的表达水平恒定不变, 与外部刺激无关, 但这需要针对具体实验/样品类型进行验证。如果这一点能够得到确证, 管家蛋白便可以作为能够准确反映每孔中的蛋白质总量的指标 (图 6.15)。Amersham™ CyDyes™ 的多重检测功能可对每次测量进行归一化处理, 以补偿上样量的变化, 并消除因膜剥离和重新检测而产生误差的风险。

归一化可补偿上样变化和转印过程中的变化。如上所述，传统的归一化方法会用到管家蛋白质，但由于环境对蛋白表达的影响，这可能会导致结果不准确。用 Cy™3 对样品进行预标记，可检测两种不同的目标蛋白，并可使用 TPN (首选方法) 进行归一化处理。TPN 使用泳道中的总样本信号对目标蛋白信号进行归一化处理 (图 6.16)。与使用管家蛋白信号相比，这种归一化方法更为稳健可靠。

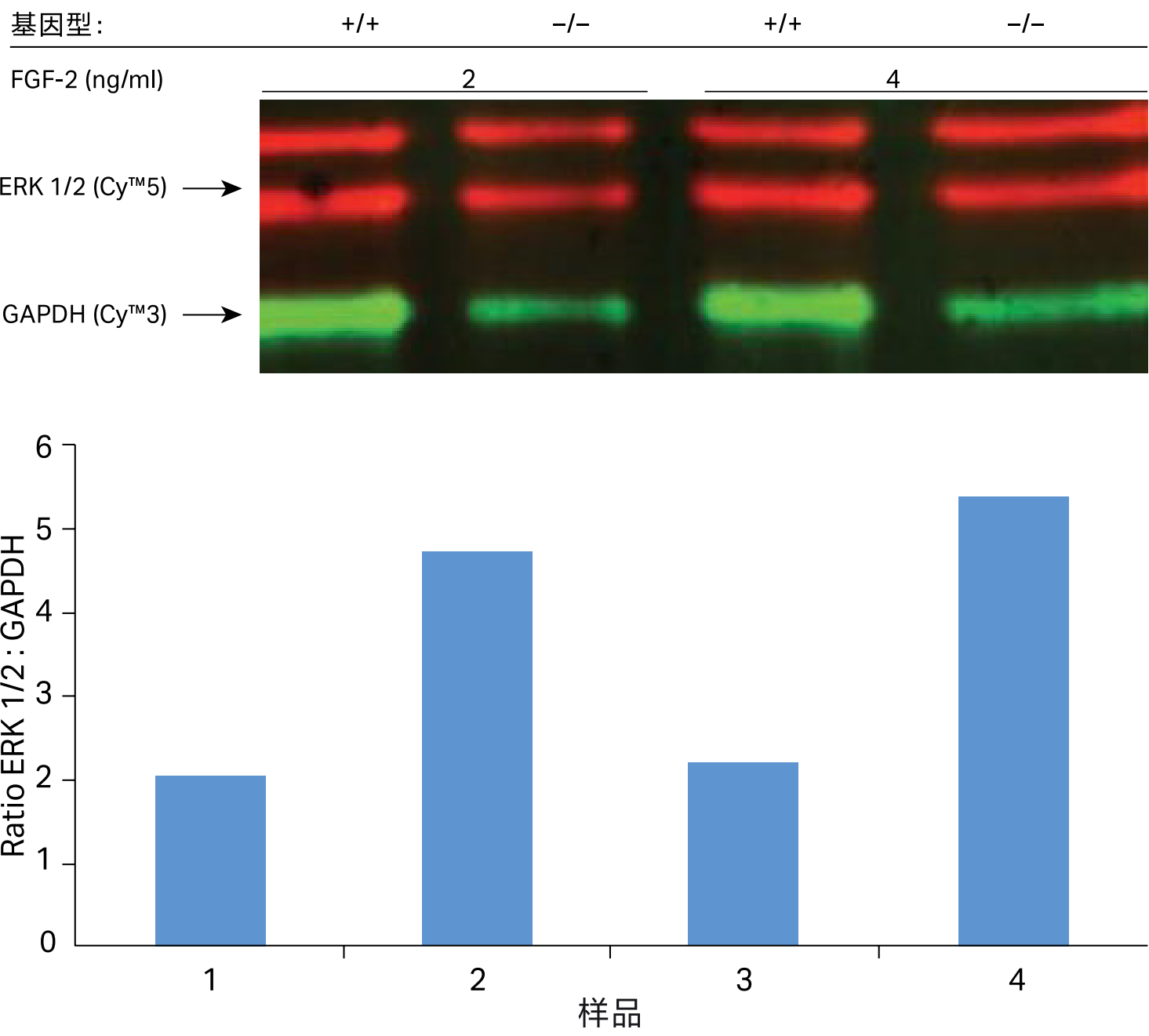


图 6.17. 通过在同一张印迹上检测两种蛋白质，可以相对于甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 等管家蛋白对蛋白质表达进行定量。图中所示为，使用 Amersham™ ECL Plex™ 检测在野生型 (+/+) 和酶敲除型 (-/-) 小鼠胚胎成纤维细胞中，ERK 1/2 在受成纤维生长因子-2(FGF-2) 处理后的反应。使用特异性一抗靶向 ERK1/2 和 GAPDH，然后用 Cy™5 (红色) 或 Cy™3 (绿色) 标记二抗。ERK1/2 的比值: GAPDH 强度揭示了 ERK 1/2 的表达情况，且与上样量的变化无关。数据由瑞典乌普萨拉医学生物化学和微生物学系 Jin-Ping Li 博士和 Juan Jia 博士提供。

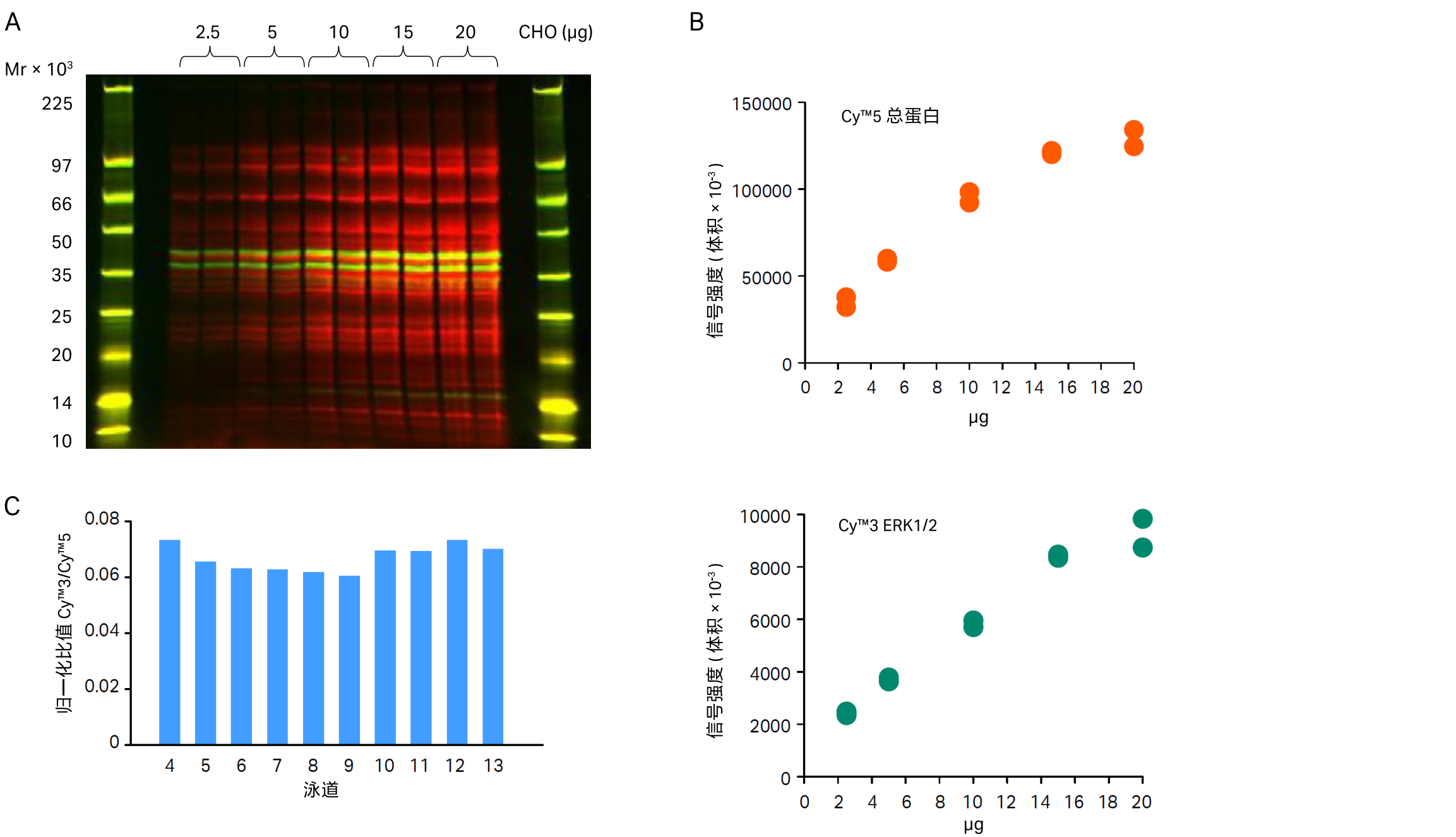


图 6.18. 使用 Amersham™ Cy™5 Quickstain™ 进行总蛋白归一化，采用荧光标记法对总蛋白进行快速染色用 Cy™5 预先标记不同量的相同 CHO 细胞裂解液并进行蛋白质印迹法检测。用抗 ERK1/2 一抗和 Cy™3 标记的二抗对膜进行探测 (A)。目标 Cy™3 和对照 Cy™5 信号成正比 (B)，Cy™3/Cy™5 的归一化比值 (C) 如预期一样，尽管上样量差异很大，但在相同样品中相似。

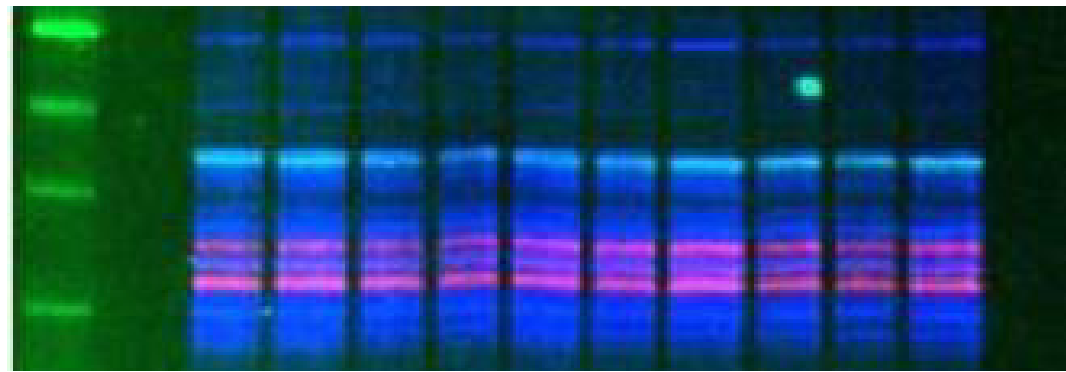


图 6.19. 使用预标记样本进行三重检测。图像由 Amersham™ Typhoon™ 5 捕捉。本实验需要 Amersham™ Typhoon™ 5 或 Typhoon™ NIR Plus 来检测 Cy™3 信号。一抗按 1:2500 的比例稀释，二抗按 1:20 000 的比例稀释。预标记 8 至 12 µg 的 CHO 细胞 (Cy™3, 深蓝色)，检测 ERK (Amersham™ CyDye™ 700 山羊抗兔，红色) 和微管蛋白 (Amersham™ CyDye™ 800 山羊抗鼠，淡蓝色)。

传统的蛋白质印迹检测技术很难研究不改变蛋白质分子量的 PTM。这种方法通常需要对印迹进行剥离和重新监测，但这会导致蛋白质的损失，因此在进行定量分析时存在风险。在这种情况下，可以利用 Amersham™ ECL Plex™ 和 CyDye™ 700 和 800 提供的多重检测功能，因为通过使用在两种不同物种中培养并靶定蛋白质其他形式(例如磷酸化和非磷酸化形式)的一抗，可以在同一张膜上检测未修饰过或修饰过的蛋白质。然后使用与不同荧光基团 (如 Cy™3 和 Cy™5 (图 6.17) 或 Amersham™ 品牌旗下的 CyDye™ 700 和 800) 偶联的物种特异性二抗检测一抗。

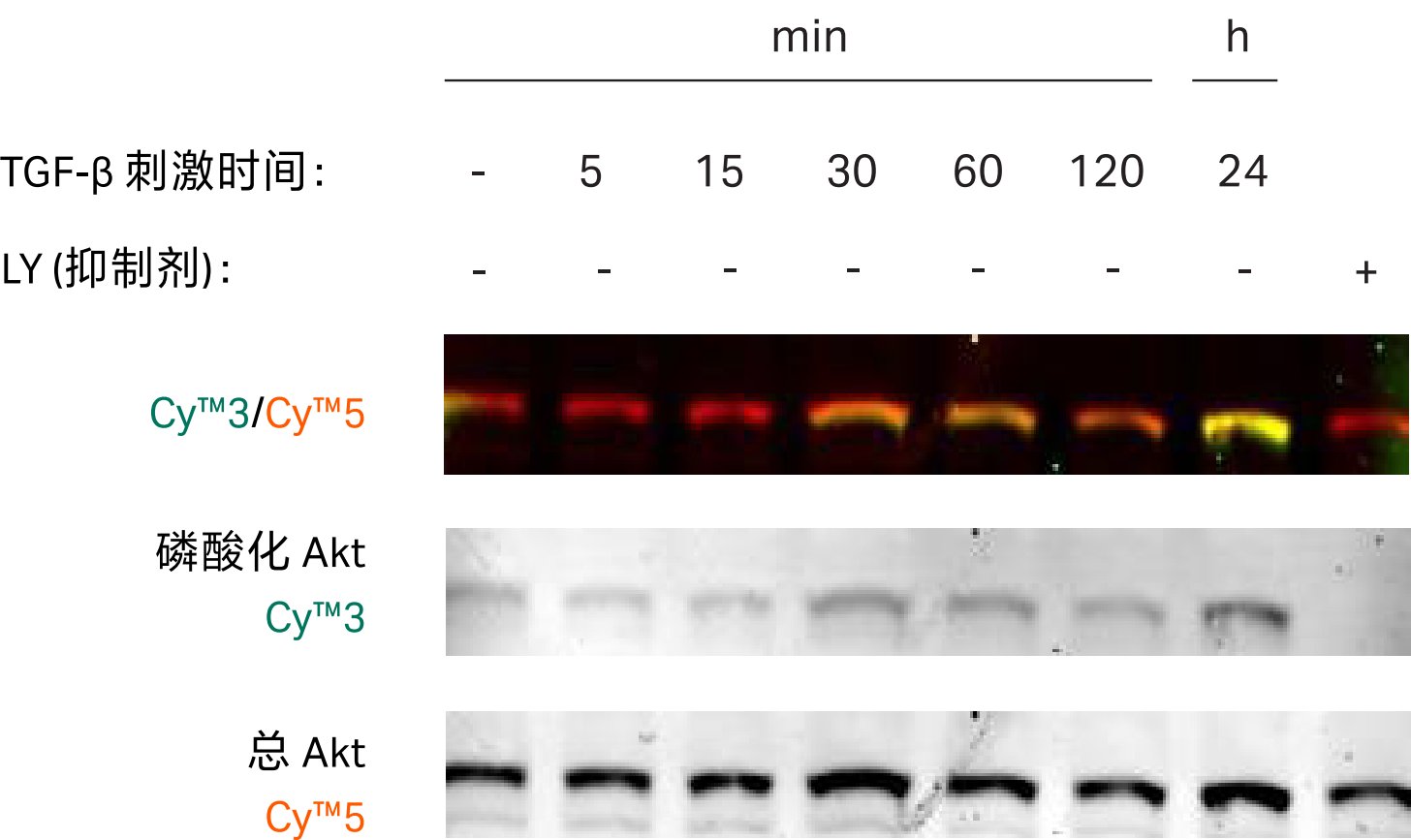


图 6.20. 使用 Amersham™ ECL Plex™ 检测人前列腺癌细胞在转化生长因子-β(TGF-β) 刺激后的低丰度磷酸化 Akt 蛋白和总 Akt 蛋白。尽管磷酸化导致的分子量变化极小，但 Amersham™ ECL Plex™ 仍能清晰区分两种形式的蛋白质。注意用激酶抑制剂 LY 处理的样本 Cy™3 通道完全没有信号。数据由瑞典乌普萨拉市路德维希癌症研究所的 Marene Landström 提供。

使用低荧光 Amersham™ Hybond™ LFP 0.2 PVDF 或 Amersham™ Protran™ Premium 0.2 硝酸纤维素膜可实现 Amersham™ ECL Plex™ 的最佳性能。Hybond™ P

0.45 也可用于荧光检测 (表 4.4)。封闭时，建议使用 Amersham™ ECL™ Prime 封闭剂或 BSA (牛血清白蛋白)，以减少背景噪音。应始终按照该生产商推荐的浓度稀释抗体，但根据 Amersham™ ECL Plex™ 的指导原则，一抗和二抗可分别按照 1:100 至 1:5000 和 1:1250 至 1:4000 的比例稀释。花时间优化不同的抗体浓度 (见附录) 是非常有必要的。

6.2.3 荧光提示和技巧

为了获得高质量的蛋白质印迹法结果, 以下几点应有助于解决与低信噪比有关的问题。

- 👉 使用 Amersham™ ECL Plex™ Cy™5 偶联的二抗检测样品中疑似最低浓度的蛋白质。Cy™5 发出的信号比 Cy™3 稍强。
- 👉 如果标记物发出的信号过强，盖过了低丰度蛋白质的信号，最好使用较少量的 Amersham™ ECL Plex™ 彩虹标记物 (1.5 μL)。如果可能，在标记物和样品之间的一条泳道中加入上样缓冲液。技巧：Cy™5 的激发和光谱与 CyDye™ 700 接近。由于光谱重叠，不建议在同一印迹中复用 Cy™5 和 CyDye™ 700。
- 👉 由于灵敏度和动态范围也是抗体-蛋白质对特性的函数, 因此优化一抗和二抗的浓度至关重要 (见附录)。
- 👉 使用荧光检测存在一定的风险, 因为荧光污染会导致背景信号不均匀。请确保所有材料都非常干净。
 - 请清除膜上残留的凝胶碎片。
 - 膜上若有溴酚蓝 (BPB) 会产生不必要的荧光信号。在转印到膜上之前, 请清除 SDS-PAGE 凝胶底部的所有 BPB。
 - 确保托盘、镊子和容器保持干净, 无考马斯蓝染色剂, 因为这也可能导致背景问题。
 - 避免用圆珠笔标记膜, 因为这会产生污染信号。剪下膜的一角, 并记下剪下的是哪个角!
 - 不要用手指处理印迹膜, 要使用干净的镊子进行处理。
 - 处理膜时应戴上无粉手套。实验室手套中使用的粉末会发出荧光, 也可能会散射光线, 从而干扰图像判读。
- 👉 如果出现许多明显的非特异性蛋白条带, 可尝试使用 Amersham™ ECL™ Prime 封闭试剂进行处理。这个问题往往与所选一抗有关。此外, 一抗的稀释度也会影响特异性——优化至关重要 (见附录)!

👉 在封闭液孵育一抗中有助于减少非特异性结合，增加信号强度。与在清洗缓冲液中稀释相比，在封闭溶液中稀释的某些一抗即使浓度低得多，也会产生更强的信号。

如果 Tween™-20 的浓度超过 0.1%，可能会明显增加 PVDF 膜上的背景。

👉 如果使用荧光基团偶联的抗体进行探测：

- 在避光试管中分装抗体。
- 在避光容器中稀释抗体。
- 进行二抗探测时注意避光。

👉 最后的清洗步骤是指在成像前用 PBS (或 TBS) 冲洗印迹膜以去除 Tween™-20。

07 成像

蛋白质印迹法工作流程中数据分析前的最后一步是图像捕捉。

增强化学发光 (ECL) 法主要基于添加的鲁米诺底物与辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗体之间的反应 (见第 6 章)。在有过氧化氢存在的情况下, HRP 会催化鲁米诺的氧化反应, 从而导致发光现象。然后, 可通过 X 射线胶片或电荷耦合设备 (CCD) 成像仪进行数字成像, 从而检测出光信号。

使用荧光检测时, 荧光基团会在一抗或二抗偶联。荧光基团通过特定波长的光激发后发光。光电倍增管 (PMT) 或 CCD 可用于收集发射的光并将其转换为电信号。然后对电信号进行数字化处理, 用于图像显示和分析。



7.1 数字成像

在蛋白质印迹法应用中，一般利用 CCD 成像仪或扫描仪进行数字成像，具体取决于检测系统发出的光的特性。在下一节中，我们将简要介绍这些成像系统及其适用于哪些不同的发射信号。

7.1.1 电荷耦合设备 (CCD) 成像仪

为化学发光是目前蛋白质印迹法中最常用的检测方法，但荧光检测的应用近来有所上升。传统的信号检测方法主要是通过 X 射线胶片，这种胶片灵敏度高，但线性动态范围有限。而 CCD 成像仪具有高灵敏度和较广泛的线性动态范围，可进行更精确的定量检测。此外，数字图像更易于处理、存档和分析。由于未使用胶片，因此不会产生化学废液，也不需要暗室。

如果配备了适当的滤光片和激发光源，CCD 成像仪还可用于印迹膜、染色凝胶或紫外线 (UV) 光/荧光应用的成像。成像场的光子信号由透镜组件收集 (图 7.1)。CCD 成像仪的工作原理是在芯片上收集光子，收集到的电荷被转换成与信号强度相关的数字信号。

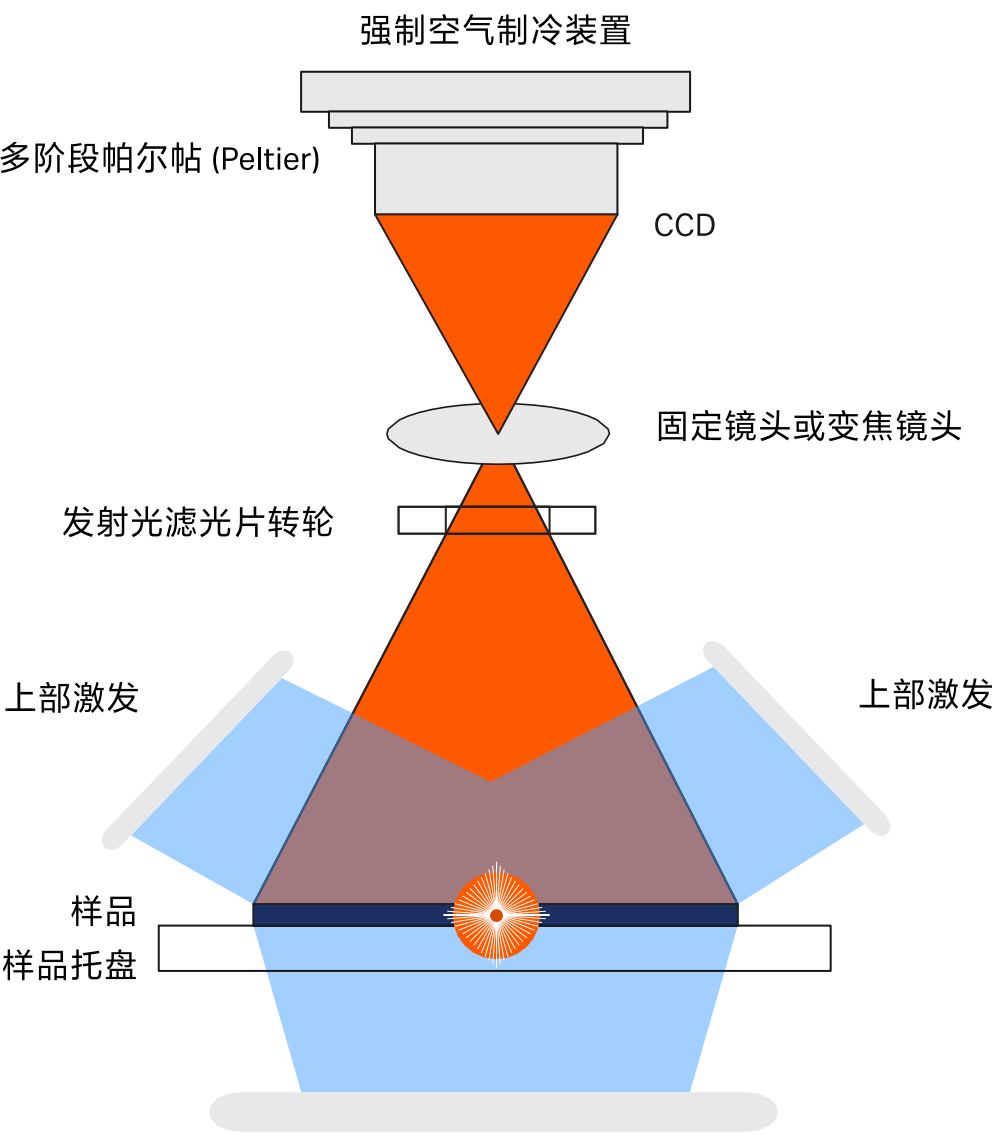


图 7.1. 常见 CCD 成像仪的组件。将 CCD 成像仪用于化学发光检测时，当酶作用于底物时，样品本身就是发光源。另一方面，荧光检测需要一个激发源；根据标签的性质，可以用多种方式照亮样品。可在光路中插入发射光滤光片，以选择特定波长并减少背景。该成像仪包括聚焦光学器件，能够维持图像的清晰度。

7.1.1.1 激发光源和光传输

对于可见光和荧光应用，照明或激发由紫外线或白光气体放电管、广谱氙弧灯或发光二极管 (LED) 提供。

7.1.1.2 光收集

透镜用于收集成像场的发射光。当与可调样品托盘一起使用时，透镜系统是固定的，或者具有变焦能力，可以在一个视图中捕捉不同尺寸的样品。不过，放大目标会降低灵敏度，因此最好使用高度可调整的样品托盘。最理想的是为膜成像预设焦距的系统，适用于不同的托盘摆位，并可为其他类型的样品调整焦距。

在荧光成像中，滤光片用于去除特定波长的多余发射光。虽然化学发光检测不需要滤光片，但高性能透镜可以优化图像质量。由于光源很弱，大光圈可以在更短的时间内收集更多的光。因此，光圈的直径尤为重要，光源越弱，光圈越宽。

7.1.1.3 系统性能

任何 CCD 成像仪的性能都是以分辨率、灵敏度和线性动态范围来衡量的。图像捕捉的分辨率与 CCD 的几何形状、透镜系统的质量、像素级别以及像素是否组合 (即像素合并) 以提高灵敏度有关。

CCD 阵列对光线、温度和高能辐射非常敏感。来自热能、宇宙射线和预放大系统的暗电流会产生噪音，影响仪器性能。CCD 的主动冷却能够大大降低噪音水平，提高灵敏度和线性度。不过，只有在捕捉检测系统 (如化学发光)发出的极少量光时，这一点才会影响最终成像。

CCD 成像仪的动态范围，即仪器产生与样品量相关的线性响应的信号范围，取决于光收集器和探测器。

7.1.1.4 Amersham™ ImageQuant™ 800 CCD 成像仪

Amersham™ ImageQuant™ 800 系统是新一代高灵敏度、坚固耐用的 CCD 成像仪，可用于拍摄高质量图像。它有四种不同的型号 (表 1)，是对凝胶、印迹、培养皿和多孔板等各种样品进行化学发光、荧光 (包括 RGB 和近红外) 和比色成像的理想选择。所有 Amersham™ ImageQuant™ 800 系统都改进了光学系统，并采用了新型的 SNOW(Signal-to-Noise Optimization Watch) 检测模式，从而提高了灵敏度和成像质量。

表 7.1.Amersham™ ECL™ start、ECL™、ECL™ Prime 和 ECL Select™ 适用于不同的蛋白质印迹应用，具体取决于所需的灵敏度和一抗的可用性。与不同滤膜的兼容性见表 4.4

应用	光源	ImageQuant™ 800	ImageQuant™ 800 UV	ImageQuant™ 800 OD	ImageQuant™ 800 Fluor
化学发光与彩虹分子量标记物叠加	n/a	√	√	√	√
凝胶成像	侧面白光	√	√	√	√
核酸胶	侧面 UV		√	√	√
光密度(OD)测量	透射白光			√	√
印迹的 RGB 荧光成像	侧面 RGB				√
印迹的红外短波和红外长波荧光成像	侧面红外短波， 侧面红外长波				√

7.1.1.5 SNOW 成像模式可降低噪音水平并获得卓越的图像质量

ImageQuant™ 800 配备了 SNOW 成像模式，这是一种新型曝光模式，可提供高灵敏度和优异的图像质量。在开发 SNOW 成像模式之前，成像系统的曝光时间要么是为了避免饱和 (如高表达蛋白)，要么是为了最大限度地放大微弱信号，从而限制了动态范围。此外，化学发光信号随时间的变化往往需要耗费大量时间对图像进行优化和分析。

7.1.1.6 SNOW 成像模式的工作原理

SNOW 检测模式可通过较短的曝光时间捕捉多幅图像，从而避免过曝，并能够对这些图像进行实时平均以减少噪点。用户可以跟踪图像不断更新的进度。所选目标区域的信噪比改善情况也会实时更新。此外，还可将 SNOW 成像模式设置为在达到最大信噪比时停止运行 (图 7.2)。这种方法提供了所需的灵敏度，可在较强信号不饱和的情况下检测到传统成像方法无法观察到的微弱条带。

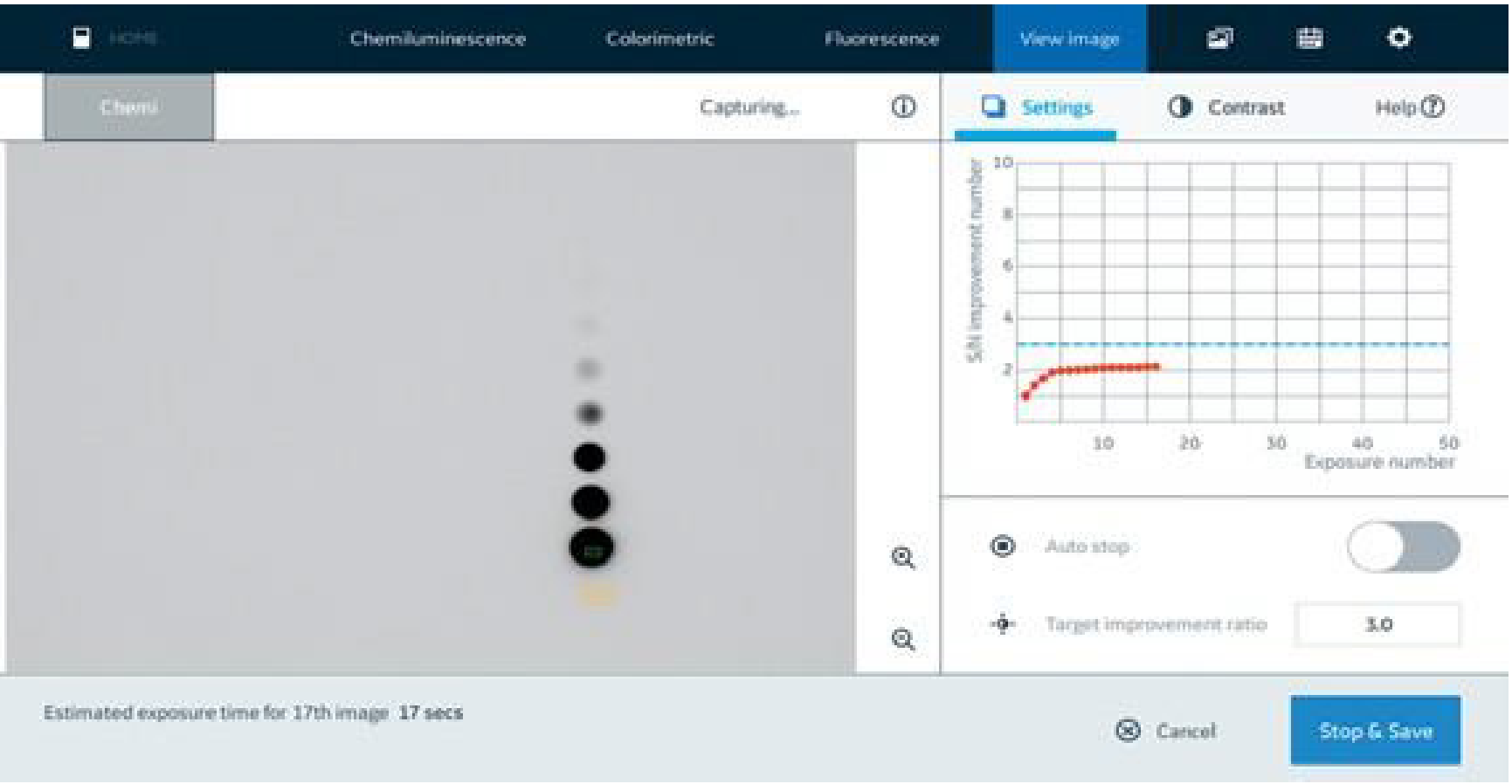


图 7.2. 观察 ImageQuant™ 800 系统在 SNOW 曝光模式下如何实时提高图像质量。SNOW 控制窗口显示所选目标区域的连续图像更新和信噪比优化的进度。SNOW 曝光模式可设置为自动停止或由用户自行停止。

SNOW 曝光模式的主要优势包括：

- 在不影响分辨率的情况下实现高灵敏度
- 降低噪音，检测出更多信号较弱的条带，而不会使印迹中的其他条带过曝
- 通过避免过曝来扩展线性动态范围
- 获取最佳图像时自动停止
- 省去优化曝光时间或捕捉设置的时间

7.1.2 扫描仪系统

7.1.2.1 激发源

用于检测荧光的扫描仪通常使用激光作为激发源。激光源会产生一束高度单色、相干和准直的窄光束。能量聚焦和窄光束宽度相结合，赋予了激光扫描仪出色的灵敏度和分辨率。CCD 成像仪使用的替代光源是 LED，它比激光器更小巧、更便宜，但输出波段宽、功率低。

7.1.2.2 光收集

扫描仪系统中用于光收集的光学器件的设计应确保有效收集尽可能多的荧光。在单通道或单标签实验中，发射光滤光片的设计往往只允许一个明确的发射光谱透过并被传输至检测器。同时应封闭任何剩余的杂散激发光或散射光（以及自体荧光）。

在多重实验或多重检测中，必须分别检测每个标签发出的光。滤光片的设置与标签的选择都应确保不同标签的光谱可以被区分开来，从而避免串扰问题。荧光发射经过过滤后，只剩下所需的波长，然后对光进行检测和量化。由于这个阶段的光强非常小，因此必须使用 PMT 来放大和检测光强。

7.1.2.3 系统性能

激光扫描仪系统的性能可以通过系统分辨率、线性动态范围、均匀性和灵敏度来衡量。

线性动态范围是仪器对样品量产生线性响应的信号范围，因此是准确定量的重要参数。具有宽线性动态范围的扫描仪可以在同一次扫描中检测并精确定量来自极低和极高强度目标的信号，同时不会达到饱和状态。大多数激光扫描仪的线性动态范围在 10⁴ 至 10⁵ 数量级之间。

整个扫描区域的均匀性是可靠定量的关键。特定的荧光信号在成像场内的任何位置都应产生相同的测量结果。

特别是移动头扫描仪，它能提供平面场照明，均匀收集整个扫描区域的荧光发射，还能降低光漂白的可能性，因为样品的所有单个部分在激发光源下的曝光时间都是最短的。

检测限 (LOD) 是指在已知置信水平下仪器可检测到的最小样本量。LOD 值更高的仪器分析所需的荧光样本更少，可以更精确地检测不同样本之间的微小差异。

7.1.3 荧光基团和滤光片

要产生荧光信号，射向样品的激发光必须在荧光基团的吸收光谱范围内。一般来说，激发波长越接近荧光基团的吸收峰值波长，激发效率就越高。荧光基团的主要吸收峰与可用的激发波长并不一定要完全匹配才能实现高效激发（图 7.3）。

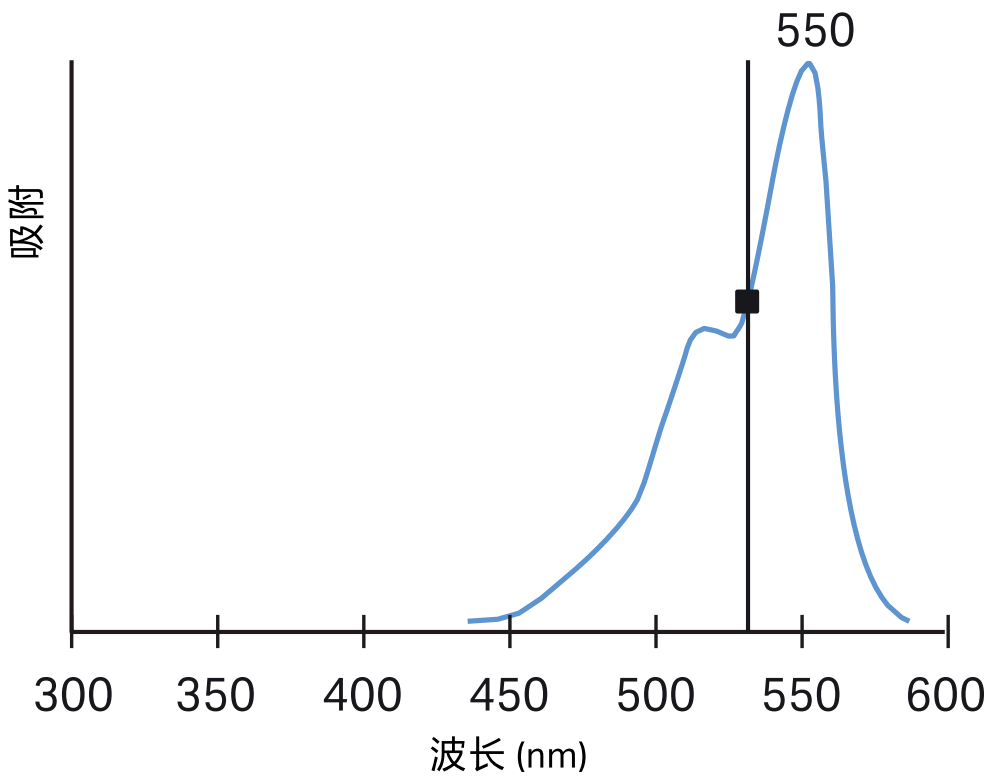


图 7.3. 使用 532 nm 激光激发 Cy™3。Cy™3 的吸收光谱与 532 nm 波长的激光线相重叠。

同样，选择一个能传输荧光染料发射峰或接近发射峰的波段的滤光片，通常能提高测量的灵敏度和线性动态范围（图 7.4）。

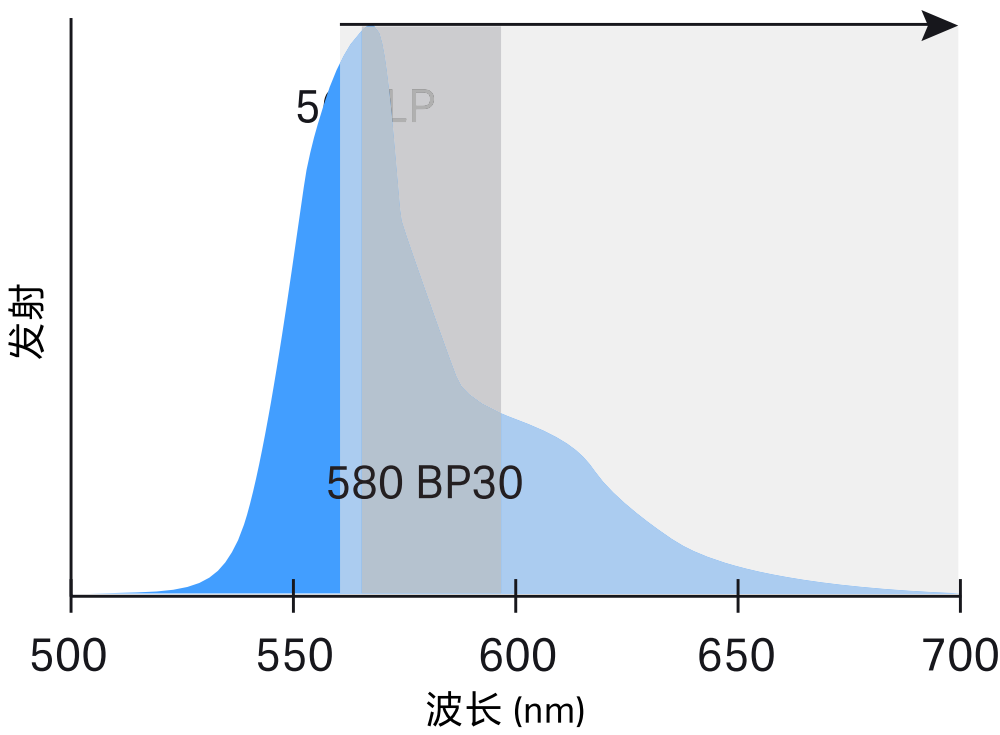


图 7.4. 使用 580 BP30 滤光片（深灰色区域）或 560 LP 滤光片（浅灰色和深灰色区域）对 Cy™3 荧光进行发射过滤。BP = 带通。LP = 长通。

通过多色成像技术, 可以使用具有不同光谱特性的荧光标签对多个目标进行检测和分辨。多色图像采集过程因成像系统而异。带有单个探测器的成像仪使用不同的发射光滤光片, 有时也使用不同的激发光来采集连续图像。如果有两个检测器, 则会同时收集来自两个不同标签的组合或混合荧光, 然后在信号到达检测器之前通过滤波将这种荧光区分开来。

实现双重检测需要一个分光器来对混合荧光信号进行光谱分割, 将产生的两束发射光分别引向不同的发射光滤光片 (每个荧光基团的最佳发射光滤光片), 最后引向检测器。然而, 发射轮廓之间存在一些光谱重叠几乎是不可避免的。为最大限度地减少交叉污染, 应选择发射峰分离良好的荧光基团, 并使用可对荧光基团发射轮廓进行合理光谱区分的发射光滤光片。为获得最佳结果, 应选择发射峰相距至少 30 nm 的荧光基团。

常用的光学发射光滤光片有两种:

长通 (LP) 滤光片能通过长于指定波长的光, 同时封闭所有较短波长的光。

带通 (BP) 滤光片允许一个选定波长的波段通过, 同时封闭所有较短和较长的波长。

7.2 使用胶片进行化学发光检测

在蛋白质印迹法中使用化学发光作为检测系统时, 可使用 X 射线胶片记录发射信号。X 射线胶片具有高灵敏度和灵活的曝光时间, 这可能是检测非常微弱的信号所需要的。然而, X 射线胶片在定量分析方面有其局限性, 因为如果要在同一张胶片上检测弱信号和强信号, 高强度信号往往会饱和。因此, 与用 CCD 成像仪进行分析相比, 该方法可测量蛋白质数量的线性动态范围要窄得多。使用 X 射线胶片进行检测时需要考虑的其他缺点包括需要处理产生的化学废液, 以及对暗室的要求。

X 射线胶片冲洗后, 必须生成数字图像, 以便在必要时或在图像发布时进一步用计算机进行分析。可以通过使用密度计扫描胶片或拍摄数码照片来生成数字图像。

针对蛋白质印迹法中的信号检测, 我们有多款商业产品可供选择, 如 Amersham™ Hyperfilm™ ECL™(表 7.1)。

表 7.2.推荐用于蛋白质印迹法成像的 Cytiva 旗下的胶片。

胶片	检测
Amersham™ Hyperfilm™ ECL™	化学发光
Amersham™ Hyperfilm™ MP	放射性同位素

Amersham™ Hyperfilm™ ECL™ 在检测低浓度蛋白质方面具有极高的灵敏度、出色的条带分辨率以及低强度条带的检测能力。此外, 该胶片还具有防静电层, 因此不会产生伪影, 并且由于背景清晰, 因此能生成出版级图像。Amersham™ Hyperfilm™ ECL™ 可与 Amersham™ ECL™、Amersham™ ECL™ Prime 和 Amersham™ ECL Select™ 搭配使用, 可在自动冲片机中冲洗, 也可使用大多数常见的 X 射线胶片显影剂和定影剂进行手动冲洗。

7.3 放射自显影

由于成本和安全问题 (如在放射性环境中工作、废液处理量大等), 在蛋白质印迹法应用中使用放射自显影作为检测方法的频率已大大降低。尽管存在这些问题, 但放射自显影术的灵敏度非常高, 而且与 Cytiva 公司提供的大多数激光扫描仪兼容, 因此在此对其进行简要介绍。放射自显影检测可使用 X 射线胶片或存储荧光屏进行。

7.3.1 X 射线胶片自显影

自从放射性同位素首次被用于标记生物分子以来, 利用胶片进行放射自显影便成为了一种检测方法, 延续至今。大多数放射性同位素的灵敏度有限, 但可以通过将发射的辐射转换成光来克服这一问题。然而, 虽然灵敏度有所提高, 但这会降低分辨率并在胶片上产生非线性反应, 这可能会导致对数据的误读, 尤其是在定量分析中。

7.3.2 存储荧光屏自显影

如果蛋白质印迹法需要非常高的灵敏度, 将放射性同位素与存储荧光屏 (也称为成像板) 结合使用是理想的做法。存储荧光屏可重复使用, 不会因反复暴露于实验室的发射水平而导致性能退化, 除非您使用的是氚和氚屏。样品与存储荧光屏接触 (使用曝光盒避光)。当屏幕上的晶体被激发到高能态时, 就能在屏幕上捕捉到放射性同位素的位置。然后, 将这块屏幕放在成像仪中, 并暴露在红色光源 (如激光) 下, 这样就能破坏晶体的稳定性, 使其恢复到基态, 从而释放出较短波长的光, 可通过适当的滤光片和检测系统进行捕捉。这一过程被称为光激励发光 (PSL)。

7.4 检测系统和成像仪兼容性

表 7.3 列出了 Cytiva 提供的检测试剂和推荐的图像捕捉系统。

表 7.3.Cytiva 检测系统以及与各种成像方法的兼容性。

	检测方法	成像仪
化学发光	Amersham™ ECL™	X 射线胶片/CCD 成像仪
	Amersham™ ECL™ Prime	CCD 成像仪/X 射线胶片
	Amersham™ ECL Select™	CCD 成像仪/X 射线胶片
荧光	Amersham™ ECL Plex™ CyDye™	激光扫描仪/CCD 成像仪 ¹
		激光扫描仪/CCD 成像仪 ¹
显色	考马斯™ 蓝染色银染	CCD 成像仪 CCD 成像仪
放射性同位素	放射自显影	激光扫描仪/X 射线胶片

¹ 配备适当的光源和发射光滤光片。

08 分析

使用 X 射线胶片、扫描仪或基于电荷耦合器件 (CCD) 成像仪的成像仪检测信号，可在膜图像上形成一条或多条可见蛋白质带。可通过与标记蛋白质的比较来估算蛋白质的分子量，蛋白质的含量还可通过条带强度（在检测系统的限制范围内）来确定。在某些应用中，只需确认蛋白质的存在并粗略估计其数量即可。然而，许多应用需要进行定量分析，以确定蛋白质的相对或绝对水平。本章旨在为蛋白质印迹分析以及如何在蛋白质印迹实验中实现精确定量提供一个指南。



8.1 定量蛋白质印迹

蛋白质印迹法长期以来被用于定性蛋白质分析，以确认蛋白质的存在，并大致估计蛋白质的量。然而，高灵敏度检测试剂的发展以及先进的成像技术使蛋白质印迹成为定量蛋白质分析的潜在工具。在进行定量蛋白质印迹法时，应考虑的一些重要因素包括：

- 灵敏度
- 线性动态范围
- 信号稳定性
- 归一化
- 信噪比

8.1.1 灵敏度

在蛋白质印迹法中，灵敏度被定义为使用现有检测系统可检测到的最小蛋白质量 (见第 6 章)。灵敏度受多种因素影响，如抗体质量、抗体浓度、检测方法和曝光时间。

有两个常用术语可以用来定义检测灵敏度: 检测限 (LOD), 指在特定检测中能“看到”的最小蛋白质量。它通常低于可用于可靠精确定量的信号强度下限, 即定量限 (LOQ)。

LOQ 由信噪比决定 (见 8.1.5)。

8.1.2 线性动态范围

线性动态范围是指信号强度与印迹上蛋白质数量成正比的范围，因此可以在整个范围内精确定量。过量的蛋白质或高浓度的抗体，以及过长的曝光时间，都会导致信号饱和，不再与蛋白质浓度成正比，因此必须排除在分析之外 (图 8.1)。动态范围也受 LOD 的影响：LOD 低 (灵敏度高) 的检测系统结合对强信号和弱信号的精确定量，可提供线性动态范围较宽的检测。

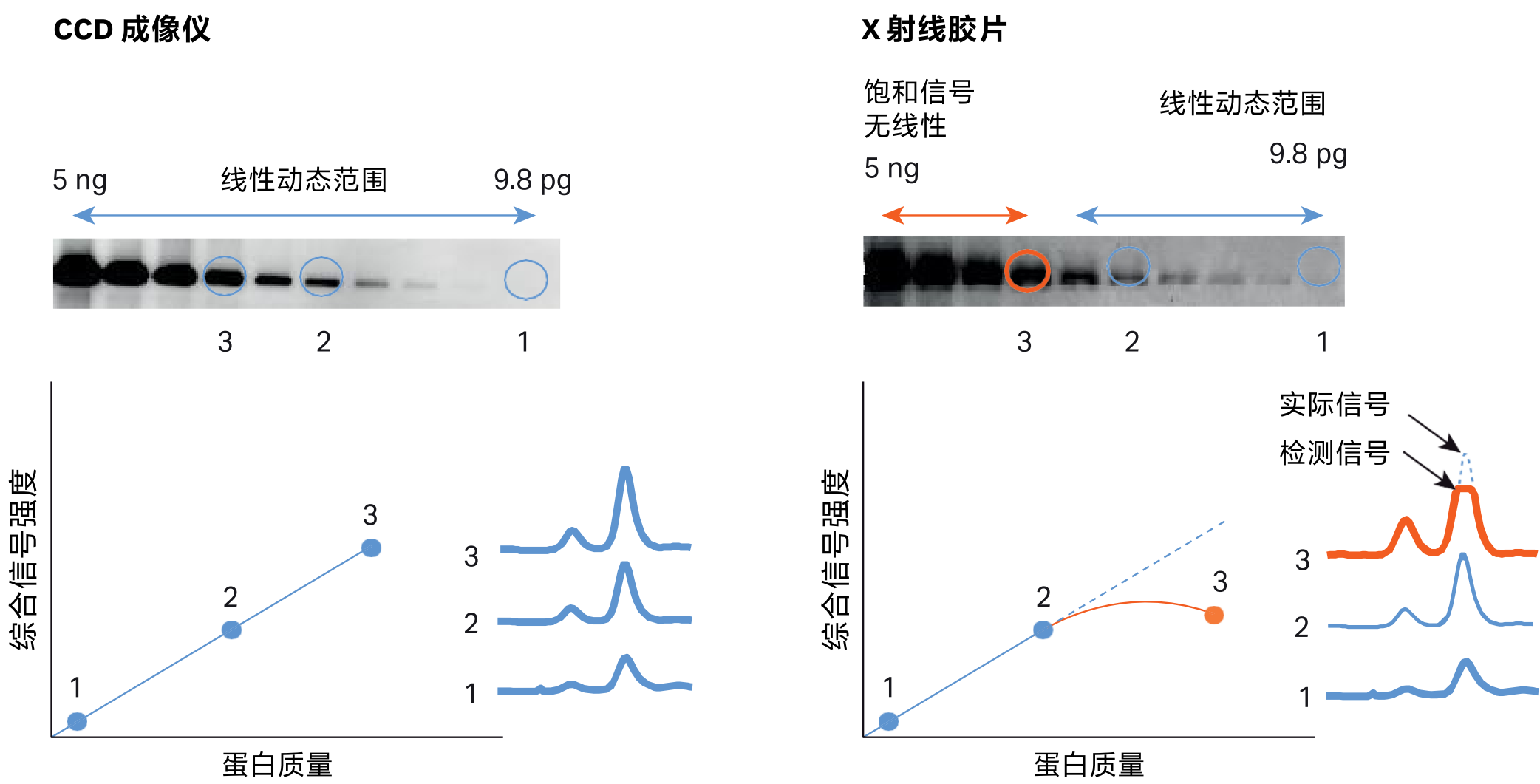


图 8.1. 与 X 射线胶片相比, 使用 CCD 成像仪进行信号检测的优势。对于基于 CCD 成像仪的系统来说, 所有条带都在系统的线性动态范围内, 而对于胶片来说, 最强烈的条带 (表示更多的蛋白质) 已经饱和, 使得曲线的对应部分无法定量, 因为已无法确定曲线下的体积。

对于化学发光检测, 胶片具有高灵敏度, 但动态范围有限。为了获得胶片的最佳灵敏度, 需要延长曝光时间, 但这会导致高丰度蛋白质信号饱和, 从而导致线性动态范围变窄。

CCD 成像仪 (见第 7 章) 除了能够不断提高灵敏度外, 还能在比胶片更宽的线性动态范围内进行定量。不过, 如果预期信号强度的变化很小, 或者您的目的只是为了进行定性分析 (样品中是否存在蛋白质), 那么线性动态范围较窄也是可以接受的。

对于荧光检测, 无论是基于 LED-CCD 的成像仪, 还是基于激光-PMT 的扫描仪, 都能提供高灵敏度和宽动态范围的图像数据采集。基于激光-PMT 的扫描仪通常比 CCD 的动态范围更广。

8.1.3 信号稳定度

在进行蛋白质印迹法定量检测时，最好使用信号稳定性高的检测系统，因为这会影响线性动态范围。如果使用信号稳定的检测试剂，那么达到高灵敏度的时间窗口会更长。这样就可以进行多次曝光，并有可能检测到单次短暂曝光可能会漏掉的信号较弱的条带。

重要的是要区分信号的“稳定性”和“持续时间”。例如，化学发光检测系统基于酶促反应，信号强度会随着时间的推移而降低。这意味着，化学发光无法与 Amersham™ ECL Plex™ 等荧光检测系统的信号稳定性（信号随时间变化保持稳定，重现性高）相媲美。不过，化学发光试剂（如 Amersham™ ECL™ Prime（图 8.2））的信号持续时间长，允许多次曝光而不会有信号明显降低的风险，这是许多蛋白质印迹法定量应用的先决条件。

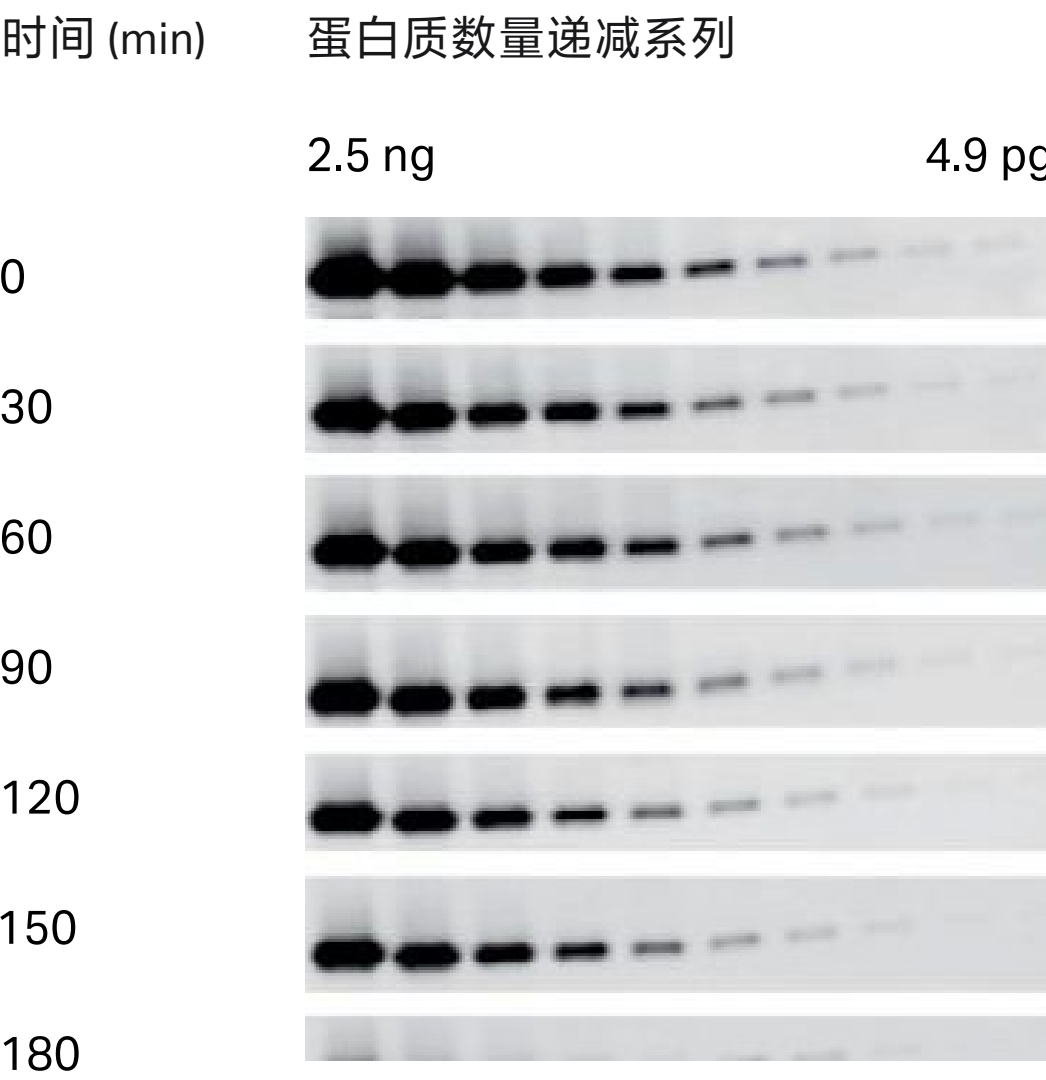


图 8.2. 在添加试剂后的 3 小时内, 每隔 30 分钟捕捉一次图像, 曝光时间均为 3 分钟, 以监测 Amersham™ ECL™ Prime™ 的信号持续时间。即使在 3 小时后, 大部分条带仍可检测到, 并可进行精确定量。

8.1.4 归一化

要通过蛋白质印迹法准确地量化蛋白质水平，应将相关蛋白质水平归一化为上样对照。这样就可以免受上样不一致或样品中蛋白质浓度不同等误差而导致的各泳道间蛋白质总量发生变化的影响。如果样品是细胞裂解液，一种内源性的、未调节的“管家”蛋白通常被用作内参（图 8.3 和图 8.4）。另一种方法是将目标蛋白质与印迹上每个泳道检测到的总蛋白量关联起来。

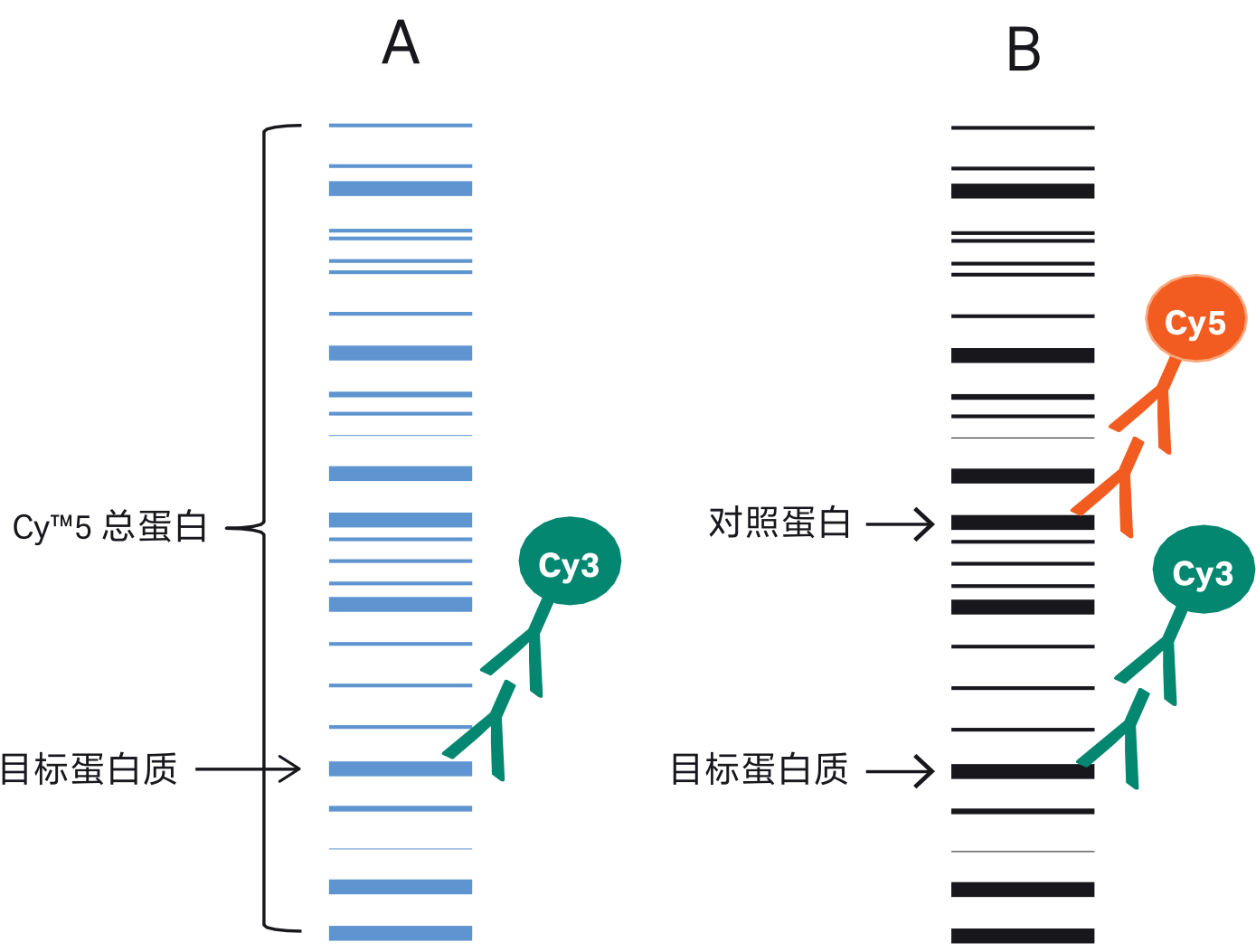


图 8.3. 将目标蛋白质归一化为上样对照。使用荧光报告剂 (Cy™3) 或 ECL™ 检测目标信号。上样对照可以通过 Cy™5 预标记、转印后的膜蛋白染色 (A) 或肌动蛋白、微管蛋白或 GAPDH 等管家蛋白(B)获得的总蛋白条带的总和。首先, 使用分析软件计算每个信号的强度。将目标蛋白质的测量值与上样对照的相应值关联起来进行归一化。

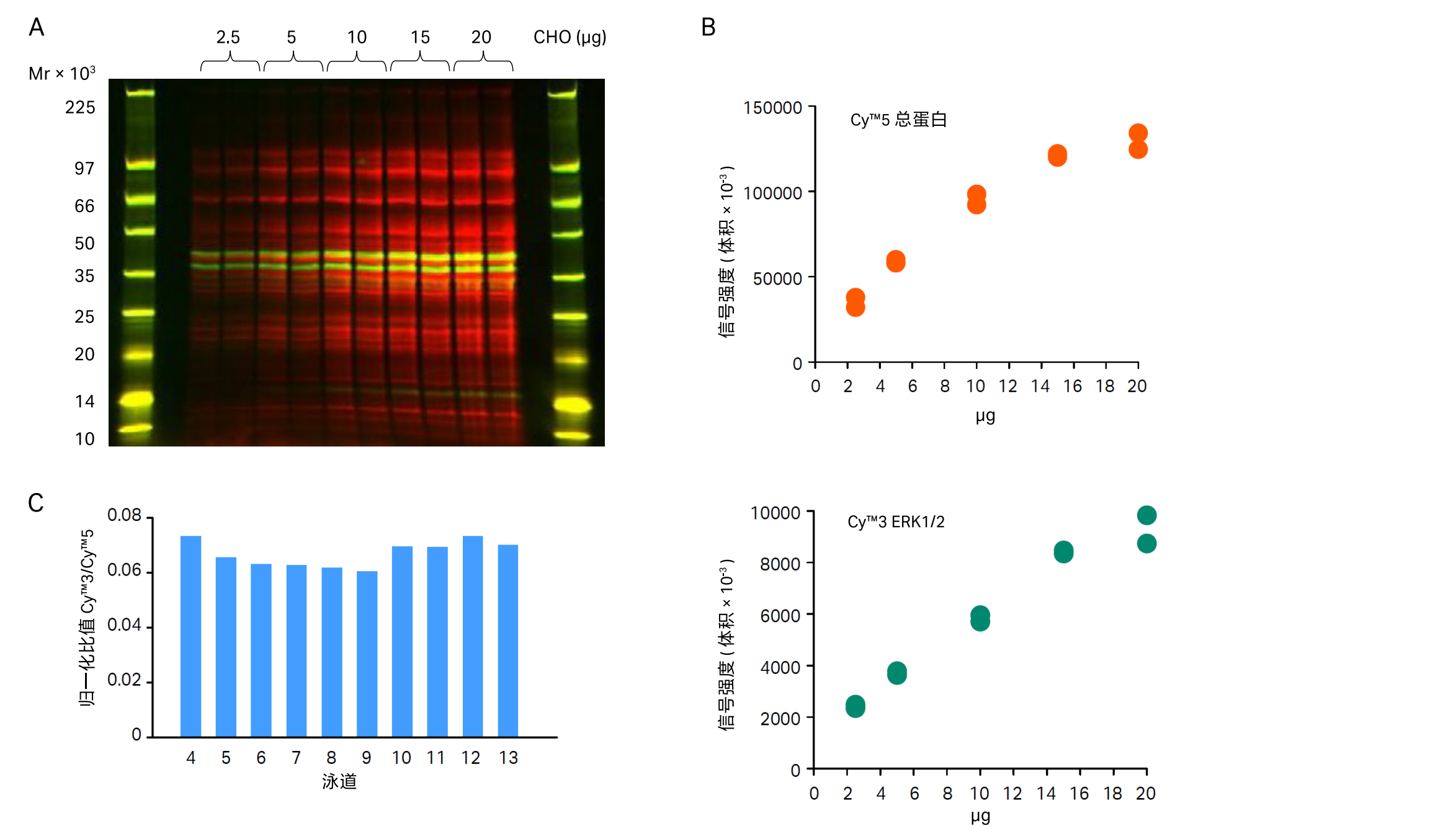


图 8.4. 使用 Cy[™]5 总蛋白荧光染色进行归一化处理。用 Cy[™]5 预先标记不同量的相同 CHO 细胞裂解液并进行蛋白质印迹法检测。用抗 ERK1/2 一抗和 Cy[™]3 标记的二抗对膜进行探测 (A)。目标 Cy[™]3 和对照 Cy[™]5 信号成正比 (B)，Cy[™]3/Cy[™]5 的归一化比值 (C) 如预期一样，尽管上样量差异很大，但在相同样品中相似。

增强化学发光 (ECL[™]) 检测法让您能通过一次实验检测同一印迹上的两种蛋白质，只要它们的分子量差异足够大，便可以通过电泳进行区分 (图 8.5)。该方法需要对一抗进行预筛选，以排除交叉反应的问题。如果出现分子量相似或交叉反应的情况，则有必要进行剥离和重新检测，以测定管家蛋白和目标蛋白。然而，剥离可能会导致膜上目标蛋白质的损失，损失数量不明，从而导致错误的结果 (详见第 5 章)。

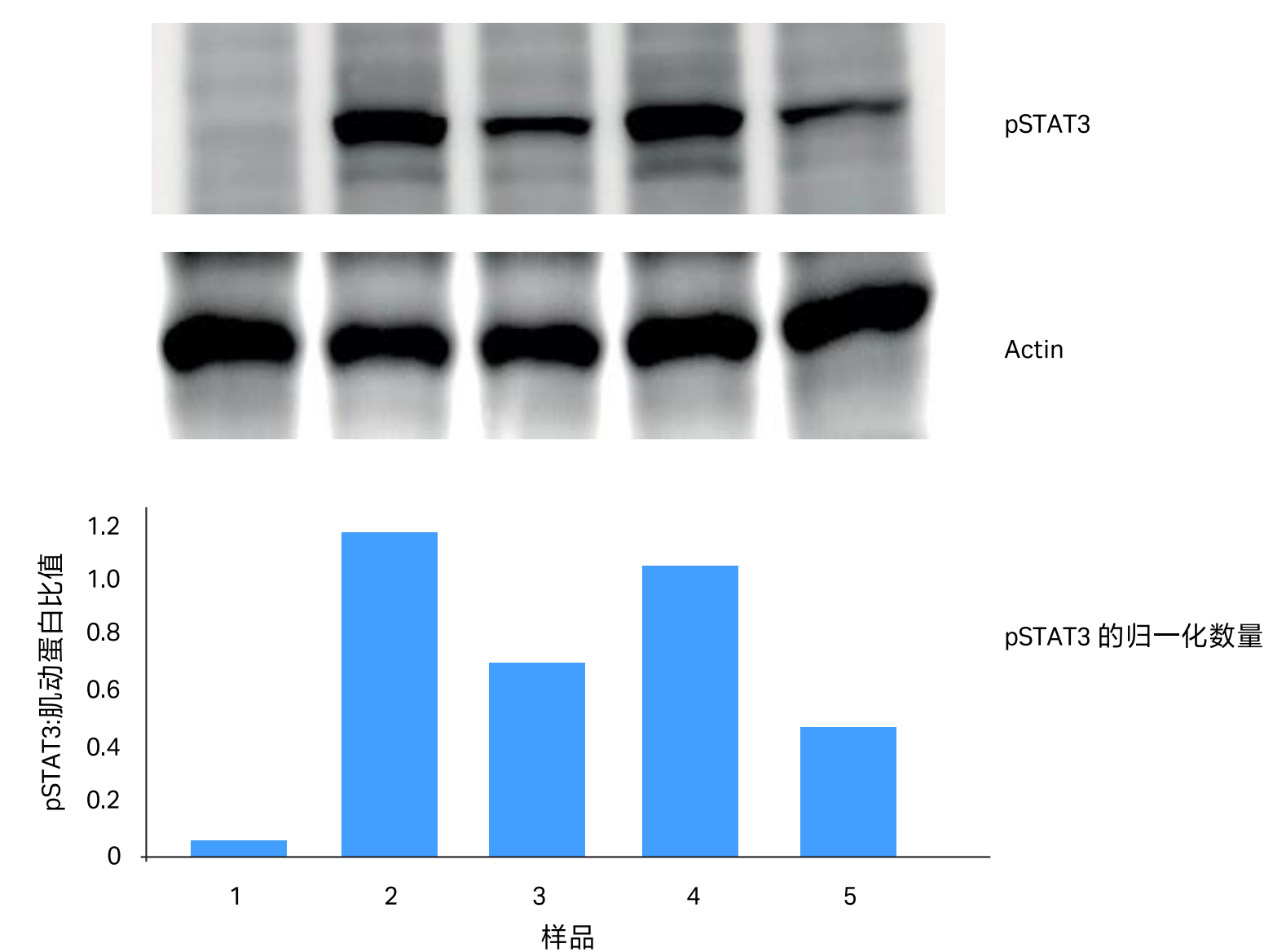


图 8.5. 使用蛋白印迹法检测五种不同 HeLa 细胞裂解液中 Tyr 705 磷酸化的 STAT3(pSTAT3)。在每种裂解液中，pSTAT3 水平的定量都是以 Actin 作为管家蛋白进行归一化后进行的。使用 Amersham[™] ECL[™] Prime 和 ImageQuant[™] LAS 4000 mini(现已被 Amersham[™] Image 600 系列 CCD 成像仪取代) 进行检测，并使用 ImageQuant[™] TL 软件进行分析。

通过使用 Amersham[™] ECL Plex[™] 作为检测系统进行多重荧光蛋白质印迹，可以在同一印迹上同时检测两种目标蛋白质。因此，在通过管家蛋白进行归一化后，就可以轻松地对蛋白质进行定量 (图 8.6)。该系统能够检测分子量非常相似甚至相同的蛋白质。此外，Amersham[™] ECL Plex[™] 经过优化，可将与不同 CyDye[™] 偶联的二抗之间的交叉反应降至最低。

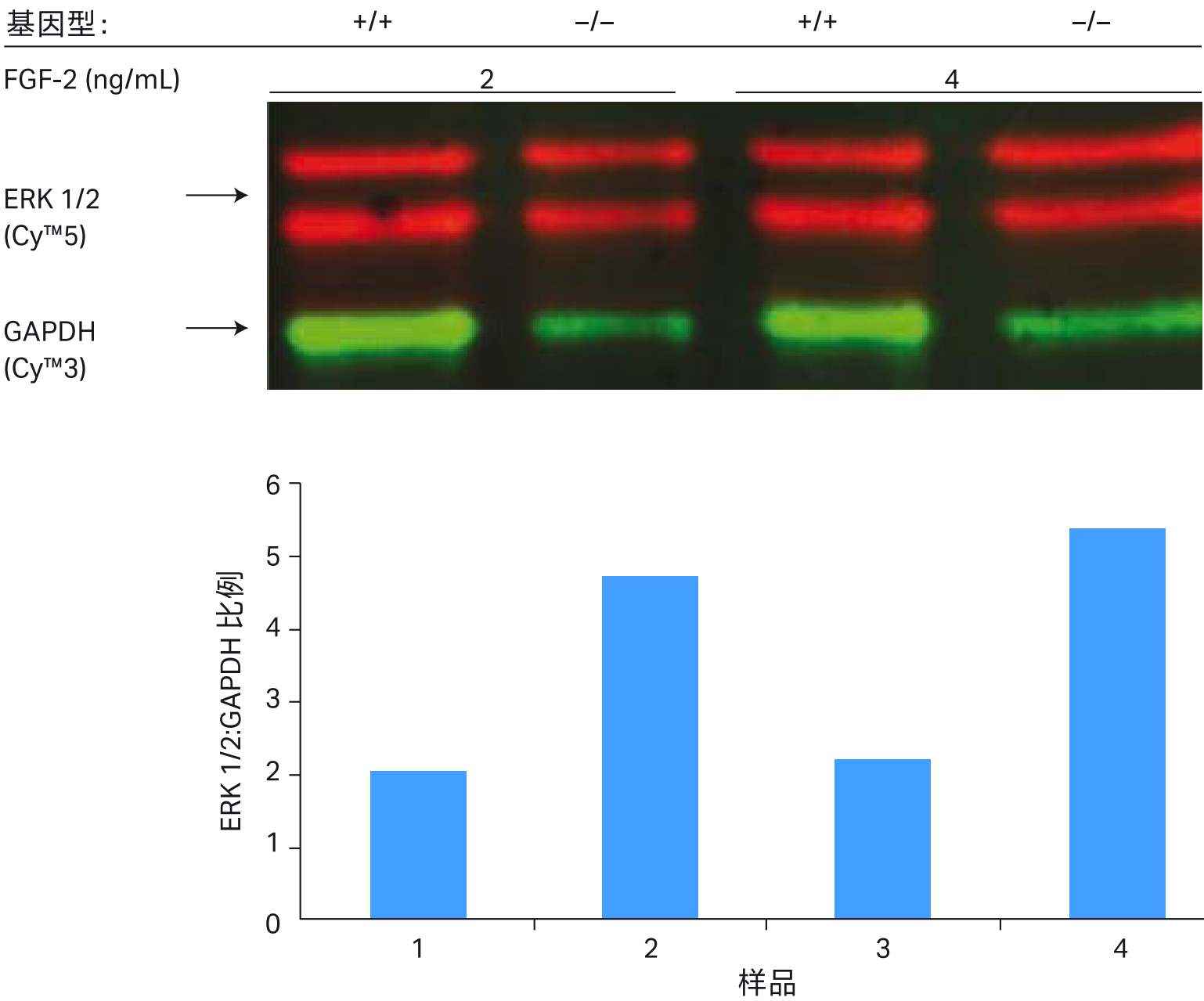


图 8.6. 在这种多重蛋白质印迹法中，ERK 1/2 和管家蛋白 GAPDH 的一抗被同时用于探测印迹膜。将信号与 GAPDH 信号相关联，可以看出凝胶各泳道的蛋白量，从而量化 FGF-2 处理对 ERK 1/2 的实际影响。+/+ 表示野生型细胞，-/- 表示基因敲除细胞中缺乏可能参与调节 ERK 1/2 的酶。数据由瑞典乌普萨拉大学医学生物化学和微生物学系 Jin-Ping Li 博士和 Juan Jia 博士提供。

8.1.5 信噪比

在成像过程中 (第 7 章)，印迹或凝胶上存在的蛋白质会产生一定强度的信号，该信号会被记录下来进行分析。不过，要正确量化蛋白质，必须考虑特定信号和背景 (不必要的相互作用产生的信号)。背景包括与其他蛋白质结合的一抗或膜和封闭剂的选择，以及噪音 (系统产生的信号)。信号峰一般与蛋白质条带相对应，峰下但高于背景水平的面积与蛋白质的数量成正比 (图 8.7)。

胶片的密度分析是对 ECL™ 介导的检测进行定量的灵敏方法。然而，当信号饱和度远远低于 CCD 成像仪继续产生与蛋白质数量成比例的信号时，极低水平的高精度定量就会受到负面影响。换言之，胶片提供的线性动态范围比 CCD 成像仪窄得多。此外，将微弱信号放大到可检测水平所需的曝光时间往往会导致高背景信号，从而掩盖相关蛋白质的信号。

背景和噪音会降低信噪比，从而降低蛋白质印迹法的灵敏度和检测限。背景过高会降低信噪比 (图 8.8)，对线性产生负面影响，导致定量不精确。

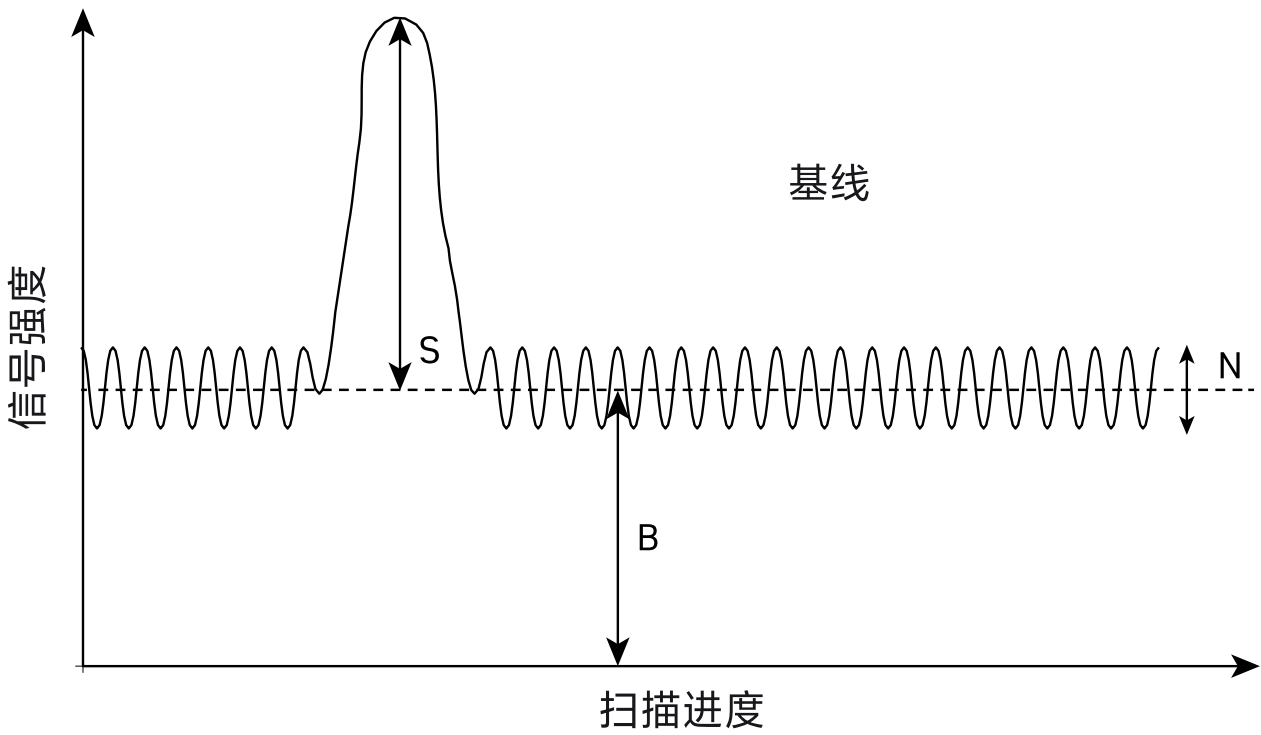


图 8.7. 信号检测的基础。B = 背景，N = 噪音，S = 信号。

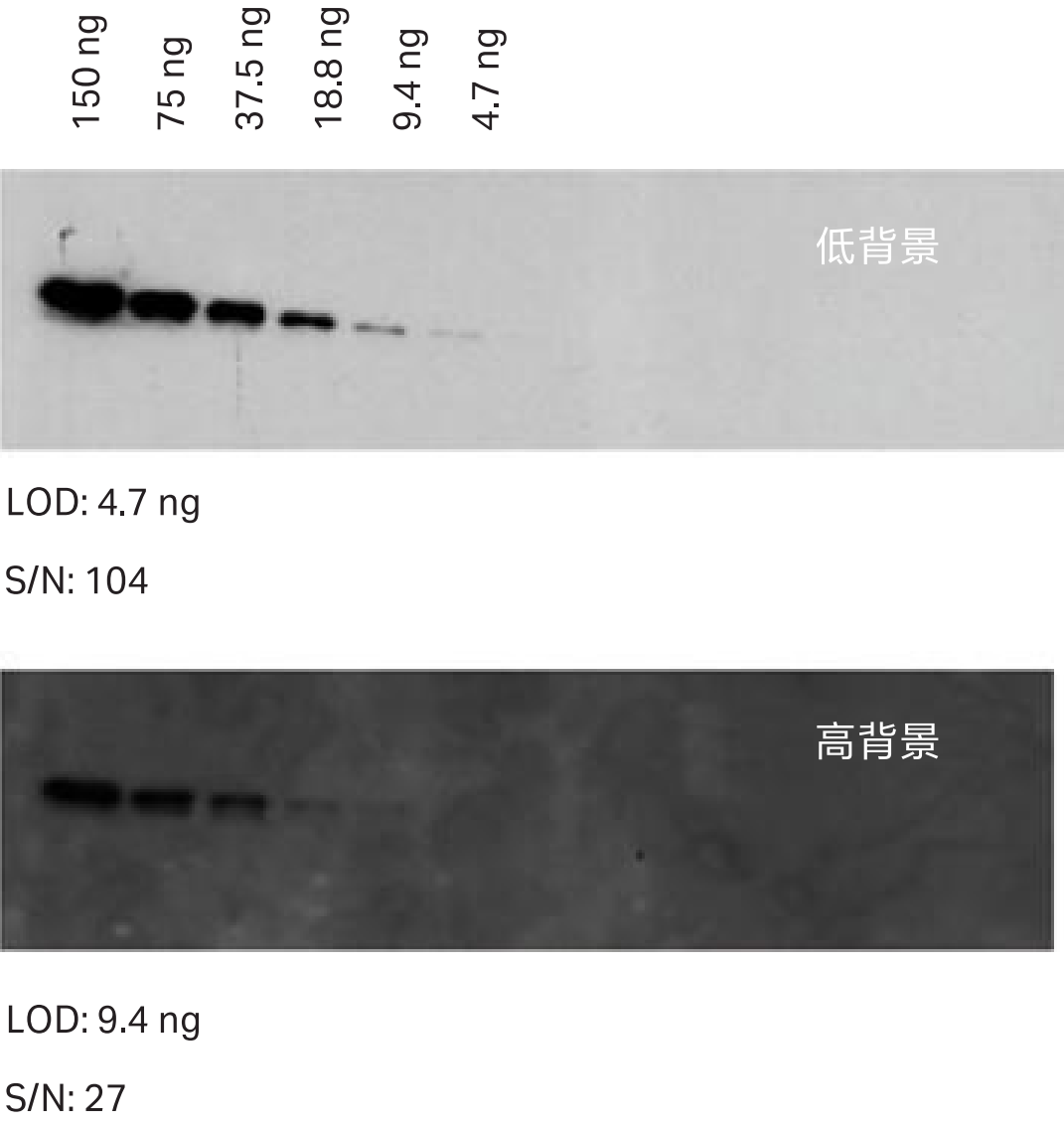


图 8.8. 图 8.8.使用 Amersham™ ECL™ 在印迹上检测经过一系列两倍稀释的肌动蛋白。背景水平升高对信号定量的一些重要影响。上图所示信号是使用优化的抗体浓度得到的。下图所示信号未进行优化。结果是背景升高，影响了 LOD 和信噪比。

8.1.6 SNOW 成像模式可降低噪音水平并获得卓越的图像质量

ImageQuant™ 800 配备了 SNOW 成像模式，这是一种新型曝光模式，可提供高灵敏度和优异的图像质量。在开发 SNOW 成像模式之前，成像系统的曝光时间要么是为了避免饱和 (如高表达蛋白)，要么是为了最大限度地放大微弱信号，从而限制了动态范围。此外，化学发光信号随时间的变化往往需要耗费大量时间对时间序列图像进行优化和分析。

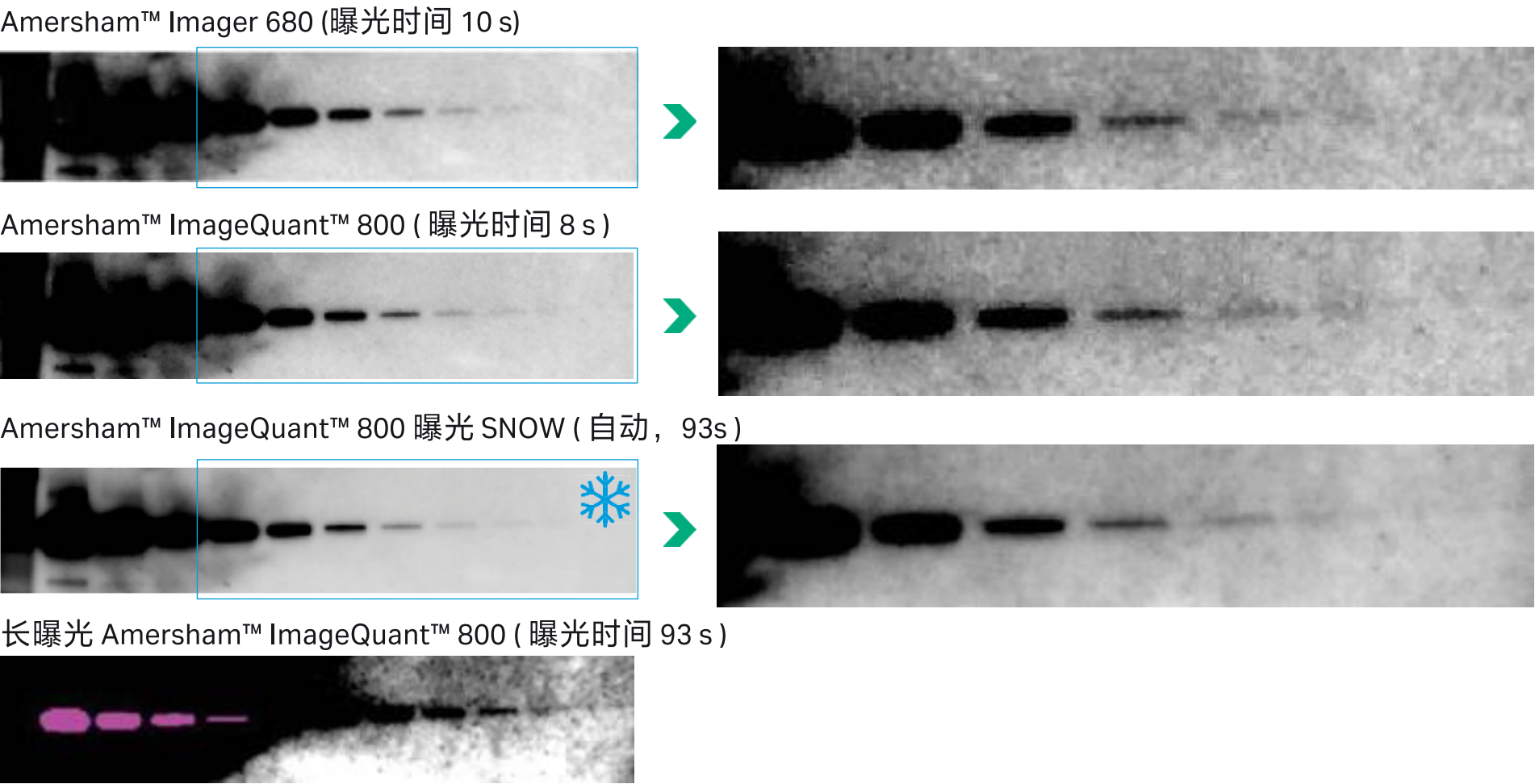


图 8.9. 化学发光模式下的智能 SNOW 检测算法通过成像信号较弱的条带同时避免高强度条带的饱和，极大地改进了动态范围和图像质量，从而实现了**对强弱条带的精确定量**。

样品：	牛血清白蛋白
膜：	Amersham™ Hybond™ P PVDF 0.2
一抗：	小鼠单克隆抗 BSA 抗体 1:25 000
二抗：	抗小鼠 IgG-1:300 000
封闭缓冲液：	蛋白质印迹法封闭缓冲液 (鱼明胶)
化学发光检测试剂：	ECL Select™ (RPN2235)
成像：	Amersham™ ImageQuant™ 800 上化学发光模式下的 SNOW 成像
托盘位置：	上层
鉴定：	默认值，5×5

SNOW 成像的原理：

SNOW 检测模式可通过较短的曝光时间捕捉多幅图像，从而避免饱和，并能够对这些图像进行实时平均以减少噪点。用户可以跟踪图像不断更新的进度。所选目标区域的信噪比改善情况也会实时更新。此外，还可将 SNOW 成像模式设置为在达到最大信噪比时停止运行。这种方法提供了所需的灵敏度, 可在较强信号不饱和的情况下检测到传统成像方法无法观察到的微弱条带。

SNOW 模式的成像过程包括以下步骤：

- 图像捕捉前曝光, 确定最佳曝光时间
- 选择感兴趣的区域和背景
- 多次自动曝光, 连续平均, 以找出最佳信噪比

SNOW 成像模式与其他自动曝光模式的不同之处在于，它通过捕捉多个图像并持续平均信号来实现最终成像。这种图像平均化过程可有效减少随机噪声，从而提高信噪比 (图 8.10)。

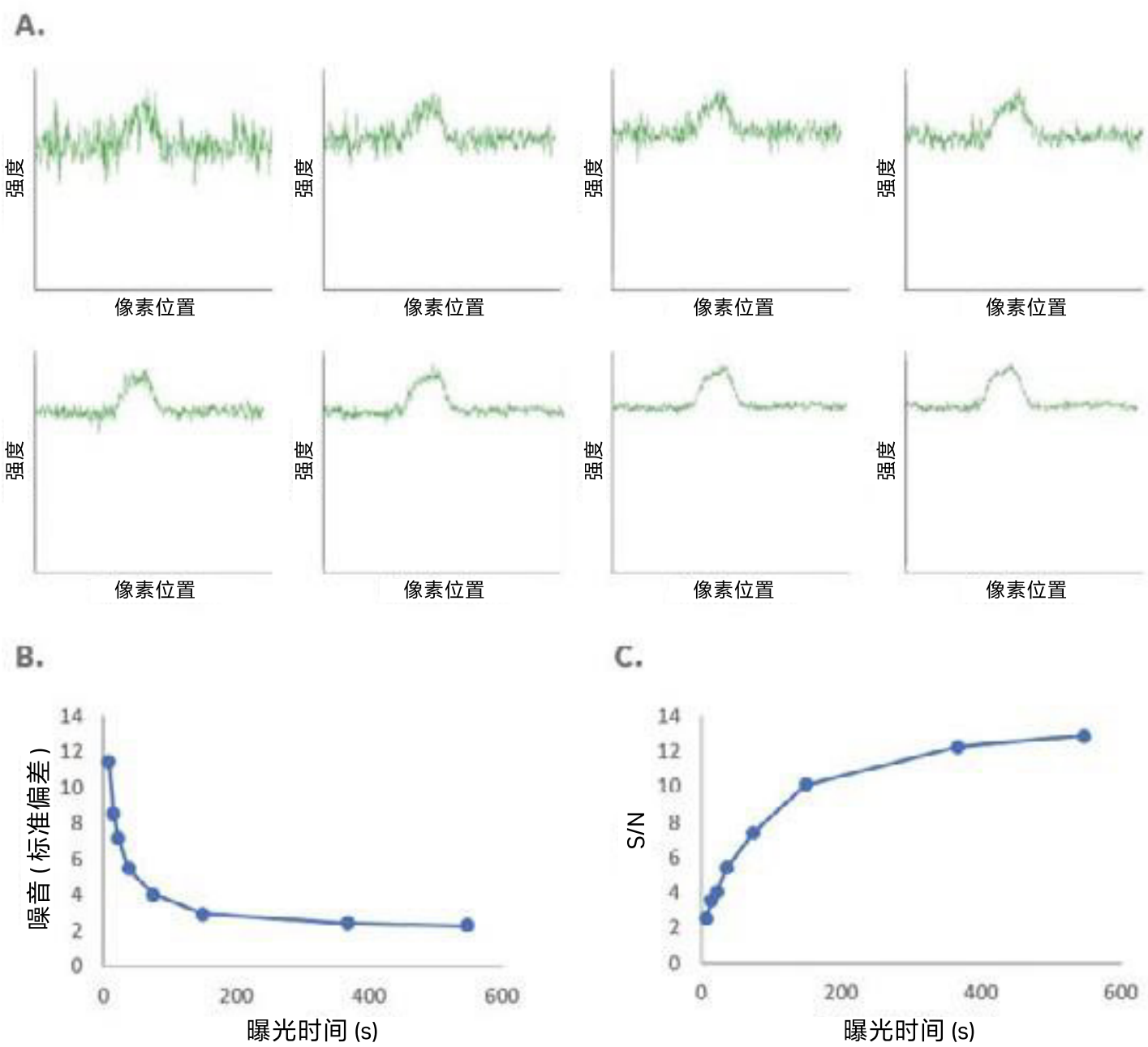


图 8.10. 通过 SNOW 算法捕捉图像并进行平均处理，可减少噪音，最大限度地提高信噪比。(A) 使用 SNOW 算法连续平均 7.5 秒曝光的线剖面图，从第一次捕捉到捕捉 73 次后的平均值，显示为 (B) 噪声减少，信号稳定，导致 (C) 信噪比提升。

8.2 分析软件

使用成像设备进行图像采集时，会为分析的每个样本创建一个或多个数据文件。有多种软件可用于显示图像、调整对比度、注释和打印图像。此外，图像分析软件还可区分片段大小，并进行定量、匹配和模式分析，然后生成分析报告。

ImageQuant™ TL 是一款高性能、易于使用的图像分析软件，适用于对各种生物样本的图像进行定量分析。该软件包括四个不同的模块，分别是：一维凝胶电泳分析、阵列分析、菌落计数/二维斑点分析以及通用图像分析工具箱。该软件提供的工具可通过用户定义的区域 (面积) 信号集成或使用泳道剖面 and 峰值分析 (面积) 进行定量。分析报告与 Microsoft Excel® 动态链接。

8.1.1 ImageQuant™ TL 软件的主要特点

ImageQuant™ TL 软件可用于对蛋白质印迹法进行手动定量，不过也可以使用几种背景计算方法中的一种自动检测条带。其中一个分析模块如图 8.11 所示。

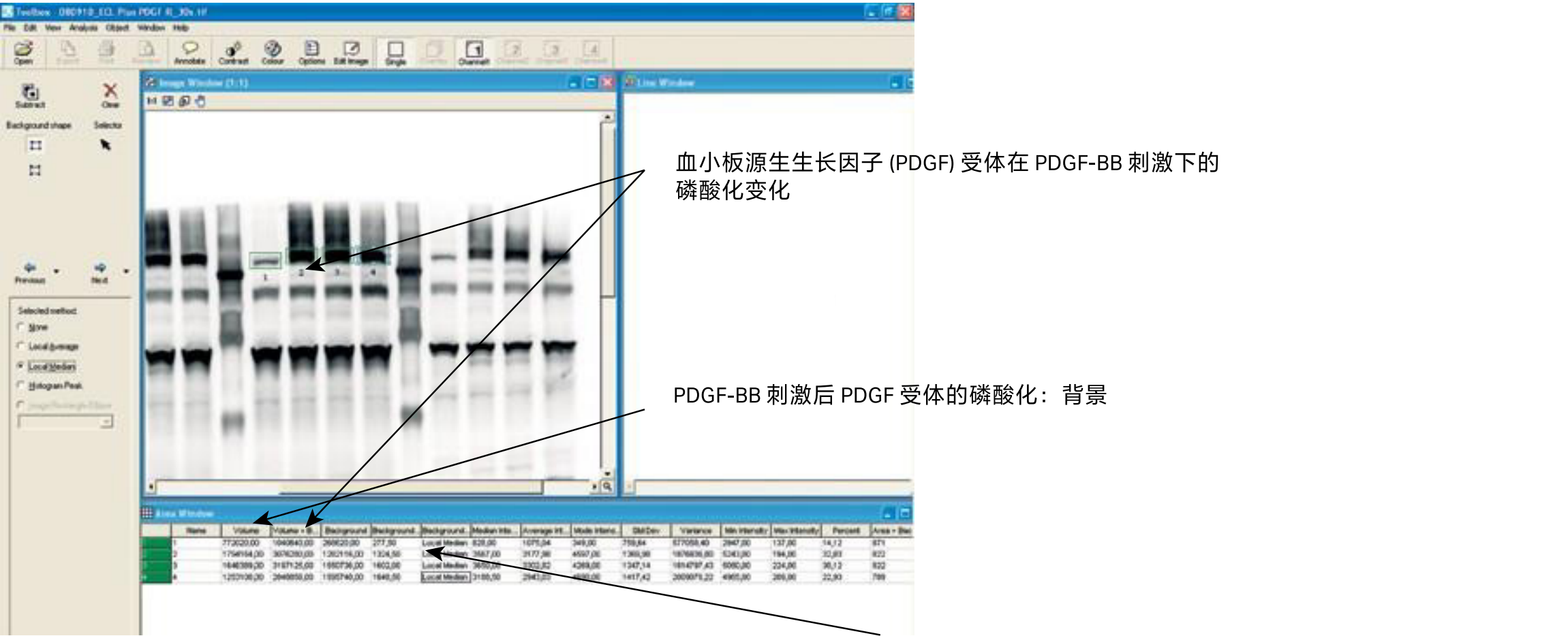


图 8.11. 使用 ImageQuant™ TL 软件计算 PDGF-BB 刺激后，PDGF 受体磷酸化随时间的相对增加。该截图显示了如何在工具箱模块中计算感兴趣波段的总强度。您可以选择要确定强度的波段，并自动减去背景。在本例中，测定了 PDGF 刺激后不同时间点 PDGF 受体磷酸化的总条带强度。从所有数值中减去背景值，数据可轻松导出到 Microsoft Excel® 进行进一步计算。

自动分析一维凝胶电泳图像

用于分析一维凝胶，包括多层次的分析。如果分析需要后续完善，可以查看每个阶段并进行调整。

精确测定分子量

用于绘制分子量曲线并通过 Rf 值来校正因凝胶变形而引起的分析误差。

条带定量

用于一维凝胶的数据定量，包括条带检测、背景减除、校准和归一化。

图像处理工具

用于裁剪、旋转、翻转和过滤所有通道的图像。

一维分析

使用 ImageQuant™ TL 提供的工具进行一维分析，包括：

- 多泳道分析能力
- 全自动、一键式图像分析
- 即时改进任何分析步骤
- 每个步骤跟随指导的图像分析
- 用户自定义的偏好设置可保存并加载到类似实验中

泳道创建自由灵活，可手动或自动进行创建。泳道编辑工具包括以下选项：

- 多泳道检测
- 选择感兴趣的区域
- 多框调整
- 通过“Grimace”工具补偿条带变形
- 移动、调整大小和弯折单个泳道
- 删除和添加泳道
- 导入和导出泳道模板

背景减除

可通过三种自动方法 (橡皮筋法、最小轮廓法或滚球法) 或两种手动方法 (图像矩形法或手动基线法) 减去背景。

条带检测

可使用三个参数 (最小斜率、降噪、最大峰值百分比) 自动检测条带, 并自动确定条带边缘或将其设置为固定宽度。条带编辑和分析工具包括:

- 手动编辑峰值和边缘检测
- 可叠加或重叠查看多个泳道轮廓图
- 在“图像窗口”和“泳道轮廓窗口”中进行编辑
- 条带测量值自动显示在“测量表”中
- 三种类型的测量表(选定泳道、所有泳道和比较)
- 自动更新表格
- 导出泳道轮廓的信息

分子大小/等电点(pI)校准

分子大小/等电点 (pI) 校准允许用户从 13 个标准库中进行选择 (和编辑), 或创建新标准。编辑选项包括:

- 全自动或手动分配标准条带
- 计算 Rf 值
- 六种曲线拟合方法
- 分子量自动显示在“测量表”中

数量校准

为了应对非线性染色效应, 采用了五种曲线拟合方法中的一种进行数量校准。有 10 种测量单位可供选择。

归一化

归一化方法可使用已知值, 也可以将条带表示为一个或多个选定条带的百分比或比例。有 10 种测量单位可供选择。

09

应用示例

在本章中，我们将介绍一些精选的应用。在这些应用中，蛋白质印迹法（有时也包括一维凝胶电泳分析）发挥了核心作用——从确认层析组分中是否存在目标蛋白质，到多重蛋白质印迹法的定量分析。

示例均在微型凝胶上进行电泳，除非另有说明，否则都采用了标准的转印、封闭和检测程序。各步骤的“标准程序”请参考本手册中的建议（见第 11 章）。所有示例均采用了全湿转印。最佳抗体浓度是根据我们的建议以及供应商提供的信息确定的。介绍了一组蛋白质印迹法的应用，并提供了每组结果所用的样本类型和产品的信息。我们希望这些示例能打开您的思路，证明蛋白质印迹法对解决研究、生产和质量控制过程中的诸多难题所起到的作用。

9.1 化学发光蛋白质印迹

9.1.1 重组蛋白的纯化

在细菌中生产重组蛋白质的过程必须具有高纯度和高产量。在评估替代生产方法时，更重要的通常是比较得率或确认层析组分中是否存在相关蛋白质，而不是了解其精确数量。能够检测和监测不同蛋白质纯化步骤中的杂质和污染物也很重要。

例如，在放大蛋白质生产工艺之前，必须了解某些参数的变化对最终得率的影响。在下面的例子中，Cytiva 公司的研究人员研究了不同诱导温度对大肠杆菌中重组组氨酸标记的绿色荧光蛋白 (GFP) 得率的影响。纯化后，通过使用 Amersham™ ECL™ 进行检测的蛋白质印迹法测定蛋白质得率，以评估温度变化对蛋白质得率和批次间一致性的影响 (图 9.1)。

- 材料样本:

纯化的重组组氨酸 (His) 标记 GFP
- 标记物:

全范围彩虹分子量标记物
- 膜:

Amersham™ Hybond™ ECL™
(现已被 Amersham™ Protran™ Premium™ 取代)。
- 封闭溶液:

Amersham™ ECL™ 封闭剂
- 一抗:

小鼠抗组氨酸
- 二抗:

ECL 小鼠 IgG，HRP 联全抗体
- 检测:

Amersham™ ECL™
- 成像:

Amersham™ Hyperfilm™ ECL™
- 分析:

ImageQuant™ TL 7.0 (现已被 ImageQuant™ TL 8.2 取代)

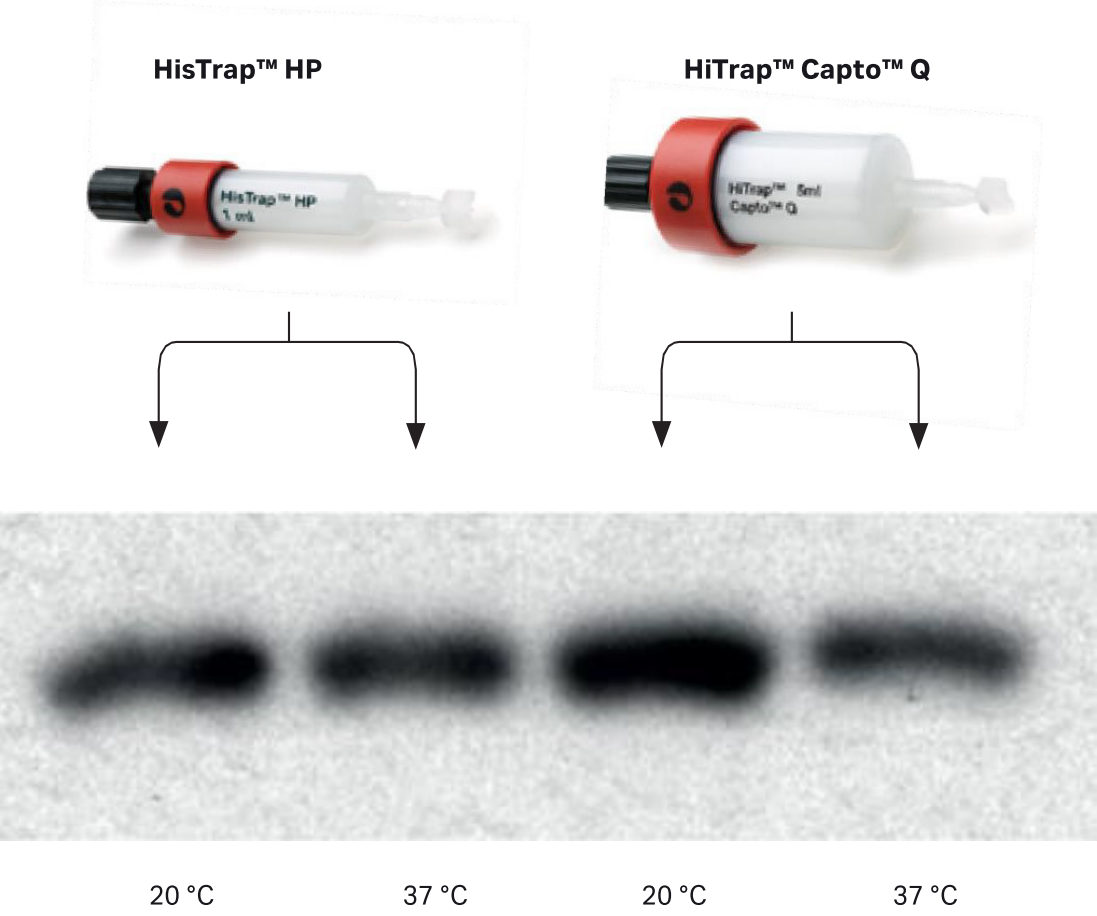


图 9.1. 用 Amersham™ ECL™ 和 Amersham™ Hyperfilm™ ECL™ 检测重组组氨酸标记的 GFP, 比较不同诱导温度 (20°C 或 37°C) 和纯化培养基 (HisTrap™ HP, 1 mL 或 HiTrap™ Capto™ Q, 5 mL, ÄKTA™ explorer) 下的蛋白质得率。对纯化结果的直观分析表明, 使用 20°C 的诱导温度和 HiTrap™ Capto™ Q 进行纯化时, 组氨酸标记 GFP 的得率最高。

9.1.2 低丰度蛋白质的检测：监测信号通路的激活

在临床前研究中，有时会用潜在的药物和生物治疗药物处理培养细胞，以研究特定信号通路的激活情况。若出现蛋白质磷酸化等翻译后修饰 (PTM) 现象，则表明这些通路已被激活。然而，与母体蛋白相比，磷酸化蛋白的含量通常很低。因此，我们需要一种灵敏度极高的检测系统，同时又能测量各种蛋白质的数量。蛋白质印迹法后使用化学发光 Amersham™ ECL™ Prime 进行检测，为需要高灵敏度和宽线性动态范围的应用提供了实用的方法。

STAT3 是一种参与宿主免疫的转录因子。该蛋白质的活性受干扰素-α(IFN-α) 等细胞因子的调节。用 IFN-α 刺激细胞会导致 STAT3 上两个特定的酪氨酸残基的磷酸化，从而形成同源二聚体或异源二聚体，这些二聚体会转运到细胞核上并开始转录。

在下面的应用示例中, 用 IFN-α 处理 HeLa 细胞后, 对 STAT3 的磷酸化进行了评估。用 HeLa 细胞 (IFN-α 处理过的实验组和未处理过的对照组) 的裂解液样本进行 SDS-PAGE 分析, 然后使用磷酸化 STAT3 特异性抗体进行蛋白质印迹法检测。使用 Amersham™ ECL™ Prime 检测磷酸化的 STAT3 (pSTAT3) (图 9.2), 并使用 ImageQuant™ LAS 4000 mini Amersham™ ImaegQuant™ 800 CCD 成像仪成像。然后剥离膜, 并重新检测 Actin 蛋白——也就是肌动蛋白。通过监测肌动蛋白的表达水平, 可以弥补凝胶上样不均的问题。将 pSTAT3 的水平与相应的肌动蛋白水平进行归一化处理。

材料	
样品:	IFN-α 处理过和未处理过的 HeLa 细胞裂解液
标记物:	全范围彩虹分子量标记物
膜:	Amersham™ Hybond™ P 0.45
封闭溶液:	Amersham™ ECL™ Prime 封闭剂
一抗:	小鼠抗 pSTAT3(Tyr 705)
二抗:	ECL™ 小鼠 IgG, HRP 联全抗体

剥离和再生检测	
一抗:	小鼠抗肌动蛋白
二抗:	ECL™ 小鼠 IgG, HRP 联全抗体
检测:	Amersham™ ECL™ Prime
成像:	ImageQuant™ LAS 4000 mini(现已被 Amersham™ ImageQuant™ 800 取代)
分析:	ImageQuant™ TL 7.0 (现已被 ImageQuant™ TL 8.2 取代)

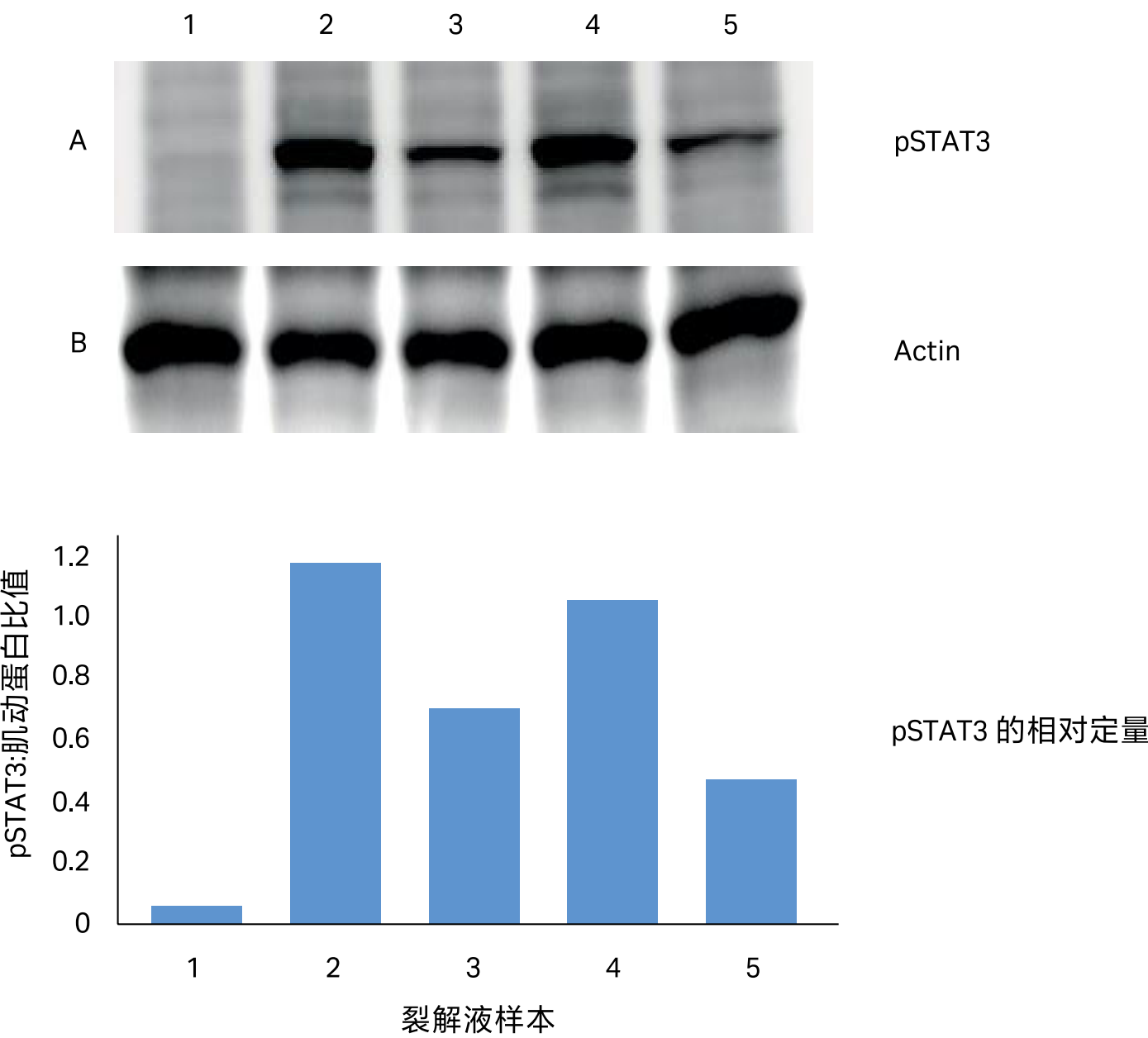


图 9.2. Amersham™ ECL™ Prime 蛋白印迹法检测未经处理(1)和经 IFN-α 处理 (2 至 5) 的 HeLa 细胞裂解液中的 pSTAT3 和肌动蛋白。结果显示了 IFN-α 诱导的 STAT3 磷酸化 (A)。将 pSTAT3(A) 的水平与 Actin(B) 的水平进行归一化处理，以校正上样总量的偏差。对样本中 pSTAT3 水平的生物学差异进行相对量化，以监测 STAT3 磷酸化对 IFN-α 处理的反应变化。

9.1.3 通过免疫共沉淀和蛋白质印迹检测蛋白质相互作用

完整蛋白质复合物的免疫沉淀被称为共免疫沉淀, 是分析蛋白质之间相互作用的一项强大技术。共免疫沉淀的原理是选择一种针对相关蛋白质的抗体。然后将抗体-蛋白质复合物与固相载体 (如 Cytiva 公司的蛋白 G Mag Sepharose™ 磁珠) 偶联。与磁珠偶联后的复合物被捕获, 相关蛋白质与任意相互作用配偶提一起被洗脱。

共免疫沉淀的一个典型应用是分析生长因子受体激活后的细胞信号蛋白。例如, TAK1 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 参与激活转化生长因子-β(TGF-β) 受体所诱导的信号转导。当受到刺激时, TAK1 会与第二种名为 TAB1 的蛋白质结合并形成功能性激酶复合物, 进一步传递信号转导。

共免疫沉淀是在未经处理和经 TGF-β 处理的人前列腺癌细胞 (PCU3) 的细胞裂解液中进行的。在细胞裂解液中加入 TAK1 抗体, 然后加入蛋白 G Mag Sepharose™。磁珠与细胞裂解液中的 TAK1 抗体结合, 并提取出 TAK1/TAB1 复合物。将从磁珠上洗脱的 TAK1/TAB1 复合物以及细胞裂解液总量涂在凝胶上。在从磁珠上洗脱的样品和细胞裂解液中都检测到了 TAK1 和相互作用蛋白 TAB1 (图 9.3)。

材料	
样品：	未经处理和经 TGF-β 处理的 PCU3 细胞裂解物
标记物：	全范围彩虹分子量标记物
膜：	Amersham™ Hybond™ P 0.45
封闭溶液：	Amersham™ ECL™ Prime 封闭剂
一抗：	(A) 小鼠抗 TAK1 (B) 兔抗 TAB1
二抗	(A) ECL™ 小鼠 IgG，HRP 联全抗体 (B) ECL™ 兔 IgG，HRP 联全抗体
一抗：	小鼠抗 TAK1 小鼠抗 GAPDH
二抗：	(C，D)ECL™ 小鼠 IgG，HRP 联全抗体
检测：	Amersham™ ECL™ Prime
成像：	ImageQuant™ LAS 4000 (现已被 Amersham™ CCD 成像仪 680 取代)
分析：	ImageQuant™ TL 7.0 (现已被 ImageQuant™ TL 8.2 取代)

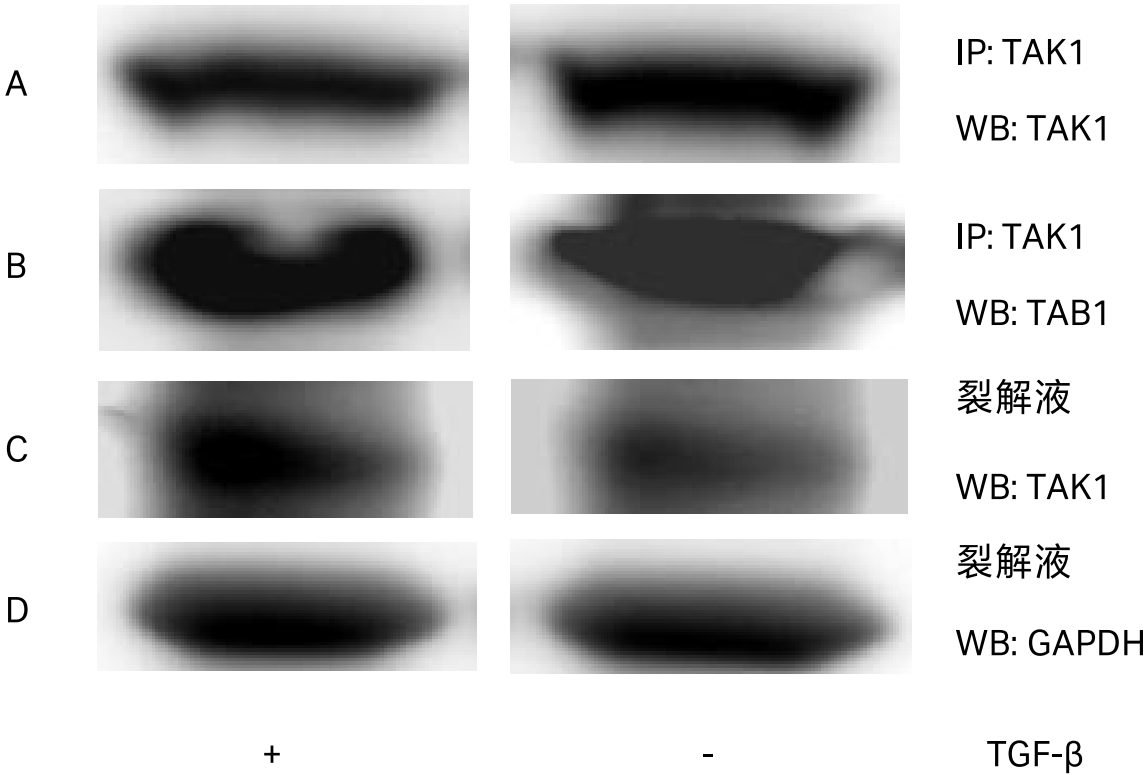


图 9.3. 在未经处理 (-) 和经 TGF-β 处理 (+) 的 PCU3 细胞裂解液中, 对 TAB1 与 TAK1 进行共免疫沉淀。虽然在 PCU3 细胞中观察到了 TAK1 和 TAB1 之间的内源性相互作用 (A 组 和 B 组), 但在这种特殊情况下没有观察到 TGF-β 依赖性。总细胞裂解液中 TAK1 的表达水平和管家蛋白 GAPDH 的水平得到了确证 (C 和 D 组)。数据由瑞典于默奥大学 Marene Landström 教授提供。

9.2 荧光蛋白质印迹

9.2.1 对总蛋白进行归一化的多重检测

由于总蛋白受细胞处理或培养条件的影响最小，因此这种归一化方法比管家蛋白归一化更可靠。用于总蛋白归一化的 Cy™5 预标记方法经过优化，可在广泛的蛋白浓度范围内实现线性响应，且适用于任意细胞类型。

在本例中, 使用 Cy™5 总蛋白归一化法研究了紫外线处理对 HeLa 细胞中 Bax 蛋白水平的影响 (图 9.4)。样品经 Cy™5 预标记以获得膜上的总蛋白信号, Bax 蛋白由一抗和 Cy™3 标记的二抗靶向。Cy™5 总蛋白信号显示, 随着紫外线对细胞的处理增强, 细胞中的蛋白质浓度也在增加。不过, 在对照总蛋白进行归一化处理后, 观察到 Bax 水平有所下降。

材料	
样品：	Cy™5 预标记的 15 µg A431 裂解液对照组和经紫外线处理的实验组
标记物：	Amersham™ WB 分子量标记物
封闭溶液：	3% BSA
一抗：	兔抗 PP2A 1:750
二抗：	Amersham™ Cy™3 标记山羊抗兔 1:2500

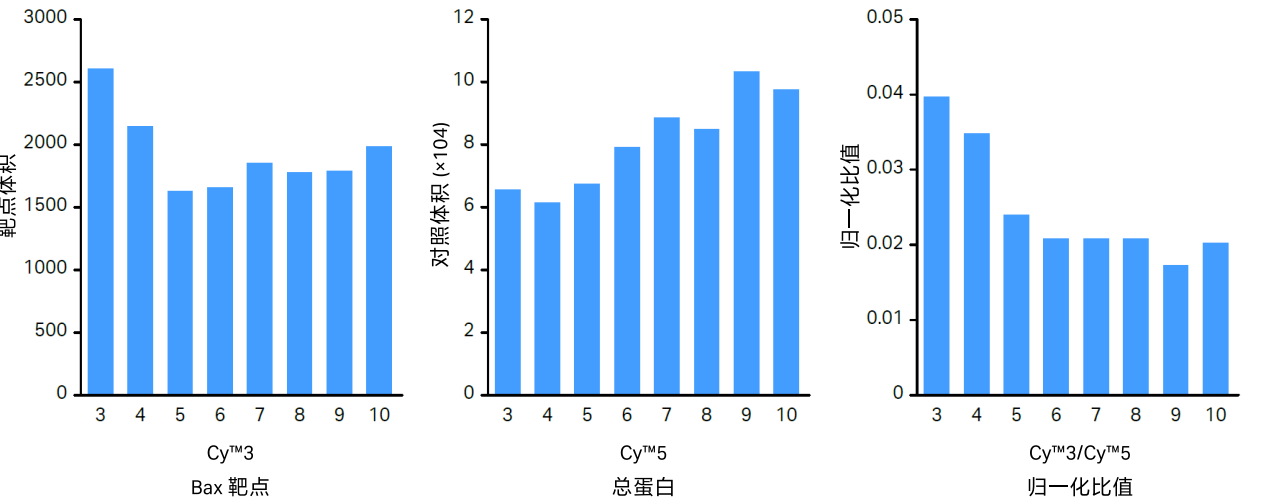
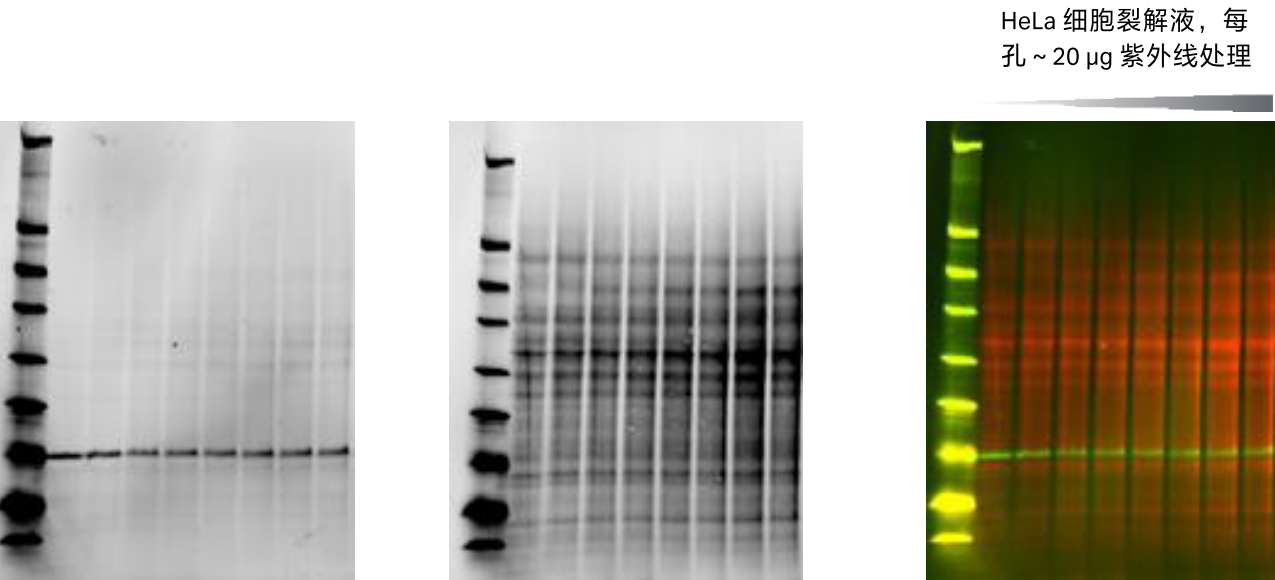


图 9.4. 采用蛋白质印迹法和总蛋白归一化法研究了 HeLa 细胞中 Bax 水平在紫外线处理影响下的变化。样品经 Cy™5 预标记以获得膜上的总蛋白信号, Bax 蛋白由一抗和 Cy™3 标记的二抗靶向。在对照总蛋白进行归一化处理后, 观察到 Bax 水平有所下降。

9.2.2 对管家蛋白进行归一化的多重检测

在使用化学发光蛋白质印迹法时， 如果要检测到的蛋白质水平对照管家蛋白进行归一化处理， 通常需要对膜进行剥离和重新检测。不过， 剥离过程有可能造成膜上蛋白质的不均匀损失。在使用 Amersham™ ECL Plex™ 时， 由于可以进行多重检测(使用一种 CyDye™ 检测目标蛋白， 使用另一种 CyDye™ 检测管家蛋白)， 因此不再需要剥离和重新检测。

以下示例研究了野生型成纤维细胞和基因敲除成纤维细胞经成纤维细胞生长因子-2(FGF-2) 处理后的裂解液中 ERK1/2 的激活情况。将裂解液滴在凝胶上， 印迹后同时用小鼠抗 ERK1/2 和兔抗 GAPDH 对膜进行探测， 然后用 Amersham™ ECL Plex™ 抗小鼠 Cy™5 和 Amersham™ ECL Plex™ 抗兔 Cy™3 对膜进行探测。尽管蛋白质定量分析显示每条泳道中的总蛋白质量相近， 但检测管家蛋白 GAPDH 时所发出的信号强度清楚地表明情况并非如此 (图 9.5)。在不关联 GAPDH 水平的情况下， 野生型细胞和基因敲除细胞的 ERK1/2 激活模式并不明显。然而， 当对照 GAPDH 信号进行归一化处理时， 基因敲除细胞中的 ERK1/2 水平在受到 2 和 4 ng/mL 的 FGF-2 刺激后有所增加。

材料

样品：	经 FGF-2 处理的野生型 (+/+) 和基因敲除型 (-/-) 小鼠胚胎成纤维细胞的细胞裂解液
标记物：	ECL Plex™ 荧光彩虹标记物
膜：	Amersham™ Hybond™ LFP 0.2
封闭溶液：	Amersham™ ECL™ Prime 封闭剂
一抗：	兔抗 MAP 激酶 ERK1/2 小鼠抗 GAPDH
二抗	ECL Plex™ 山羊抗兔 Cy™5 ECL Plex™ 山羊抗小鼠 Cy™3
检测：	Amersham™ ECL Plex™
成像：	Typhoon™ 激光扫描仪 (现已被 Amersham™ Typhoon™ 取代)
分析：	ImageQuant™ TL 7.0 (现已被 ImageQuant™ TL 8.2 取代)

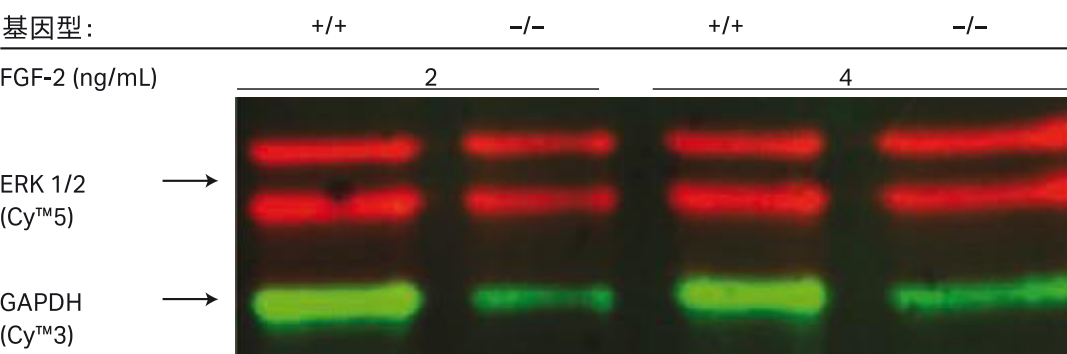
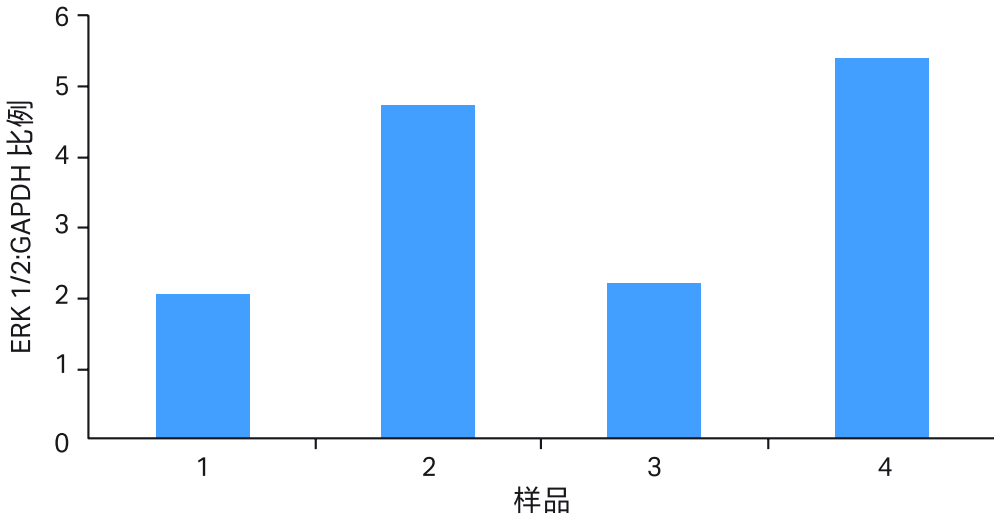


图 9.5. 通过在同一张印迹上检测两种蛋白质，可以相对于 GAPDH 等管家蛋白对蛋白质表达进行定量。图中所示为，使用 Amersham™ ECL Plex™ 检测在野生型 (+/+) 和敲除型 (-/-) 小鼠胚胎成纤维细胞中，ERK 1/2 在受 FGF-2 处理后的反应。ERK1/2(Cy™5) 和 GAPDH(Cy™3) 被特定的一抗靶定，然后被 ECL Plex™ Cy™5 和 Cy™3 二抗靶定。如图所示，在对照 GAPDH 进行归一化处理后，得出了 ERK1/2 在 FGF-2 刺激后的表达水平。数据由瑞典乌普萨拉大学医学生物化学和微生物学系 Jin-Ping Li 博士和 Juan Jia 博士提供。



9.2.3 分子量相似蛋白质的多重检测

在可视化大小和 PTM 相似的蛋白质, 同时监测蛋白质未修饰形态的表达时, Amersham™ ECL Plex™ 的多重检测能力尤为强大。此外, 如果预测相关蛋白质的表达水平很低, 则必须避免侵蚀性膜剥离导致的样本损失和蛋白质活性降低。

在以下示例中, 用 TGF-β 刺激癌细胞后, 对 Akt 蛋白上酪氨酸残基的磷酸化情况进行了分析。首先在 Tris-甘氨酸凝胶上分离 PCU3 细胞裂解液。然后将蛋白质转印到 Amersham™ Hybond™-LFP 膜上 (现已被 Amersham™ Hybond™ LFP 0.2 取代)。封闭后, 用小鼠抗 Akt 和兔抗磷酸 Akt 一抗对膜进行探测, 然后用 Amersham™ ECL Plex™ 抗小鼠 Cy™5 和 Amersham™ ECL Plex™ 抗兔 Cy™3 二抗进行探测。

在受到 TGF-β 刺激后, Akt 的酪氨酸磷酸化增加。结果表明, 使用 Amersham™ ECL Plex™ 进行多重检测可在单个蛋白质印迹上同时识别和定量单个蛋白质上的两个表位 (图 9.6)。

材料

样品：	PCU3 细胞裂解液
标记物：	ECL Plex™ 荧光彩虹标记物
膜：	Amersham™ Hybond™-LFP(现已被 Amersham™ Hybond™ L 取代)
封闭溶液：	Amersham™ ECL™ Prime 封闭剂
一抗：	(1) 小鼠抗 Akt (2) 兔抗磷酸 Akt
二抗	(1) ECL Plex™ 山羊抗小鼠 Cy™5 (2) ECL Plex™ 山羊抗兔 Cy™3
检测：	Amersham™ ECL Plex™
成像：	Typhoon™ 激光扫描仪 (现已被 Amersham™ Typhoon™ 取代)
分析：	ImageQuant™ TL 7.0 (现已被 ImageQuant™ TL 8.2 取代)

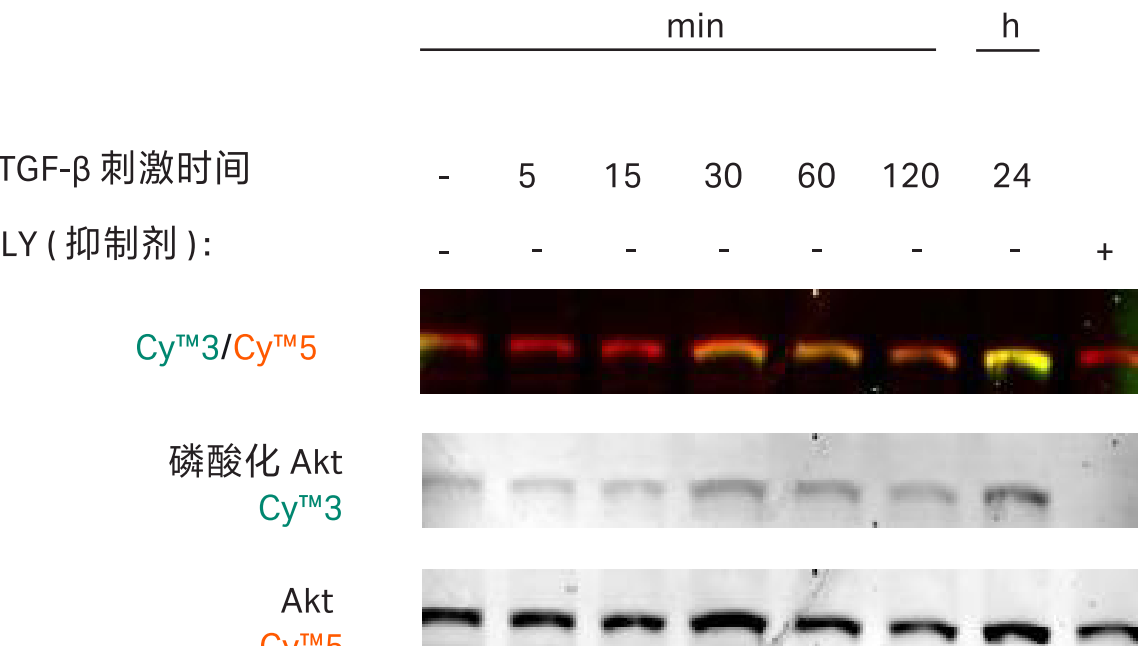
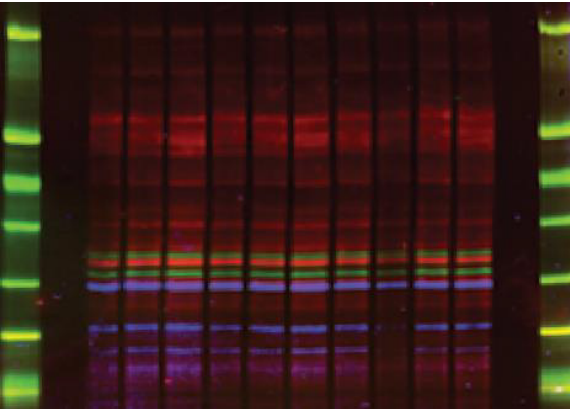


图 9.6. 使用 Amersham™ ECL Plex™ 检测在 TGF-β 刺激后 PCU3 细胞中的低丰度磷酸化 Akt 蛋白和总 Akt 蛋白。尽管磷酸化导致的分子量变化极小, 但 Amersham™ ECL Plex™ 仍能清晰区分两种形式的蛋白质。注意用激酶抑制剂 LY 处理的样本 Cy™3 通道完全没有信号。数据由瑞典乌普萨拉市路德维希癌症研究所的 Marene Landström 提供。

9.2.4 三重检测：同时检测三种蛋白质

假设您现在需要研究两种相关蛋白质的表达, 例如, 在同一印迹上检测经过 PTM (如磷酸化) 的蛋白质和没有经过 PTM 的蛋白质, 然后对照管家蛋白进行归一化处理。这种应用需要使用三种荧光基团, 比如 Cy™2、Cy™3 和 Cy™5。在适当波长的光激发下, 每种荧光基团都会在不同的特定波长下发光。此外, 用于检测这三个目标的一抗必须是在不同物种中培养的, 而且二抗在这些物种之间不会产生明显的交叉反应。使用 Amersham™ ECL Plex™ 进行分析时, 可使用不同的 CyDye™ 标记山羊抗小鼠和山羊抗兔二抗同时检测样品中的两个目标。不过, 针对第三个目标的抗体必须由用户直接用第三个荧光基团标记。

三重检测特别适用于检测 PTM 的微小变化。例如, 在一项关于辐照对细胞影响的研究中, 使用在三种不同物种中培养的一抗同时检测三种蛋白质, 即 ERK、磷酸化 ERK 和管家蛋白 GAPDH。Cytiva 提供其中两种偶联二抗 (ECL Plex™ 抗小鼠 Cy™3 和 ECL Plex™ 抗兔 Cy™2)。而 Cy™5 则直接与抗 GAPDH 一抗偶联 (图 9.7)。有关如何执行此标记步骤的信息, 请参阅第 11 章。



样品:	CHO 细胞裂解液	
凝胶:	SDS-PAGE 8-18%	
膜:	Amersham™ Hybond™ P 0.45 PVDF	
检测:	一抗	
	兔抗 ERK	
	小鼠抗 GAPDH	
	二抗	
	ECL Plex™ Cy™3 GAR	
成像:	Alexa Plus 800 GAM	
	总蛋白染色	
	Amersham™ Quickstain™	
	激发	发射光滤光片
	532 nm	Cy™3 570BP20 (绿)
	685 nm	红外短波 720BP20 (红)
	785 nm	红外长波 825BP30 (蓝)

三重蛋白检测与总蛋白归一化。将不同量的 CHO 细胞裂解液上样到 SDS-PAGE 凝胶上进行蛋白质印迹法检测。分别使用 532 nm 和 785 nm 激光检测 ERK 和 GAPDH。使用 685 nm 激光检测 Amersham™ Quickstain™ 标记的总蛋白, 以便进行归一化处理。

材料:	
样品:	未经辐照 (C) 和辐照过 (T) 的 HeLa 细胞裂解液
标记物:	ECL Plex™ 荧光彩虹标记物
膜:	Amersham™ Hybond™-LFP(现已被 Hybond™ LFP 0.2 取代)
封闭溶液:	Amersham™ ECL™ Prime 封闭剂
一抗:	(1) 兔抗 MAP 激酶 (ERK1-ERK2)
	(2) 小鼠抗磷酸 ERK
	(3) Cy™5 偶联山羊抗 GAPDH
二抗:	(1) ECL Plex™ 山羊抗兔 Cy™2
	(2) ECL Plex™ 山羊抗小鼠 Cy™3
检测:	Amersham™ ECL Plex™
成像:	Typhoon™ 激光扫描仪 (现已被 Amersham™ Typhoon™ 取代)
分析:	ImageQuant™ TL 7.0 (现已被 ImageQuant™ TL 8.2 取代)

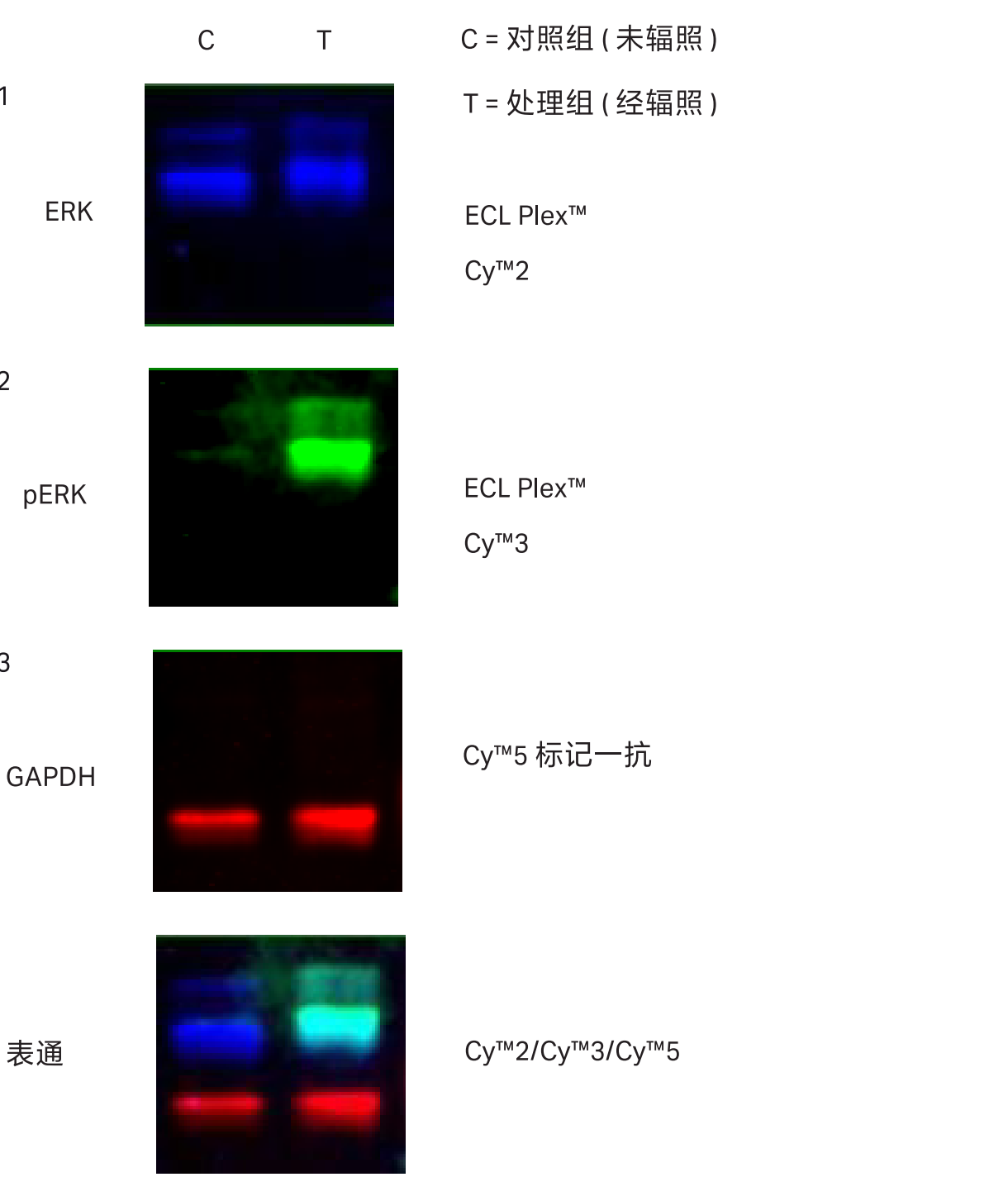


图 9.7. 对 HeLa 细胞裂解液进行三重定量分析, 标记抗体靶定 ERK、pERK 和 GAPDH。研究表明, 紫外线辐照只会诱导天然 ERK 的少量增加, 但会显著增加磷酸化 ERK。在同一实验中, 无需剥离和重新检测膜, 即可监测管家蛋白 GAPDH 的水平。因此, 通过一次实验即可同时检测到三个不同的参数。

9.2.5 三层蛋白质印迹放大信号

对于检测极低丰度的蛋白质和其他弱信号, 三层荧光蛋白质印迹法是一个不错的选择。

在这项技术中, 一抗被用来探测膜上的蛋白质。然后涂上生物素标记的物种特异性二抗, 再涂上第三层, 通常是与 HRP 或荧光基团偶联的链霉亲和素 (图 9.8)。

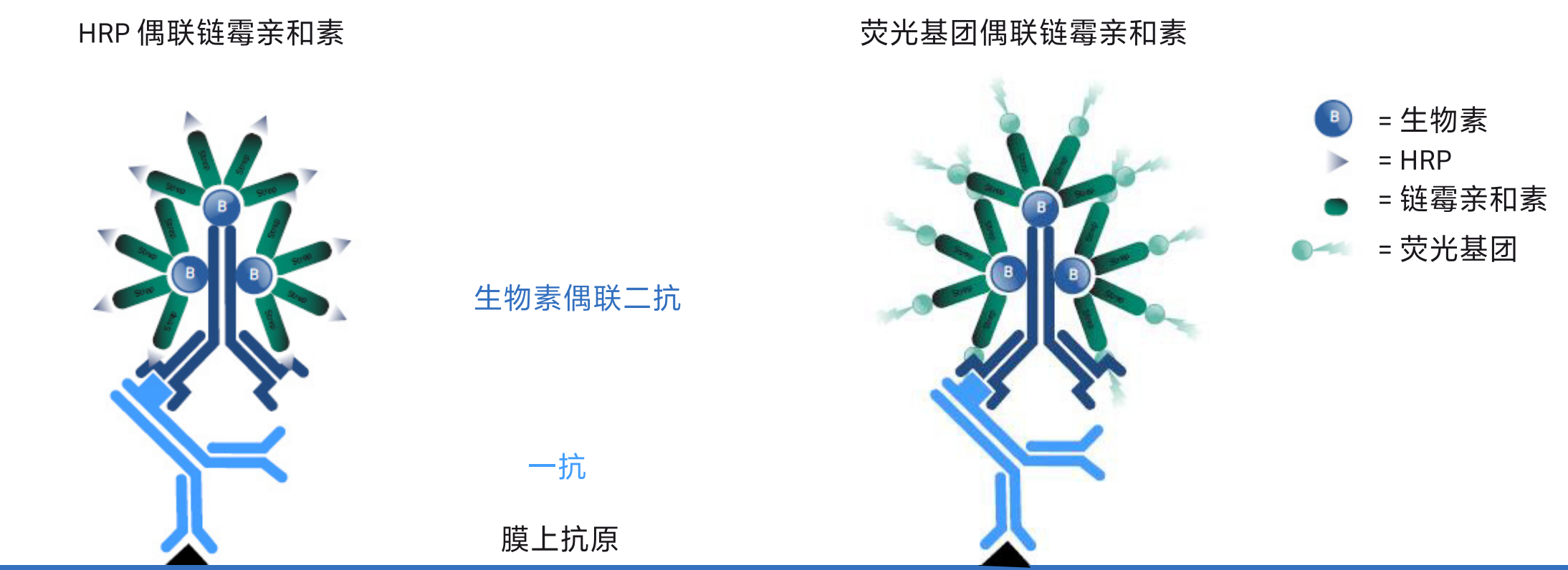


图 9.8. 三层荧光蛋白质印迹法的原理，其中二抗用生物素标记。第三层链霉亲和素与酶如 HRP(左)或荧光基团如 CyDye™(右) 偶联作为检测试剂，与两层检测相比，灵敏度显著提高。

与双层检测相比, 这种是提高灵敏度的一种特别有效的方法, 下面以癌细胞中 ERK 蛋白的表达为例加以说明。ERK 是一种哺乳动物 MAP 激酶。众所周知, 它们能激活许多转录因子以及其他蛋白激酶。ERK 信号通路的中断是许多癌症的共同特征。由于它们是瞬时表达且浓度极低, 因此检测它们需要高灵敏度的系统。

靶定 ERK 和管家蛋白 GAPD，对经过一系列稀释的 3T3 小鼠成纤维细胞裂解液进行了蛋白质印迹法分析 (图 9.9)。在这种情况下，通过比较综合信号强度的差异发现，使用 Cy™5 标记的链霉亲和素进行三层检测时，信号强度比两层检测时增加了约 15 倍。当需要检测极低丰度的蛋白质时，这种灵敏度的提高非常方便。

- 材料
- 样品: 3T3 细胞裂解液
- 标记物: 全范围彩虹分子量标记物
- 膜: Amersham™ Hybond™ LFP 0.2
- 封闭溶液: 5% BSA
- 一抗: 兔抗 ERK 1/2
小鼠抗 GAPDH
- 二抗: ECL Plex™ 山羊抗兔 IgG Cy™5、ECL Plex™ 山羊抗小鼠 IgG Cy™3
生物素偶联驴抗兔 IgG
- 第三层试剂: Cy™5 偶联链霉亲和素
- 检测: Amersham™ ECL Plex™
- 成像: Typhoon™ 激光扫描仪 (现已被 Amersham™ Typhoon™ 取代)
- 分析: ImageQuant™ TL 7.0 (现已被 ImageQuant™ TL 8.2 取代)

	两层标准方法	三层法
ERK 1/2 (Cy™5) GAPDH (Cy™3)		
第 1 层	兔抗 ERK1 /2	兔抗 ERK1 /2
第 2 层	ECL Plex™ 山羊抗兔 IgG Cy™5	生物素偶联驴抗兔 IgG
第 2 层	放射自显影	Cy™5 偶联链霉亲和素

图 9.9. 对经过一系列两倍稀释的 3T3 小鼠成纤维细胞裂解液进行蛋白质印迹法分析。通过多重荧光蛋白质印迹法检测 ERK1/2(红色) 和 GAPDH(绿色)。使用 Amersham™ ECL Plex™ (左) 进行标准的两层检测和使用 Cy™5 标记的链霉亲和素 (右) 进行三层检测，以测量 ERK 1/2。通过比较综合信号强度的差异发现，使用 Cy™5 标记的链霉亲和素进行三层检测时，信号强度比两层检测时增加了约 15 倍。请注意，两种方法的 GAPDH Cy™3 信号 (绿色) 几乎相同。结果表明，引入第三层检测可提高灵敏度，因此是检测丰度极低的蛋白质的一种解决方案。

9.2.6 二维 (2D) 蛋白质印迹检测磷酸化异构体

二维蛋白质印迹法分析尤其适用于需要高分辨率的复杂分析。

在本示例中, 使用 Amersham™ ECL Plex™ 对 PCU3 细胞进行多重定量分析, 确定了糖原合成酶激酶 3β(GSK3β) 的磷酸化位点。细胞裂解液通过等电聚焦 (根据电荷进行一维分离), 然后通过 SDS- PAGE(根据大小进行二维分离) 进行分离。转印后, 用小鼠抗 GSK3β 和兔抗其磷酸化形式 (pGSK3β) 的抗体对膜进行探测。然后用 ECL Plex™ 山羊抗小鼠 IgG-Cy™3 和 ECL Plex™ 山羊抗兔 IgG-Cy™5 对膜进行探测。

GSK3β 上每增加一个磷酸基团, 都会导致迁移发生可测量的变化。与一维蛋白质印迹法相比, 二维蛋白质印迹法实验提供了磷酸化状态的更多信息 (图 9.10 和 9.11)。在一维实验中, 与磷酸化 GSK3β(Mr 48 000) 相对应的条带被分解成至少五种不同的蛋白质异构体, 其中两种在丝氨酸 9 上被磷酸化。相关方法的详细信息, 请参见参考文献 1。

材料	
样品:	PCU3 细胞裂解液
固定 pH 梯度 (IPG) 胶条:	Immobiline™ 干燥胶条 pH 7-11 NL, 7 cm
膜:	Amersham™ Hybond™ P 0.45
封闭溶液:	Amersham™ ECL™ Prime 封闭剂
一抗:	小鼠抗 GSK3β 兔抗 pGSK3β
二抗	ECL Plex™ 抗小鼠 IgG-Cy™3 ECL Plex™ 抗兔 IgG-Cy™5
检测:	Amersham™ ECL Plex™
成像:	Typhoon™ 激光扫描仪 (现已被 Amersham™ Typhoon™ 取代)

图 9.10. 用一维蛋白印迹法扫描 (A) ECL Plex™ Cy™3 偶联二抗与 GSK3β 一抗的对比。(B) ECL Plex™ Cy™5 偶联二抗与磷酸化 GSK3β 一抗的对比, (C) A 和 B 的叠加。

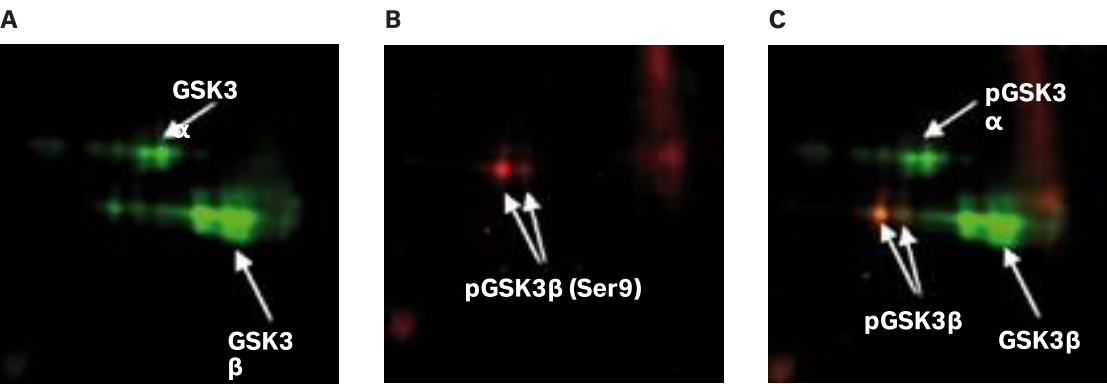
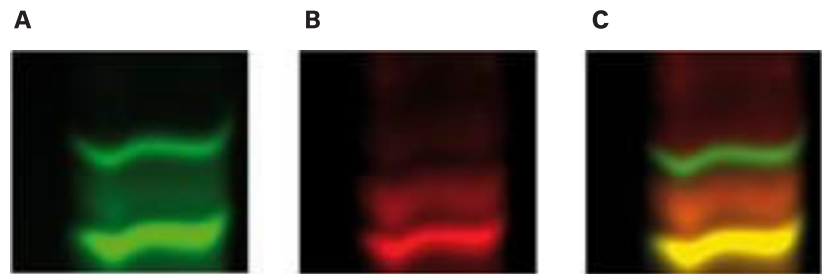
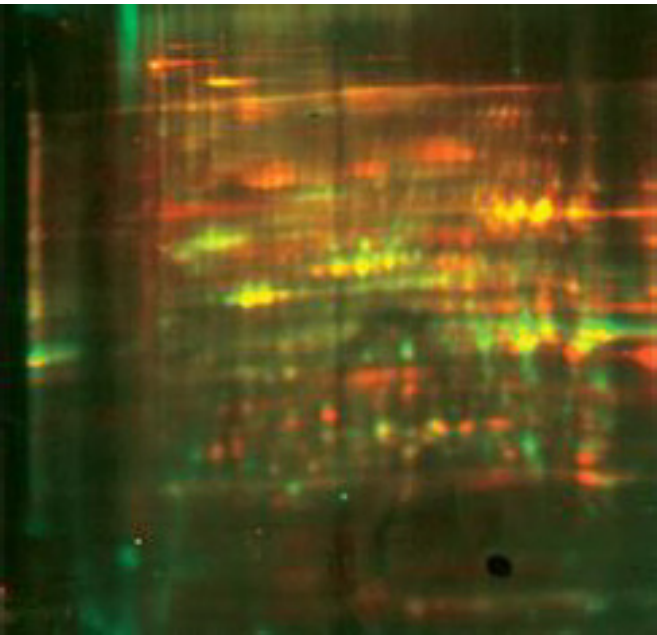


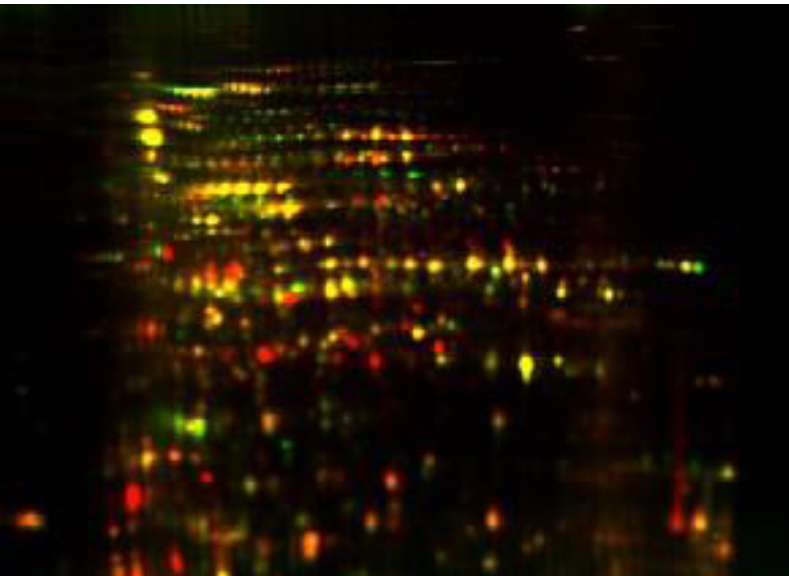
图9.11.使用Amersham™ECLPlex™检测天然和磷酸化GSK3β, 并对其进行二维蛋白印迹法分析。(A) Cy™3 图像, (B) Cy™5 图像, (C) Cy™3 和 Cy™5 图像的叠加。绿色图像 = ECL Plex™ Cy™3 偶联二抗与靶定 GSK3β 蛋白 (绿色) 的一抗。红色图像 = ECL Plex™ Cy™5 偶联二抗与靶定磷酸化 GSK3β 蛋白 (pGSK3β) 的一抗。

有关本节应用内容的更多详情, 请参阅参考文献 1。



样品:	CHO 细胞裂解液
膜:	PVDF 0.45 μm 孔径
一抗:	DIBE™ CHO K1 HCP 抗体 1:2000
封闭:	DIBE™ 封闭缓冲液
检测试剂:	DIBE™ 检测试剂 Cy™5 1:10 000
成像方法:	荧光 Cy™3 和 Cy™5 手动模式
鉴定:	1×1

图 9.12. 使用 ImageQuant™ 800 系统验证宿主细胞蛋白 (HCP) ELISA 覆盖实验, 这是生物制品风险管理的重要组成部分。通过二维差异印迹电泳法 (DIBE™ 技术) 进行覆盖分析, 具体操作为通过 CyDye™ 二级检测试剂对 CyDye™ 标记的 HCP 和结合的抗 HCP 抗体进行可视化。在同一膜上的不同通道中检测到了 HCP 和结合抗体, 从而降低了误读风险并提高了准确性。通过识别匹配斑点, 将抗 HCP 抗体信号与 HCP 总量进行比较, 就能估算出抗体对 HCP 的覆盖率。



样品:	- 大肠杆菌细胞裂解液 - 用苯甲酸处理过的大肠杆菌细胞裂解液								
IPG 胶条:	- 10 NL, 24 cm								
凝胶:	预制低荧光 DIGE™ 凝胶								
成像:	<table><tr><th>激发</th><th>发射光滤光片</th></tr><tr><td>488 nm</td><td>Cy™2 525BP20</td></tr><tr><td>532 nm</td><td>Cy™3 570BP20</td></tr><tr><td>635 nm</td><td>Cy™5 670BP30</td></tr></table>	激发	发射光滤光片	488 nm	Cy™2 525BP20	532 nm	Cy™3 570BP20	635 nm	Cy™5 670BP30
激发	发射光滤光片								
488 nm	Cy™2 525BP20								
532 nm	Cy™3 570BP20								
635 nm	Cy™5 670BP30								

图 9.13. 二维差异凝胶电泳 (2D-DIGE) 凝胶的绿色/红色叠加图像, 包含对照样本、处理样本和内标。用 Cy™3 和 Cy™5 DIGE Fluors 最小染料标记方案标记对照样本和处理过的样本。内标样品用 Cy™2 DIGE Fluor 标记。使用 Melanie™ 2D 分析软件对数据集进行了评估, 见图 15 和图 16。

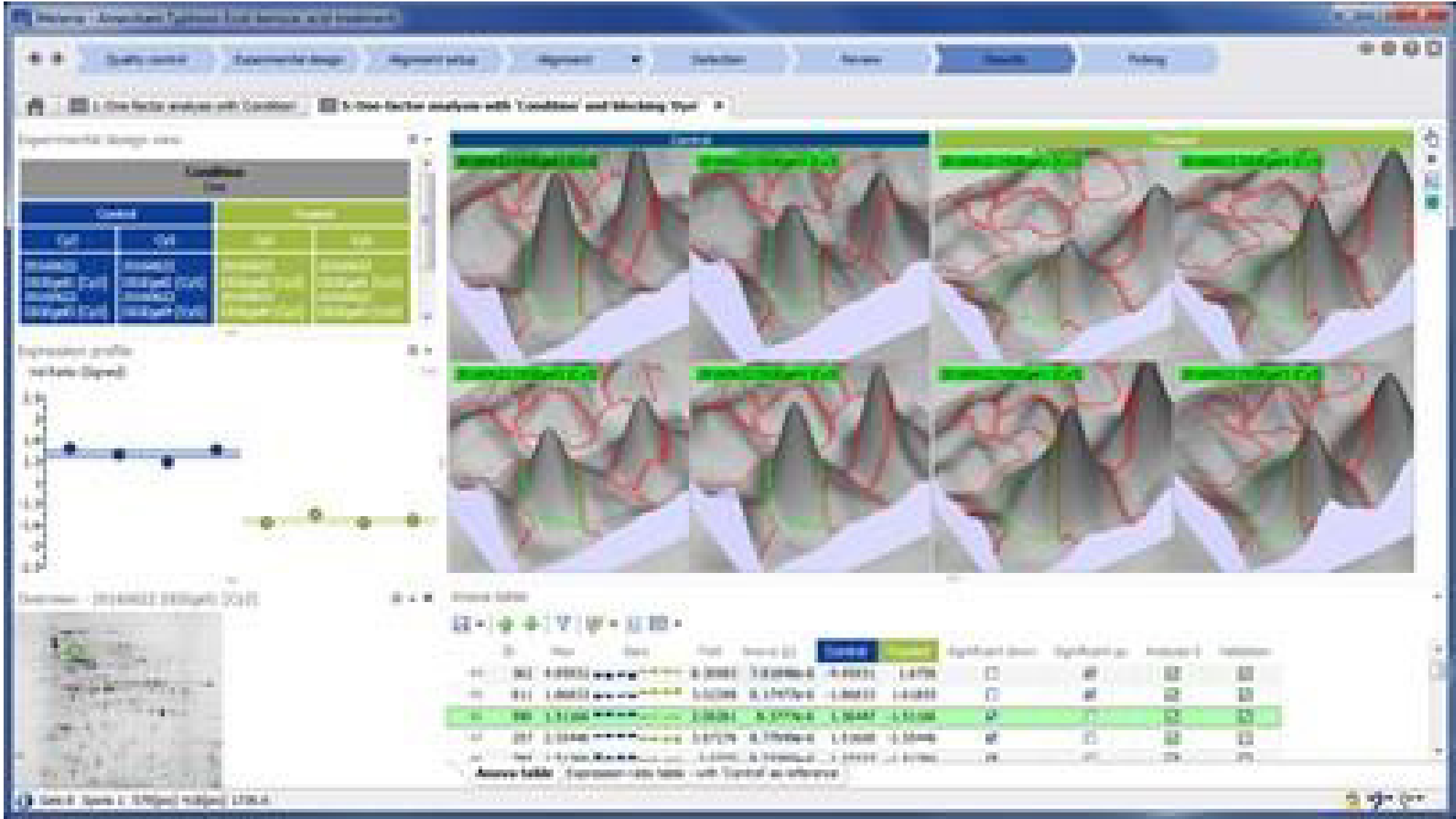


图 9.14. 用 Melanie™ 8(8.0.1 版) 软件分析的 DIGE 实验示例。研究了苯甲酸处理对大肠杆菌蛋白质组的影响。对照组样本 (蓝色) 和苯甲酸处理过的样本 (绿色) 各制备了 4 个重复样本, 也就是为 4 块凝胶准备了总共 8 个不同的样本。在每个凝胶上添加了一个合并的内标样本, 作为第三种样本。实验设计视图 (左上角) 显示, 染料在统计分析中被用作封闭因子。ANOVA p 值的染料校正估值进一步提高了检测蛋白质表达中细微但真实差异的能力, 包括重叠的斑点。图示蛋白质斑点的三维视图和相应的表达谱 (左中) 就说明了这一点。

9.3 参考文献

1. Application note: Multiplex protein detection in 2D gel electrophoresis using the Amersham™ ECL Plex™ fluorescent Western blotting system, GE Healthcare, 28904234.

10

故障排除

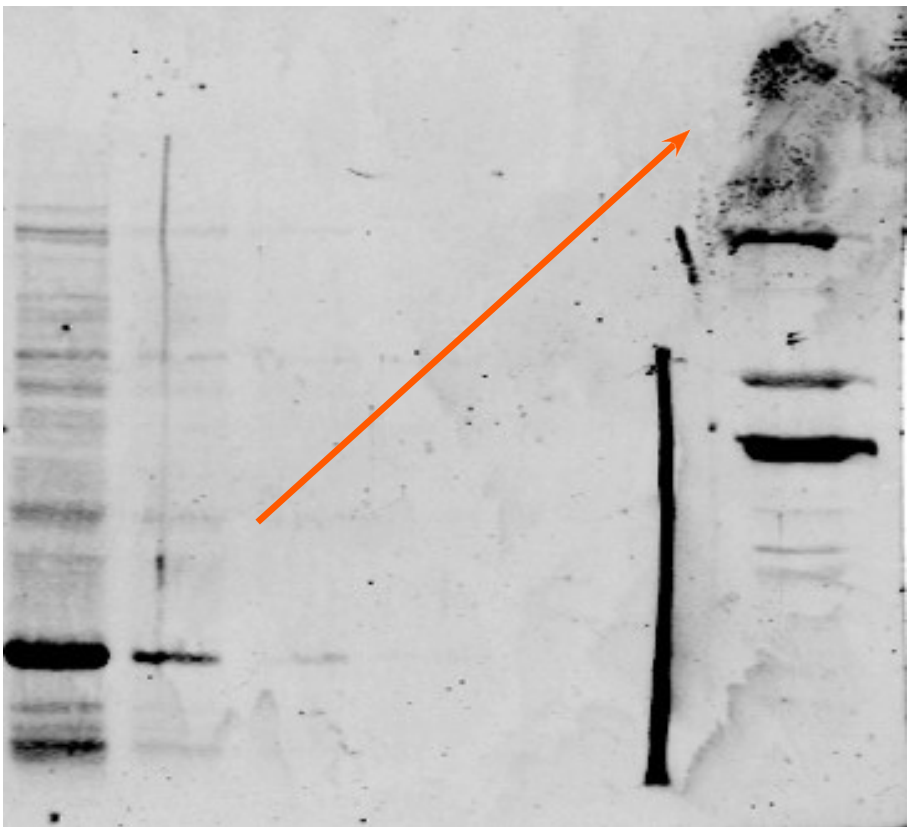
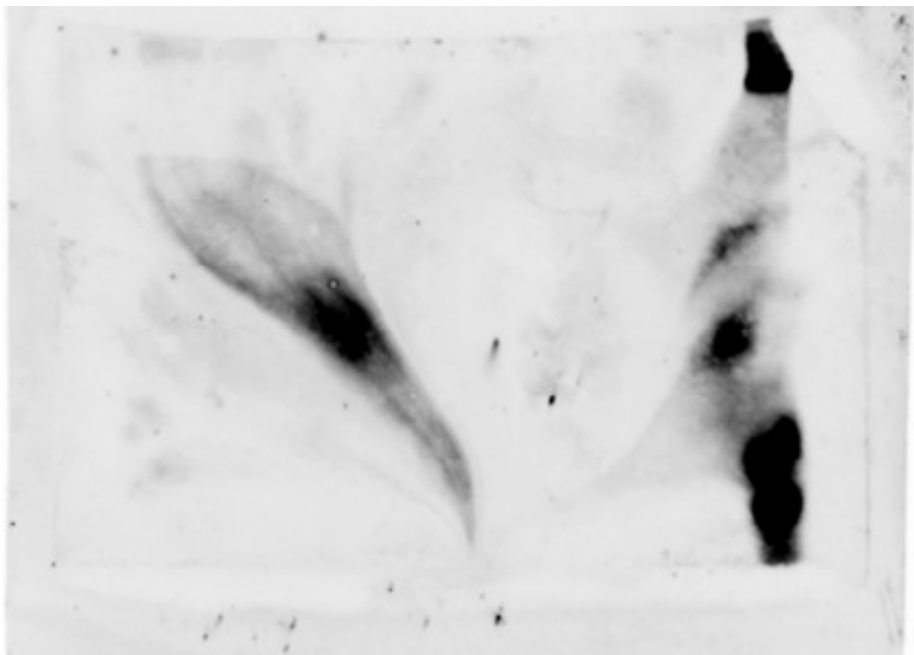
10.1 通用处理流程

我们需要一种灵敏度极高的检测系统, 同时又能测量各种数量的蛋白质

不要用手指处理印迹膜, 要使用镊子

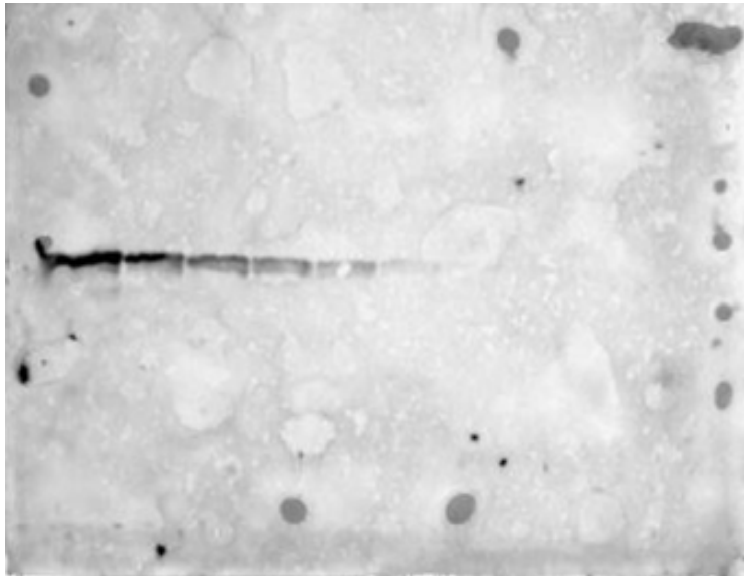


将印迹夹层摆放紧凑, 以避免条痕/模糊

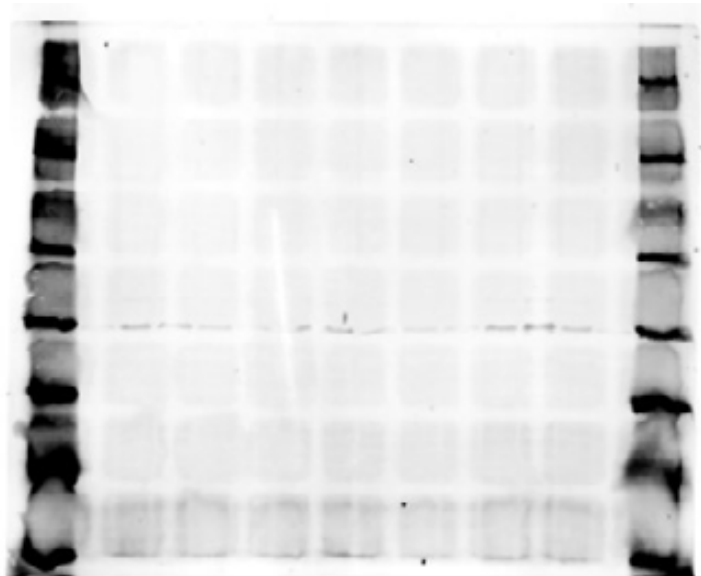


能做的和不能做的

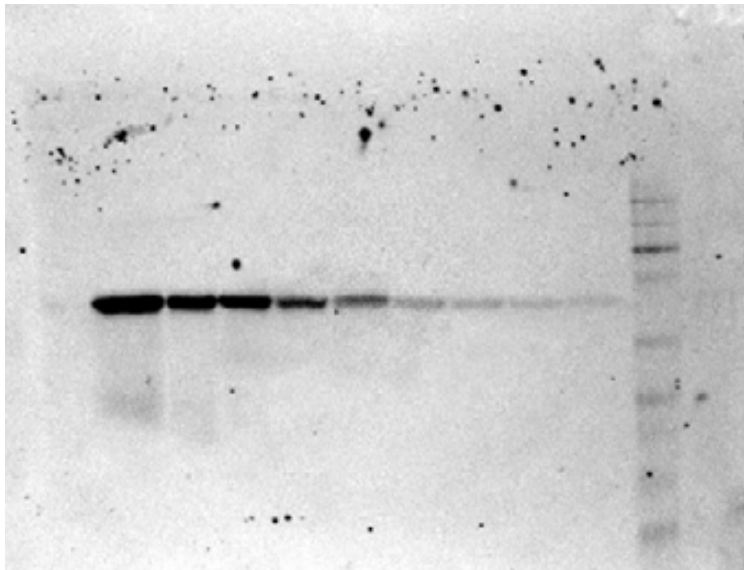
能做	不能做
----	-----



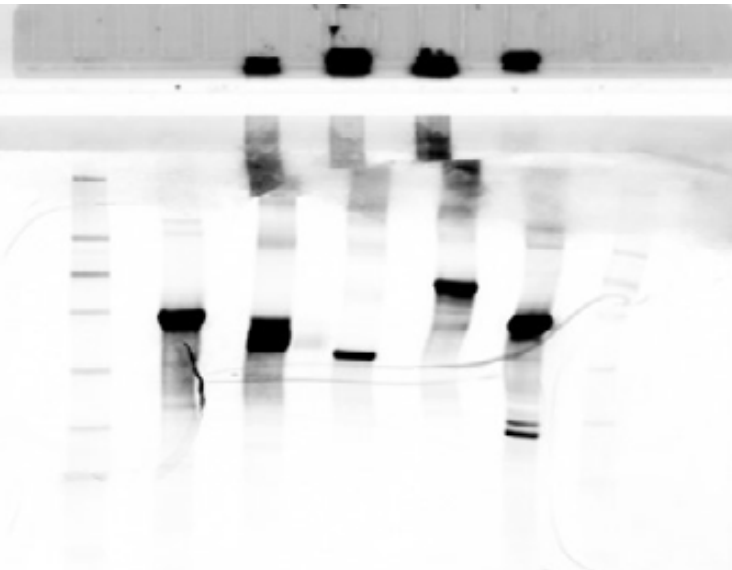
转印时使用 HQ 滤纸, 以避免产生伪影



别忘了海绵和滤纸



每次使用后清洁印迹设备



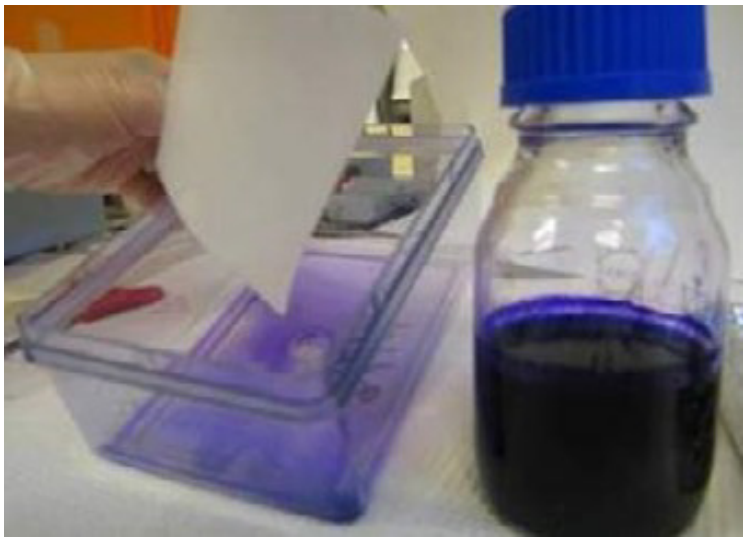
不要撕扯凝胶

能做的和不能做的: 荧光

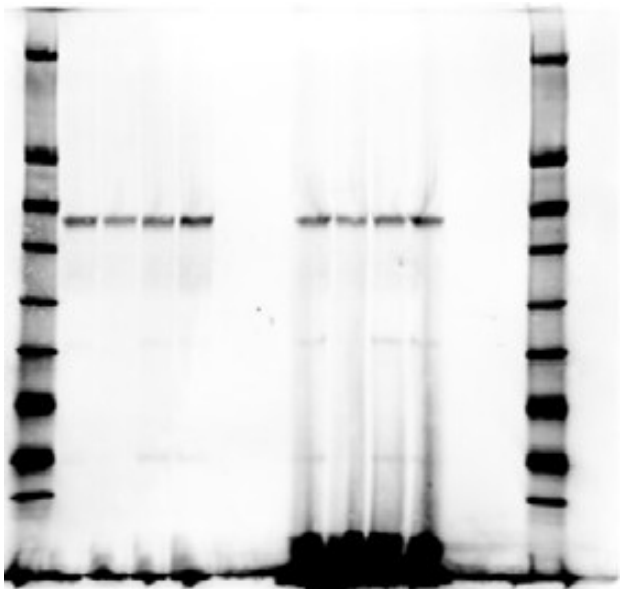
能做	不能做
----	-----



使用无粉手套。



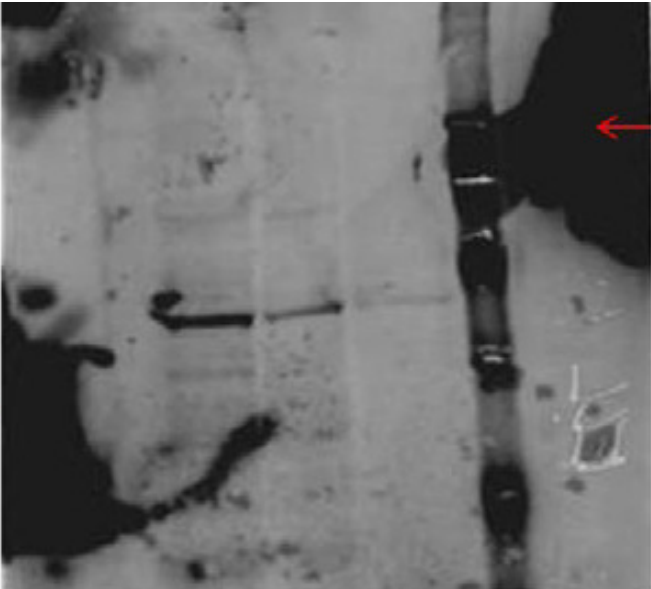
使用干净的容器, 不含考马斯™蓝



橙色 G BPB
Cy™5 通道

无污染和自发荧光物质

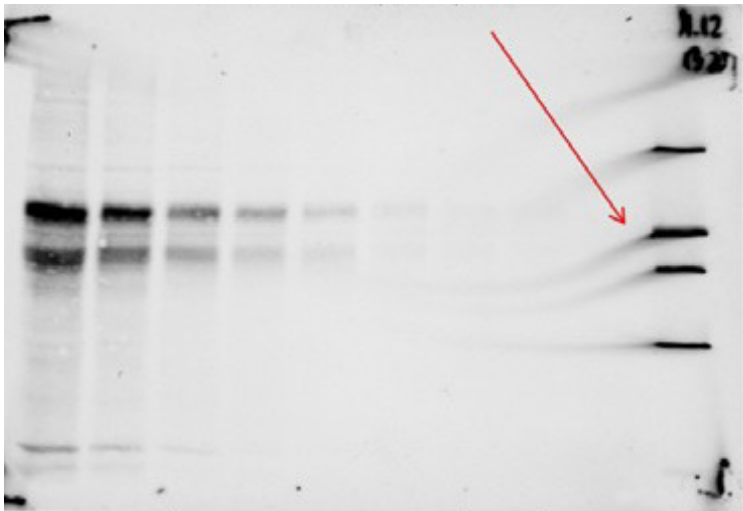
- 考马斯™
- Triton™ X-100
- BPB (更好: 橙色 G)



Cy™5 通道

- 低级乙醇
- 成像前让膜干燥

圆珠笔墨水



近红外通道中的荧光 WB

请勿用笔在膜上写字, 使用铅笔/裁切膜角

表 10.1.蛋白质印迹法常见问题故障排除指南

问题	潜在原因	补救措施
与转印有关的问题		
	转印后膜上的蛋白质极少	- 转印前确保印迹单元已正确装配、封闭和密封 - 转印后, 用总蛋白染色剂对凝胶进行染色, 以确定转印效率, 或使用预染色的分子量标记物直接监测转印是否成功 - 转印后, 用总蛋白染料对膜的一条进行染色(见 4.4.1), 或者用可逆染色剂对整张膜进行染色 - 更换印迹组件中的纤维垫, 因为随着时间的推移它们会被压扁 - 在印迹三明治结构中使用较厚的滤纸
	凝胶和膜之间接触不良	- 将膜放置在凝胶的两侧 - 检查电气连接是否正确, 顺序是否正确 - 在装配夹层时要注意方向: 膜应位于凝胶的阳极(+)侧
膜上的蛋白质条带出现了模糊/扩散	目标被另一种蛋白质(如 IgG 或白蛋白)掩盖	清除这些蛋白质
	转印过程中产生过多热量	对于全湿转印: - 确保槽中有足够的缓冲液覆盖印迹盒。这样可以防止凝胶上产生温度梯度 - 预冷转印缓冲液并在冷室中进行转印 - 尽可能使用冷却循环水浴槽降低电流或电压, 延长转印时间
	样品制备不当会残留不必要的组分, 如脂类、DNA 或过量的蛋白质, 如 IgG 或白蛋白, 从而掩盖目标蛋白质	- 对于半干转印: - 要么缩短运行时间, 要么增加叠放滤纸的数量, 要么降低电流 - 切勿超过 0.8 mA/cm² 的黄金法则 - 优化样品制备流程——有不同类型的样品制备产品可用于清理、消耗和去除 DNA(见第 2 章或参阅 Cytiva 的蛋白质样品制备手册(1))
	凝胶/膜变形或蛋白质电泳分离效果不佳	- 增加分离凝胶在转印缓冲液中的平衡时间 - 在组装和处理印迹堆(滤纸、凝胶、滤膜、海绵)时, 避免不必要的部件移动

问题	潜在原因	补救措施
小分子蛋白质的转印效果不佳	蛋白质保留不足	- 使用相关分子量标记优化转印时间 - 使用聚偏二氟乙烯(PVDF)膜, 其蛋白质结合能力高于硝酸纤维素膜 - 使用较高比例或梯度聚丙烯酰胺凝胶, 有助于在平衡和转印过程中保留蛋白质 - 使用孔径为 0.2 μm 的膜 - 使用两层膜叠放, 以避免蛋白质不发生任何结合反应就流过膜体
	凝胶中微量的十二烷基硫酸钠(SDS)会干扰小分子量蛋白质与膜的结合	- 在转印缓冲液中平衡凝胶至少 15 分钟 - 请勿在转印缓冲液中使用 SDS
	转印缓冲液中平衡凝胶至少 15 分钟 请勿在转印缓冲液中使用 SDS	使用较高比例的甲醇(15% 至 20%)
	蛋白质结合时间不足	较低的电压可能会提高小蛋白质与膜的结合力
大分子蛋白质的转印效果不佳	甲醇浓度过高	将甲醇浓度降至 10% (V/V) 或更低, 应有助于高分子量蛋白质的转印
	蛋白质结合时间不足	- 增加转印时间以提高结合力 - 使用全湿转印, 因为对于大分子蛋白质来说, 全湿转印比半干法转印效率更高
	由于丙烯酰胺浓度较高, 蛋白质被困在凝胶中	- 降低凝胶中丙烯酰胺的比例, 提高大分子蛋白质的分辨率 - 在转印缓冲液中加入 0.1% SDS, 不过这会降低与硝酸纤维素膜结合的效率 备注: 虽然 SDS 可以改善大分子蛋白质的转印, 但有时会导致抗原结合位点失活
带正电荷的蛋白质的转印效果不佳	转印缓冲液中蛋白质的净电荷为正; 蛋白质迁移到阴极 (-)	将转印三明治反转, 使膜位于凝胶的阴极(-)侧
半干转印效果不佳	电流绕过凝胶	确保印迹膜和印迹纸完全按照凝胶尺寸裁剪, 没有重叠部分
膜水合不完全	转印效果差, 背景不均匀, 转印不均匀	- 在印迹仪中组装前, 确保整个膜在转印缓冲液中彻底预浸湿和平衡 - PVDF 膜在搭配水溶液使用前应在甲醇中预浸湿(见 10.2)——整个膜应均匀地从不透明状态变为半透明状态 备注: PVDF 膜必须始终保持湿润。如果膜被放置干透, 应重复整个浸湿流程
转印结果不均	膜下或叠层之间出现气泡	- 为避免气泡残留在膜的内部, 请将膜小心地放在甲醇表面进行预浸湿(见 10.1)。 - 浸泡膜会夹带空气 - 用干净的移液管将凝胶和膜之间的气泡挤出, 以确保紧密接触
	手指污染	避免用手触碰膜务必戴手套并使用钝头镊子(见 10.3)
	膜的某些部分可能已经干透	避免膜干透

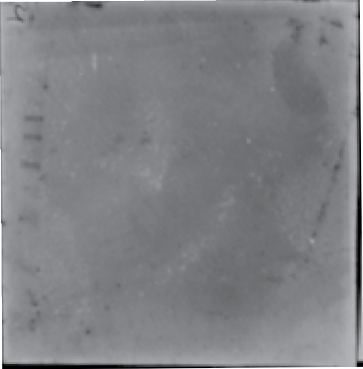
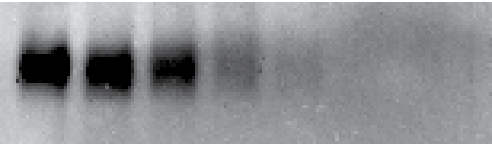
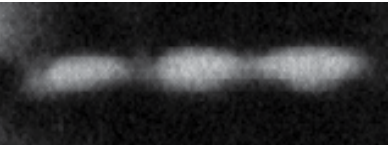
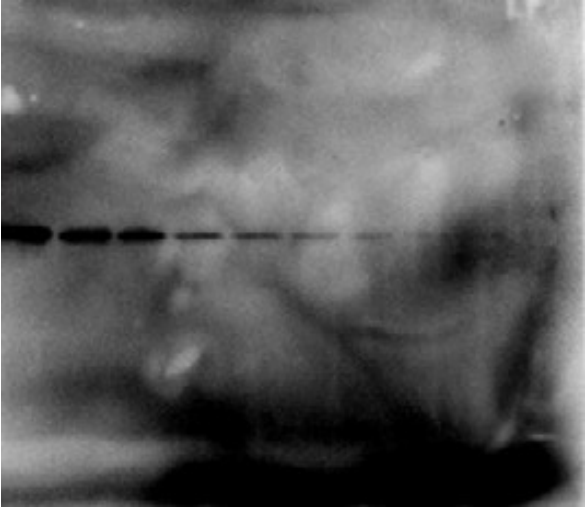
与标记和检测相关的问题

信号弱

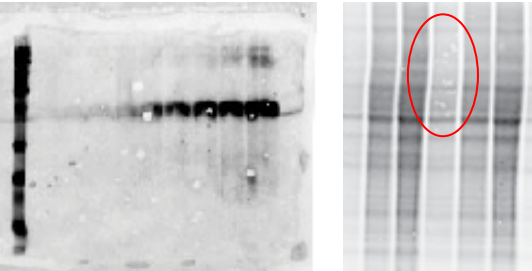
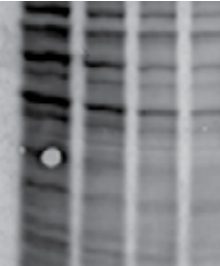
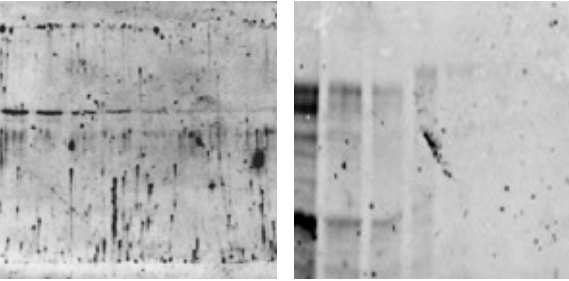
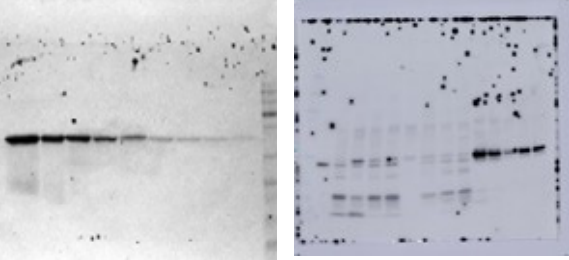
	选错封闭剂, 它可能与相关蛋白质有很强的亲和力	- 尝试使用不同的封闭溶液, 降低封闭剂浓度 - 如果要分析磷酸化蛋白质, 请勿使用具有潜在磷酸酶活性的封闭剂, 如粗蛋白 - 使用斑点印迹法检查封闭剂和检测试剂的兼容性(见第 5 章和 11.9.1 和 11.9.2)。 - 请勿使用会干扰目标蛋白质或所用抗体的封闭剂——请注意, 牛奶中含有多种不同的蛋白质, 且各批次中的含量可能不同 - 使用生物素/链霉亲和素时, 请勿将牛奶用作封闭剂 - 降低去垢剂浓度——通常 0.05%-0.1% 的 Tween-20 或 SDS 就足以降低高背景, 而不会对特异性信号产生负面影响 - 对于单克隆或高度纯化的抗体, 最好使用不含去垢剂的缓冲液 - 通过实验确定优化信噪比所需的清洗次数 - 分析磷酸化蛋白质时, 请勿使用含磷酸盐的缓冲液, 如磷酸盐缓冲盐水(PBS)
	抗体/抗原被过度封闭所掩盖	请勿在室温下封闭超过 1 小时。如果需要更长的封闭时间, 请将膜保存在 4°C 下
	曝光时间较短	如果使用 CCD 成像仪或 X 射线胶片, 请延长曝光时间一些 CCD 成像仪具有自动曝光和/或增量曝光功能, 在最佳曝光时间未知的情况下非常有用。
	抗体反应时间不足和反应温度不正确	- 在室温下孵育会增加特异性和非特异性信号, 如果反应时间过长, 会导致高背景(见 10.1)。 - 如果在 4°C 进行孵育, 则应留出足够的时间(12 至 16 小时)让抗体与印迹蛋白发生反应。
	过度或强力清洗	使用更温和的清洗程序
	非活性抗体	确保一抗对蛋白质有足够的特异性; 在进行完整的蛋白质印迹法分析前, 先进行斑点印迹测试(见第 11 章)
	抗体浓度低	优化抗体浓度(见附录)
	一抗不适用于蛋白质印迹法	- 查看生产商提供的说明, 确保抗体已被认证适用于蛋白质印迹法 - 通过斑点印迹测试抗体 - 必要时更换抗体
	二抗被叠氮化钠抑制	如果使用基于辣根过氧化物酶 (HRP) 的检测系统, 请确保抗体溶液不含叠氮化钠(一种常见的防腐剂)
	检测试剂过期或储存不当 样品中蛋白质含量不足或目标蛋白质含量低	- 注意生产商提供的关于抗体、其他检测试剂有效期和储存条件的说明 - 用滴定法测量蛋白质样本, 确保凝胶中含有足够的蛋白质 - 在进行蛋白质印迹法分析之前, 先对蛋白质样本进行斑点印迹测试, 以确保能够看到信号(见附录) - 检查蛋白质测定实验与缓冲液是否兼容, 以确保蛋白质量的正确测量 - 加载更多样品或增加目标蛋白质

信号弱



问题	潜在原因	补救措施
无信号 	抗体浓度低	优化抗体浓度(见附录)
	二抗来源物种错误	确保二抗靶向的是孵育一抗的物种
	抑制 HRP	抗体溶液或水中的叠氮化钠可抑制 HRP如果发生这种情况, 请使用无叠氮缓冲液中稀释的抗体对膜进行剥离和重新检测
	靶定天然蛋白质孵育的抗体	- 确保您使用的抗体已通过蛋白质印迹法应用验证, 并能识别样品中存在的蛋白质形式例如, 针对天然蛋白质的抗体可能无法与变性蛋白质结合 - 如有必要, 剥离膜(见 5.3)并使用合适的抗体重新检测(使用斑点印迹法检查, 见 11.9.1 和 11.9.2 或蛋白质印迹法, 见 11.1)
	一抗和二抗不兼容	确保二抗靶向的是孵育一抗的物种
	检测试剂失效	检测试剂可能会因交叉污染而失活——在暗室中, 将 1 μL HRP 标记的抗体或类似试剂加入少量配制好的 ECL 检测试剂中, 以检查试剂(如果功能正常, 应能看到蓝光, 参见第 11 章)
白色条带(ECL 检测) 	目标蛋白质未达到可检测水平	使用阳性对照来测试印迹程序
	产生了过多信号	降低抗体或蛋白质的浓度, 因为过量的抗体或蛋白质会导致极高的局部信号水平(通常在单个条带上), 从而导致底物在此处快速消耗殆尽。由于该反应完成后不会产生光, 因此在曝光时会出现白色条带。
高背景 	非特异性蛋白质与膜结合	- 增加封闭试剂的浓度和/或封闭时间 - 确保设备和部件保持洁净, 没有先前转印留下的残留物 - 缓冲液和试剂只能使用超纯水配制
	清洗次数不够	- 增加清洗步骤的数量和清洗缓冲液的用量 - 在清洗缓冲液中加入 0.1% (V/V) Tween-20 备注: 增加 Tween-20 的浓度可改善背景, 但也会影响抗体的结合 - 增加清洗步骤的时间 - 确保清洗缓冲液在膜上充分移动——使用倾斜台或适当设计的印迹处理器
	缓冲液中去垢剂浓度错误	0.05% 至 0.1% 的 Tween-20 常用于清洗缓冲液
	封闭不足	- 确保为所使用的应用和检测系统提供适当的封闭条件 - 使用另一种封闭剂 - 使用新配制的完全溶解的封闭剂 - 提高工作抗体溶液中封闭剂的浓度 - 延长封闭孵育时间和/或提高温度 - 通常使用 1% 至 10% 的封闭剂进行封闭, 但也可略微增加浓度以提高信噪比 - 将膜在 37°C 下浸泡 1 小时可以解决一些持续存在的背景问题——一般来说, 封闭时间不应超过 2 小时

问题	潜在原因	补救措施
高背景(见 10.1)	高浓度二抗	- 必须按照生产商提供的说明稀释抗体, 稀释范围通常为 1:100 至 1:500 000。 - 为改善结果, 请优化抗体浓度(附录)
	蛋白质之间的相互作用	在开始蛋白质印迹分析之前, 检测目标蛋白质与用于斑点印迹封闭的蛋白质之间是否会发生相互作用——妥善保存所有试剂
	试剂质量差	遵循生产商提供的说明, 注意抗体的有效期——过期抗体可能导致高背景
	封闭剂与抗体之间的交叉反应	在不含印迹蛋白的封闭膜上进行斑点印迹实验, 以测试交叉反应——出现信号表明应更换封闭剂
	抗体质量差	使用高质量的亲和性纯化抗体(见第 11 章)
分辨率低	凝胶质量差	使用新鲜凝胶——不要使用过期凝胶、干透的凝胶或错误储存的凝胶
高背景(见 10.1)	检测到的印迹过度曝光	- 尽量减少胶片曝光时间 - 如果使用电荷耦合设备 (CCD) 成像仪, 请使用自动检测功能。或者, 先在短时间内进行暴露, 然后根据短时间曝光后的信号强度选择最佳曝光时间 - 使用光检测时, 在重新曝光胶片之前, 应将印迹放置几分钟, 让信号衰减——使用基于碱性磷酸酶 (AP) 的化学发光系统可能需要较长的时间
		可能需要较长的时间
		滴定抗体和/或减少凝胶上的蛋白质质量
	胶片已过使用期限	确保胶片按照生产商的建议存放, 并且没有超过有效期——必要时更换胶片
	暗室不遮光	在背景持续存在的情况下, 请确保暗室完全避光, 并使用合适的安全光源
非特异性结合	一抗浓度高	优化抗体浓度(见附录)
	二抗浓度高	优化抗体浓度(见附录)
	抗原浓度高	减少凝胶上的蛋白质含量
	意外出现的低分子量条带	- 为避免蛋白质降解或蛋白水解, 尽量缩短样品制备和电泳之间的时间 - 仅使用在冰上保存的新鲜样品, 以避免降解 - 使用蛋白酶抑制剂, 避免激活蛋白酶 - 使用替代抗体, 避免与其他具有类似表位的蛋白质发生交叉反应
		- 您的蛋白质有几种剪接变异体 - 在 SDS 还原条件下, 可以检测到蛋白质亚基——如果可能, 请查阅文献中的蛋白质结构——意外出现的条带可能不是伪影!
	意外出现的高分子量条带	使用可去除翻译后修饰(PTM)并导致目标蛋白质分子量变化的制剂
	一抗与其他蛋白质非特异性结合	使用更严格的清洗程序, 改变清洗缓冲液中的高盐和低盐浓度

问题	潜在原因	补救措施
非特异性结合	意外出现的极高分子量条带	• 为避免蛋白质发生二聚反应, 只能使用新鲜的二硫苏糖醇(DTT)或 β-巯基乙醇 • 给凝胶上样前, 先加热蛋白质样品使其变性
	不同分子量的多个条带	• 使用为蛋白质印迹法制备的高质量抗体, 优化抗体浓度(附录) • 使用阴性对照检查交叉反应
结果失真		
	印迹上有指纹、折痕或镊子印记	• 避免用手触碰膜(始终戴手套并使用钝头镊子)——在使用 Amersham™ ECL Plex™ 时, 这种污染尤其要注意 • 使用不含残留蛋白质染色剂(如考马斯亮蓝)的容器
	样品和膜之间夹带气泡(见 10.1)	• 确保膜与样品紧密接触——必要时, 用移液管在包裹着保鲜膜的膜上来回滚动, 排出气泡 • 牢牢合上胶片盒, 进行胶片曝光
背景出现斑点		
	封闭剂中出现聚集物	• 确保封闭剂完全溶解在缓冲液中——必要时, 可稍微加热溶液并充分混合 • 确保膜在整个孵育过程中完全浸没
	HRP 偶联的二抗中出现聚集物	• 用 0.2 μm 的过滤器过滤样品 • 使用高质量的新型偶联物
	曝光设备不清洁或不适当	• 如果出现局部变黑, 确保盒体清洁 • 避免使用胶带 • 尽可能保持样品干燥, 避免冷凝 • 如果使用放射自显影或荧光检测, 在 -70°C 曝光后, 先让胶片盒恢复室温, 然后再取出胶片

问题	潜在原因	补救措施
与荧光检测相关的问题		
高背景	印迹膜发出高背景荧光	• 荧光检测时使用低荧光膜, 如 Amersham™ Hybond™ LFP 0.2(PVDF)或 Amersham™ Protran™ 和 Protran™ Premium(硝酸纤维素) • 确保在转印前从凝胶上剪下溴酚蓝前沿, 因为这种染料会发出荧光 • 确保使用干净的孵育托盘, 之前没有装过考马斯蓝等染色剂 • 使用 Tween-20, 因为其他去垢剂可能与 Cy™3 通道不兼容 • 最后的清洗应在不含去垢剂的 PBS 或 TBS 中进行
多重检测问题	实验设计	• 确保二抗能区分物种特异性一抗 • 在扫描前, 膜应适当干燥
背景出现斑点	印迹表面有灰尘或粉末颗粒	• 确保所有材料完全清洁, 无荧光污染物 • 成像前用 70% 的乙醇和去离子水擦拭扫描仪表面, 或者遵循生产商的建议在使用前后清洁扫描仪表面 • 请勿用手指处理膜——请使用干净的镊子, 并戴上无粉手
	膜上残留聚丙烯酰胺凝胶	• 小心移除凝胶碎片
	在膜上使用圆珠笔(见 10.3)	• 通过剪角标记膜
信号低	全湿印迹	• 使用低荧光膜 • 跳过封闭步骤, 转印后直接在环境温度下将膜晾干至少 2 小时——然后用甲醇重新浸湿膜, 最后用缓冲液清洗
	印迹被光漂白	• 有些染料对光漂白很敏感——在二抗孵育期间和孵育后保护膜不受光照影响
	选用了错误的激发波长或发射光滤光片	• 始终遵循生产商关于荧光基团激发/发射波长的说明
	成像仪设置不正确	• 如果使用 CCD 成像仪, 请选择正确的曝光时间如果使用扫描仪, 请为光电倍增管 (PMT) 选择正确的电压

10.2 与运行缓冲液和膜处理有关的问题

我们建议在扫描前将膜晾干(即避免膜部分干燥, 部分湿润, 如图 10.2 所示)。扫描干燥的膜通常能获得更均匀的背景和更高的信噪比。

如果在 PAGE 过程中运行缓冲液中没有 SDS, 则灵敏度会降低, 蛋白质条带会变得更加分散(图 10.3)。Amersham™ Hybond™ LFP 0.2 膜必须在甲醇中预浸湿(图 10.3 左), 以便高效地将蛋白质从凝胶转印到膜上。图 10.3 右侧的膜未经预浸湿。

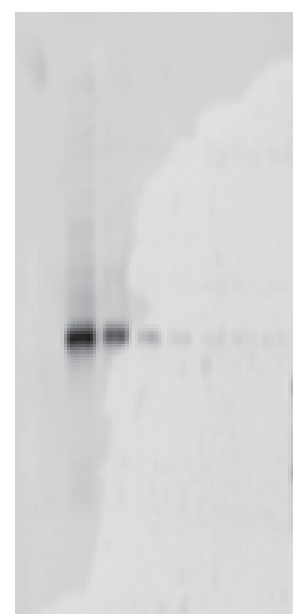


图 10.2. 右侧为未完全干燥的膜, 条带非常微弱。

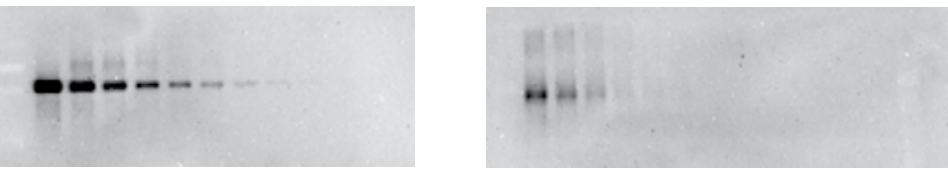


图 10.3. 运行缓冲液中的 SDS(左)会在膜上形成明显的条带。如右图所示, 在不使用 SDS 的情况下, 灵敏度会降低, 蛋白质条带会更加分散。

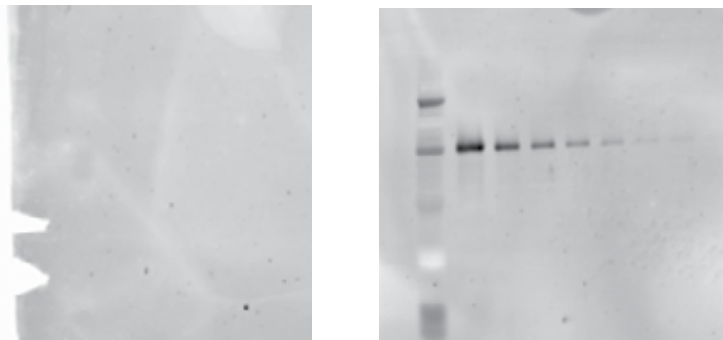


图 10.4. Amersham™ Hybond™ LFP 0.2 膜必须在甲醇中预浸湿(右), 以便高效地将蛋白质从凝胶转印到膜上。左侧的膜未经预浸湿。

10.3 提高蛋白质印迹效率的其他技巧

图 10.5 至 10.9 描述了蛋白质印迹法准备过程中的一些重要环节, 这些环节有时会被忽视, 导致结果不理想。



图 10.5. 使用平头、干净、表面光滑的镊子。



图 10.6. 请勿在未戴手套的情况下接触膜——请使用镊子!



图 10.7. 使用 Amersham™ ECL Plex™ 时, 避免用圆珠笔在膜上做标记——可剪开膜角或用铅笔在膜上做标记。

11

方案与配方

 在本章中, 如果缓冲液和溶液的成分中含有水, 则应使用蒸馏水或去离子水。

11.1 蛋白质印迹法标准流程

1. 制备样品, 加入上样缓冲液, 在 95°C 下加热 5 分钟。
2. 在上样前, 将所有样本放入微离心管中, 以 12 000 × g 的速度离心 2 至 5 分钟, 以去除任何聚集物。
3. 将凝胶放入电泳设备, 并加入适当的运行缓冲液。
4. 取下电泳梳, 用运行缓冲液冲洗上样孔。
5. 将样品和分子量标记物装入孔中。
6. 将安全盖放在设备上, 然后将颜色编码的导线插入电源插孔(红对红, 黑对黑)。
7. 在适当条件下运行凝胶。
8. 当示踪染料到达凝胶底部时, 关闭电源, 断开导线, 取下安全盖。
9. 从电泳仪中取出凝胶盒。
10. 切掉堆积凝胶, 从分离凝胶的下部切下一角。注意剪下的是哪个角。如果凝胶在平衡过程中“翻转”, 这能帮助您正确调整凝胶方向。

注意: 从第 11 步开始描述的步骤特指全湿转印。

11. 在转印缓冲液中平衡凝胶至少 10 到 15 分钟。
12. 在转印缓冲液中预浸湿并平衡膜 5 分钟。

 PVDF 膜在转印缓冲液中平衡前需要在甲醇和水中预浸湿。

13. 将电转印盒放入装有 3 cm 深冷冻转印缓冲液的托盘中。组装转印堆, 使蛋白质向膜迁移。
对于带负电荷的蛋白质, 将转印堆放在面对阳极(+)的那一半盒上。
14. 预浸湿一块海绵, 将其放在盒体浸没的部分。轻轻按压, 去除气泡。

15. 将两张预先浸湿的印迹纸放在海绵上。

16. 将膜放在印迹纸上。

17. 将凝胶放在膜上。

18. 将额外两张预先浸湿的印迹纸放在凝胶上。

19. 最后将预先浸湿的海绵放在印迹堆上, 轻轻按压以去除气泡, 然后合上凝胶盒

20. 在转印槽中加入预冷的转印缓冲液。

 非必需! 在转印过程中加入搅拌磁铁, 使缓冲液循环流动。

21. 将凝胶盒放入转印槽。

22. 将转印槽连接到电源上, 并按照生产商的建议进行转印。

23. 转印后, 在室温下用适当的封闭液封闭膜 1 小时。

24. 与一抗在室温下孵育 1 小时或在温度为 4°C 的条件下孵育整夜。

25. 用含 Tween-20 的磷酸盐缓冲盐水 (PBS-Tween) 或含 Tween-20 的 Tris-缓冲盐溶液 (TBS-Tween) 清洗膜, 每轮 3 到 6 次, 每次 5 分钟(若是荧光检测清洗 3 次, 每次 1 分钟)。

26. 室温下与二抗孵育 1 小时。

27. 用 PBS-Tween 或 TBS-Tween 清洗膜 3 到 6 次, 每次 5 分钟(若是荧光检测清洗 3 次, 每次 1 分钟)。

28. 根据所选检测系统的说明继续进行蛋白质检测。

11.2 样品制备

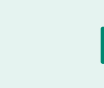
样品制备方法的选择取决于样品的性质。一般来说, 如果样品由容易裂解的细胞组成, 则应使用温和的方法, 而如果要破坏较稳健的细菌或植物细胞, 或嵌入结缔组织中的哺乳动物细胞, 则需要使用更为强力的方法。为分析只能部分溶解的结缔组织蛋白质而采取另一种方法。但是, 无论相关蛋白质的来源和用途如何, 任何提取程序都必须具有足够的破坏性, 以便从蛋白质的原位环境中提取蛋白质, 但又必须足够温和, 以免破坏重要的结构特征。与此同时, 提取程序必须同时兼顾蛋白质的得率与纯度。第 2 章中的表 2.1 列出了一些最常用的提取方法, 并说明了这些方法对处理特定细胞或组织的适用性。

11.2.1 用哺乳动物蛋白质提取缓冲液提取蛋白质

下面我们将介绍如何使用 Cytiva 的哺乳动物蛋白质提取缓冲液, 这是一种专门用于从哺乳动物的贴壁和悬浮细胞中提取蛋白质的溶液。

-  根据不同的应用, 可在缓冲液中加入二硫苏糖醇(DTT)和乙二胺四乙酸(EDTA)。
-  在提取过程中加入蛋白酶抑制剂混合物。使用预冷缓冲液并在冰上操作。

11.2.1.1 从悬浮细胞中提取蛋白质

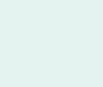
- 用 3000 × g 的离心力将细胞离心 5 分钟。取出并弃去上清液。
- 用 5 至 10 mL 预冷 PBS 清洗细胞颗粒一次。再次通过离心沉淀细胞。去除并弃去 PBS 清洗液。
- 加入哺乳动物蛋白质提取缓冲液, 悬浮细胞团。每 10 mL 悬浮培养液中加入 1 mL 哺乳动物蛋白质提取缓冲液。或者, 每 0.05 克湿细胞团中加入 1 mL 哺乳动物蛋白质提取缓冲液。
 -  若要获得更浓缩的细胞提取物, 可减少加入细胞团中的哺乳动物蛋白质提取缓冲液的量。在这种情况下, 一个冷冻和解冻周期可确保细胞完全裂解。
- 用移液管悬浮细胞, 直到得到均匀的悬浮液。将裂解液在冰上孵育 15 至 30 分钟。定期摇动或短暂涡旋悬浮液。
- 在冷藏离心机中以 20 000 × g 的速度离心 30 分钟。收集裂解液, 用于下游处理和分析。

11.2.1.2 从贴壁细胞中提取蛋白质

- 去除贴壁细胞上的培养填料。
- 用 PBS 清洗细胞一次。去除 PBS 清洗液。
- 加入适量的哺乳动物蛋白质提取缓冲液以覆盖培养表面积(表 11.1)。或者, 也可以从表面刮取细胞, 在后续步骤中作为悬浮细胞处理。

表 11.1.裂解缓冲液中的蛋白酶抑制剂

缓冲液体积/孔 (μL)	培养板类型
50 至 100	96 孔板
100 至 200	24 孔板
200 至 400	6 孔板
250 至 500	直径 60 mm 的培养板
500 至 1000	直径 100 mm 的培养板

- 轻轻摇晃培养板 10 分钟。用塑料手术刀或“橡胶淀帚”轻轻将细胞从培养板上剥离。
 -  若要获得更浓缩的细胞裂解液, 可减少加入培养板中的哺乳动物蛋白质提取缓冲液的量。对培养板或培养孔进行一次冷冻和解冻循环。
- 裂解液(包括细胞碎片)可直接从培养孔/培养板中使用。或者, 将裂解液转移到试管中, 以20 000 × g 的速度离心 30 分钟。收集澄清的裂解液用于下游处理和分析。

11.2.2 样品净化

为了使含有十二烷基硫酸钠(SDS)的凝胶中的蛋白质样品产生清晰、无变形且宽度恒定的条带, 每个样品必须具有相同的缓冲液和离子成分。但是, 实验室样品的缓冲盐或去污剂含量往往不同, 这可能导致分辨率不达标和泳道变形。需要注意的是, 虽然在电泳前可以采用不同复杂程度的其他策略来制备样本, 但简单的细胞裂解和离心可能就足以对细胞样本进行蛋白质印迹法分析。

下文将介绍如何使用 Cytiva 的两种净化产品。

11.2.2.1 从悬浮细胞中提取蛋白质(Cat No.8064870)

SDS-PAGE 净化试剂盒专用于制备因高电导率或蛋白质浓度低而难以分析的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 样品。该试剂盒可定量沉淀蛋白质, 同时将去垢剂、盐分、脂质、酚类和核酸等干扰物质留在溶液中。然后将蛋白质重悬并与 SDS-PAGE 上样缓冲液混合。整个定量过程可在 2 小时内完成。。试剂盒中的试剂足以处理 50 份样品, 每份样品最多 100 μL。可对该过程进行工艺放大, 以处理更大体积或更稀释的样品。

 始终将微离心管置于离心转子中, 使管盖铰链朝外。这样, 细胞团就会始终位于离心管的同一侧, 不受干扰, 从而最大限度地减少损失。

所需材料

- 1.5 mL 微离心管
 - 微型离心机能够在 4°C 条件下以 12 000 × g 或更高的速度旋转离心管
 - 涡旋振荡器
 - β-巯基乙醇或 DTT
 - 加热水浴槽至沸腾或将加热块温度设置为 95°C
- 在此过程使用的溶液中蛋白酶通常没有活性, 但如果需要, 也可以在样品溶液中加入蛋白酶抑制剂。

初步制备

将清洗缓冲液在 -20°C 下放置至少 1 小时后再开始操作。清洗缓冲液可保存在 -20°C 的冰箱中。

在上样缓冲液中加入还原剂。还原剂可选用 DTT 或 β-巯基乙醇。如果使用 DTT, 每 100 μL SDS-PAGE 上样缓冲液中加入 3.1 mg。确保其完全溶解。如果使用 β-巯基乙醇, 每 100 μL 上样缓冲液中加入 5 μL。添加还原剂后, 应立即使用上样缓冲液, 因此还原剂只应添加到单次实验所需的上样缓冲液中。另外, 也可将上样缓冲液中的还原剂等份分装并保存在 -20°C 温度下。

蛋白质样品应基本上不含颗粒物质。必要时离心澄清。

用 1.5mL 微离心管处理蛋白质样品。除非另有说明, 否则所有步骤都应在冰上进行。始终将微离心管置于离心转子中, 使管盖铰链朝外。这样, 细胞团就会始终位于离心管的同一侧, 不受干扰, 从而最大限度地减少损失。

1. 将 1 至 100 μL 蛋白质样品(含 1 μg 至 1 mg 蛋白质)转移到 1.5 mL 微离心管中。
2. 加入 300 μL 沉淀剂(标记为“1”), 涡旋或倒置混匀。在冰上孵育 15 分钟。
3. 在蛋白质和沉淀剂的混合物中加入 300 μL 共沉淀剂(标记为 “2”)。
短暂涡旋混匀。
4. 在微型离心机中以最高转速(至少 12 000 × g)离心试管 5 分钟。离心结束后立即从离心机中取出试管。应该能看到一个小颗粒团。迅速进入下一步, 以避免颗粒团再次悬浮或散开。
5. 通过倾析或小心移取, 尽可能多地去除了清液。不要扰动颗粒团。
6. 像之前一样, 小心地将试管重新放入微型离心机中, 盖子铰链和颗粒团朝外。再次离心试管, 让剩余液体沉淀到管底。一个短暂的脉冲就足够了。用微量移液管吸头吸取剩余的上清液。试管中应无可见液体残留。
7. 用移液管在每个颗粒团上滴 25 μL 水。将每个试管涡旋 5 至 10 秒。颗粒团应分散开来, 但不溶于水。
8. 加入 1 mL 在 -20°C 至少预冷 1 小时的清洗缓冲液(标记为 “3”)和 5 μL 清洗添加剂(标记为“4”)。涡旋直至颗粒团完全分散。
 蛋白质颗粒团不会溶解在清洗缓冲液中。
9. 将试管在 -20°C 下孵育至少 30 分钟。每 10 分钟涡旋 20 至 30 秒。
 在此阶段, 试管可在 -20°C 条件下保存 1 周, 蛋白质降解或变性的程度极小。
- 10.在微型离心机中以最高转速(至少 12 000 × g)将试管离心 5 分钟。
- 11.小心移除并弃去上清液。应该能看到一个小的白色颗粒团。让颗粒团短暂风干(不超过5分钟)。



干燥颗粒团的时间不要超过 5 分钟。如果颗粒团过于干燥,就很难重新悬浮。

12.用 5 至 40 μL 缓冲液 I(标记为“5”)重悬颗粒团。短暂涡旋并在冰上孵育 5 分钟。



样品的适当重悬量取决于多种因素,包括原始样品的蛋白质浓度、SDS-PAGE 所用凝胶系统的容量以及用于显示凝胶中蛋白质的检测方法的灵敏度。如果颗粒团较大或过于干燥,可能需要一段时间才能完全重新悬浮。声波处理或使用 Cytiva 的样品研磨试剂盒进行处理可以加快重悬。

13.步骤 12 中每使用 5 μL 缓冲液 I,就加入 1 μL 缓冲液 II(标记为“6”)。短暂涡旋并在冰上孵育 5 到 10 分钟。

14.加入等体积(6 至 48 μL)的 SDS-PAGE 样品缓冲液(标记为“7”),其中已加入还原剂(DTT 或 β -巯基乙醇)(见初步制备)。如果溶液变黄,以 0.5 μL 为增量加入缓冲液 I,直至溶液变蓝。

15.涡旋样品 5 至 10 秒,室温孵育 5 至 10 分钟。将样品管放入沸腾的水浴槽或 95°C 的加热块中 3 分钟。

16.短暂离心试管,让管中液体沉淀到管底。一个短暂的脉冲就足够了。轻轻敲击试管,确保内容物已混合。然后便可进行上样。使用 Cytiva 的 2D Quant 试剂盒测定样品的蛋白质浓度,该试剂盒可准确定量上样缓冲液中的蛋白质。

11.2.2.2 2D 净化试剂盒

2D 净化试剂盒的设计专用于制备 2D 凝胶电泳样品,否则会因为电导率高、干扰物质含量高或浓度低而导致结果不佳。该试剂盒可定量沉淀蛋白质,同时将去垢剂、盐分、脂质、酚类和核酸等干扰物质留在溶液中。然后在与一维等电聚焦(IEF)兼容的溶液中重新悬浮蛋白质。该过程可在 1 小时内完成,不会造成斑点增减。试剂盒中的试剂足以处理 50 份样品,每份样品最多 100 μL 。可对该过程进行工艺放大,以处理更大体积或更稀释的样品。

所需材料

- 1.5 mL 微离心管
- 微型离心机能够在 4°C 条件下以 12 000 $\times g$ 或更高的速度旋转离心管
- 用于重悬的再水合溶液或样品溶液
- 涡旋振荡器

初步制备

将清洗缓冲液在 -20°C 下放置至少 1 小时后再开始操作。清洗缓冲液可保存在 -20°C 的冰箱中。蛋白质样品应基本上不含颗粒物质。必要时离心澄清。

用 1.5 mL 微离心管处理蛋白质样品。除非另有说明,否则在进行所有步骤时,试管都应被放置在冰桶中。

1. 将 1 至 100 μL 蛋白质样品(含 1 至 100 μg 蛋白质)转移到 1.5 mL 微离心管中。
2. 加入 300 μL 沉淀剂,涡旋或倒置混匀。在冰上孵育 15 分钟。
3. 在蛋白质和沉淀剂的混合物中加入 300 μL 共沉淀剂。短暂涡旋混匀。
4. 在微型离心机中以最高转速(至少 12 000 $\times g$)离心试管 5 分钟。离心结束后立即从离心机中取出试管。应该能看到一个小颗粒团。迅速进入下一步,以避免颗粒团再次悬浮或散开。
5. 通过倾析或小心移取,尽可能多地去除上清液。不要扰动颗粒团。
6. 像之前一样,小心地将试管重新放入微型离心机中,盖子铰链和颗粒团朝外。再次离心试管,让剩余液体沉淀到管底。一个短暂的脉冲就足够了。用移液管吸头吸取剩余的上清液。试管中应无可见液体残留。
7. 在每个颗粒团上小心滴入 40 μL 水。将试管置于冰上孵育 5 分钟。
8. 像之前一样,小心地将试管重新放入微型离心机中,盖子铰链朝外。再次离心 5 分钟。使用移液管吸头吸走并弃去清洗液。

所需材料

- 沉淀剂、共沉淀剂、铜溶液、显色试剂 A 和 B 以及牛血清
- 白蛋白(BSA)标准溶液(随试剂盒提供)
- 2 mL 微离心管
- 涡旋振荡器
- 微型离心机
- 可见光分光光度计

1. 将 100 份显色试剂 A 与 1 份显色试剂 B 混合, 制备适当体积的工作显色试剂。

 每次检测需要 1 mL 工作显色试剂。工作显色试剂可在 4°C 至 8°C 下保存 1 周, 或只要溶液在 480 nm 波长下的光密度 (OD) 保持在 0.025 以下即可。

2. 将 BSA 标准溶液(2 mg/mL)加入六个试管中, 制成标准曲线, 最终量分别如下: 0(不添加)、10、20、30、40 和 50 µg。

 只要样品量不超过 50 µL, 检测的准确性就不会受到样品量的影响。因此, 没有必要将标准溶液或样品溶液稀释到恒定体积。

3. 在不同的试管中加入 1 至 50 µL 的待测样品, 以制备样品。调整此体积以确保加入的蛋白质量在检测的工作范围内(0.5 至 50 µg)。

4. 每个试管(包括标准曲线试管)中加入 500 µL 的沉淀剂。短暂涡旋并在室温下孵育 2 到 3 分钟。

5. 每个试管中加入 500 µL 共沉淀剂, 涡旋或倒置短暂混合。

6. 将试管以至少 10 000 × g 的速度离心 5 分钟。用移液管弃吸走清液。建议再进行一次短暂的脉冲处理, 然后用微量移液管清除剩余的上清液。

7. 每个试管中加入 100 µL 铜溶液和 400 µL 水。短暂涡旋以溶解沉淀的蛋白质。

9. 用移液管在每个颗粒团上滴 25 µL 水。将每个试管涡旋 5 至 10 秒。颗粒团应分散开来, 但不溶于水。

10. 加入 1 mL (在 -20°C 至少预冷 1 小时)的清洗缓冲液和 5 µL 清洗添加剂。涡旋直至颗粒团完全分散。

 蛋白质颗粒团不会溶解在清洗缓冲液中。

11. 将试管在 -20°C 下孵育至少 30 分钟。每 10 分钟涡旋 20 至 30 秒。

 在此阶段, 试管可在 -20°C 条件下保存 1 周, 蛋白质降解或变性的程度极小。

12. 在微型离心机中以最高转速(至少 12 000 × g)将试管离心 5 分钟。

13. 小心移除并弃去上清液。应该能看到一个小的白色颗粒团。让颗粒团短暂风干(不超过 5 分钟)。

 干燥颗粒团的时间不要超过 5 分钟。如果颗粒团过于干燥, 就很难重新悬浮。

14. 将每个颗粒团重新悬浮在适当体积的再水合或 IEF 样品上样溶液中, 用于一维 IEF。涡旋试管至少 30 秒。室温下孵育, 通过涡旋或用移液管上下移动使其完全溶解。

 如果颗粒团较大或过于干燥, 可能需要一段时间才能完全重新悬浮。声波处理或使用 Cytiva 的样品研磨试剂盒进行处理可以加快重悬。

15. 在微型离心机中以最高转速(至少 12 000 × g)将试管离心 5 分钟, 以去除任何不可溶物质并减少气泡。上清液可直接用于一维 IEF, 或转移到另一个试管中, 保存在 -80°C 温度下, 以备日后分析。干燥颗粒团的时间不要超过 5 分钟。如果颗粒团过于干燥, 就很难重新悬浮。

11.2.3 使用 2D Quant 试剂盒测量浓度

2D 净化试剂盒的设计专用于制备 2D 凝胶电泳样品, 否则会因为电导率高、干扰物质含量高或浓度低而导致结果不佳。该试剂盒可定量沉淀蛋白质, 同时将去垢剂、盐分、脂质、酚类和核酸等干扰物质留在溶液中。然后在与一维等电聚焦(IEF)兼容的溶液中重新悬浮蛋白质。该过程可在 1 小时内完成, 不会造成斑点增减。试剂盒中的试剂足以处理 50 份样品, 每份样品最多 100 µL。

8. 每个试管中加入 100 μL 工作显色试剂。尽快加入试剂，确保即时混合。倒置混合并在室温下孵育 15 至 20 分钟。

9. 以水为参照物，在 480 nm 波长处读取各样品和标准品的吸光度。应在加入工作显色试剂后 40 分钟内读取吸光度。

10.通过绘制标准品吸光度与蛋白质质量的关系曲线，生成标准曲线。使用此标准曲线测定样品的蛋白质浓度。
- 由于该检测对时间极为敏感，因此所有读数的时间应尽可能接近。自动细胞更换器是最佳解决方案，但如果没有，则应每隔 30 秒错开添加试剂的时间，并在相同的时间间隔后进行读数。虽然具体时间应经过实践测定，但可从 20 分钟的运行时间开始进行测试。

与大多数蛋白质检测方法不同的是，检测溶液的吸光度会随着蛋白质浓度的增加而降低。不要从样品读数中减去空白样品的读数，也不要使用空白样品作为参照。

11.2.4 2× 上样缓冲液

在给凝胶上样前，为每个样品加入等体积的 2× 上样缓冲液(表 11.2)。上样缓冲液可增加样品的密度以方便上样，赋予蛋白质适当的特性以达到最佳分离效果，同时缓冲液中的颜色成分可以在实验进行时作为一个可见的前沿。需要注意的是，为了将样品加入上样缓冲液的稀释效果降至最低，可以使用 5× 上样缓冲液来分析低丰度的目标蛋白。

表 11.2.2× 分离凝胶溶液, 40 mL

	终浓度	体积或质量
0.5 M Tris-HCl (pH = 6.8)	0.125 M	2.5 mL
10% SDS	4%	4 mL
甘油	20%	2 mL
甘油	0.02%	2 mL
DTT ¹	200 mM	0.31 g
水		添加至最终体积为 10 mL

1.DTT 应新鲜制备，并在将上样缓冲液加入样品前加入上样缓冲液中。β-巯基乙醇(500 μL/10 mL)可替代 DTT。

1. 在微管中加入 1 体积的 2× 上样缓冲液。

2. 加入 1 体积的蛋白质样品，其中含有所需数量的蛋白质。

3. 将微管在 95°C 下加热 5 分钟。

4. 将样品放入离心机中离心。

如果不立即使用样品，可将其存放在冰箱中。样品在冰箱中保存后，需要在上样前加热，以溶解沉淀的 SDS。

快速版本——用于定性分析

1. 用标记缓冲液将样品稀释 10 倍

2. 在样品中加入 Cy™ 5

3. 在 95°C 下加热样品 3 至 5 分钟

4. 加入含赖氨酸的上样缓冲液

5. 在 95°C 下加热样品 3 分钟

6. 给凝胶上样

总时长不超过 15 分钟

11.2.5 使用 Amersham™ Quickstain™ 进行预标记

- 1. 将加热块的温度设置为 95°C。
- 2. 加入 2 至 19 μL 细胞裂解液或组织提取物样品, 用样品裂解缓冲液将体积加至 19 μL。对于纯化的蛋白质, 用标记缓冲液按 1:10 比例稀释。
- 3. 加入 1 μL 用超纯水按 1:10 稀释的 Cy™5 染料试剂。

👉 稀释染料必须为新鲜配制并在 30 分钟内使用。
- 4. 短暂涡旋充分混合。在室温下孵育 30 分钟。
- 5. 加入 20 μL 含有新鲜制备的 DTT(最终浓度为 40 mM)的 2× 上样缓冲液。
- 6. 在 95°C 下加热该样品 3 分钟。
- 7. 离心样品。
- 8. 按照生产商的建议进行电泳和蛋白质印迹法检测。

11.3 电泳

不同的供应商可提供各种商用预制凝胶。使用预制凝胶的益处包括: 您不必自己处理丙烯酰胺, 使用起来简单方便。

聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)的一般实验方案

- 1. 制备样品, 加入上样缓冲液, 在 95°C 下加热 5 分钟。

👉 用于变性和还原条件下的 PAGE: 在上样缓冲液中加入 SDS 和还原剂。

👉 用于变性条件下的 PAGE: 在上样缓冲液中加入 SDS。

👉 用于天然条件下的 PAGE: 无 SDS, 无还原剂, 无需加热!

👉 可在上样缓冲液中煮沸样本, 等份分装后在 -20°C 下保存 3 至 4 周, 或在 4°C 下保存 1 周。分析前将样品加热至 37°C 数分钟, 以溶解沉淀的 SDS。

👉 上样前一定要检查蛋白质浓度, 因为上样过量可能会导致“垂直拖尾”。

- 2. 将凝胶放入电泳设备, 并加入适当的运行缓冲液。
- 3. 取下电泳梳, 用运行缓冲液冲洗上样孔。

👉 清洗可去除可能干扰上样的未聚合丙烯酰胺。
- 4. 将样品和分子量标记物装入孔中。

👉 在上样前, 将所有样本放入微管中, 以 12 000 × g 的速度离心 2 至 5 分钟, 以去除任何聚集物。

👉 为便于上样, 可使用细针头, 或使用带有细长针头的汉密尔顿注射器。

👉 切记将上样缓冲液装入所有空孔中(无样品或标记物)。

👉 如果在使用垂直设置时难以看清孔, 可在上样时在槽后放一张纸, 以提高对比度。
- 5. 将安全盖放在设备上, 然后将颜色编码的导线插入电源插孔。
- 6. 在适当条件下运行凝胶。
- 7. 当示踪染料到达凝胶底部时, 关闭电源, 断开导线, 取下安全盖。
- 8. 从电泳仪中取出凝胶盒, 然后进入应用的下一步。

11.3.1 制备含有 SDS 的聚丙烯酰胺凝胶

- 👉 丙烯酰胺和双丙烯酰胺是强效神经毒素, 应小心处理。请遵守当地的安全规定!
- 👉 一定要戴好手套, 穿好实验室工作服。请务必使用通风柜!

用于PAGE的聚丙烯酰胺凝胶分两步浇铸。首先要浇铸分离凝胶, 待凝胶聚合后, 再在其上浇铸堆积凝胶。分离凝胶通常使用浓度和 pH 值均高于堆积凝胶的 Tris 缓冲液以及浓度更高的丙烯酰胺制备。

丙烯酰胺单体原液的制备方法是: 将 30 g 丙烯酰胺和 0.8 g 双丙烯酰胺加入水中, 最后加水至 100 mL。

凝胶浇铸使用的缓冲液

- 4× 分离凝胶缓冲液(1.5 M Tris-Cl, pH 8.8): 在 150 mL 水中加入 36.3 g Tris(相对分子质量, Mr 121.1)。用 HCl 将 pH 值调至 8.8, 然后加水将最终体积调至 200 mL。
- 4× 堆积凝胶缓冲液(0.5 M Tris-HCl, pH 6.8): 在 40 mL 水中加入 3 g Tris(Mr 121.1)。
- 用 HCl 将 pH 值调至 6.8, 然后加水将最终体积调至 50 mL。
- 10% SDS: 在 50 mL 水中加入 10 g SDS, 然后加水将最终体积变为 100 mL。
- 10% 过硫酸铵(APS): 将 100 mg APS 加入 1 mL 水中——使用前应新鲜配制。

制备含有 SDS 的分离和堆积凝胶: 迷你凝胶系统

1. 将垂直板块凝胶单元安装在凝胶浇铸架上。使用适当厚度的垫片来制作“夹层”。
2. 在 125 mL 侧臂真空烧瓶中, 混合分离凝胶溶液(见表 11.3), 省略 APS 和 N, N, N', N'-四甲基乙二胺(TEMED)。
3. 盖上烧瓶塞, 在旋转的同时抽空其中水分几分钟, 排出溶液中气。
4. 加入 TEMED 和 APS, 轻轻旋转烧瓶进行混合, 注意不要产生气泡。
5. 用移液管将垫片之间的溶液移入每个夹层, 移至距顶部约 4 cm 处。
6. 在顶层轻轻加入约 0.6 mL 水饱和的正丁醇或异丙醇(或水), 使整个分离凝胶表面都被正丁醇覆盖。凝胶聚合后, 可以看到非常明显的液体-凝胶界面。凝胶应在大约 1 小时后完全聚合。
7. 在 50 mL 锥形管中混合试剂(见表 11.4), 制备堆积凝胶。
8. 在真空下脱气 10 至 15 分钟。
9. 加入 50 µL 10% APS 和 10 µL TEMED。轻轻搅拌均匀。

10.分离凝胶聚合后, 倾斜浇铸台, 倒掉正丁醇覆盖层。



微量正丁醇会影响堆积凝胶的聚合。确保在加入堆积凝胶前倾析所有正丁醇。可以通过用水冲洗分离凝胶表面来实现。

11.用移液管吸取垫片之间的堆积凝胶溶液。

12.小心地将电泳梳放入未聚合的凝胶中, 注意不要夹带任何气泡。让凝胶聚合约 1 小时。



凝胶可以用保险膜紧紧包裹, 放在 4°C 的密封袋中, 与电泳梳一起保存 1 周。不要将凝胶存放在脚轮中。

表 11.3. 分离凝胶溶液, 40 mL

终凝胶浓度	5%	7.5%	10%	12.5%	15%
丙烯酰胺单体原液	6.7 mL	10 mL	13.3 mL	16.7 mL	20 mL
4× 分离凝胶溶液	10mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL
10% SDS	0.4 mL	0.4 mL	0.4 mL	0.4 mL	0.4 mL
水	22.7 mL	19.4 mL	16.1 mL	12.8 mL	9.5 mL
10% APS ¹	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL
TEMED ¹	13.3 µL	13.3 µL	13.3 µL	13.3 µL	13.3 µL

1.脱气后添加(上述步骤 3)。

表 11.4. 堆积凝胶溶液, 10 mL

终凝胶浓度	4%
丙烯酰胺单体原液	1.33 mL
4× 分离凝胶溶液	2.5 mL
10% SDS	0.1mL
水	6 mL
10% APS ¹	50 µL
TEMED ¹	5 µL

1.脱气后添加(上述步骤 8)。

11.3.2 用于 SDS-PAGE 的电泳运行缓冲液

大多数蛋白质印迹应用都是在通过 SDS-PAGE 分离蛋白质后进行的。因此, 本文介绍了基于 Tris-甘氨酸的常用 Laemmli 缓冲液配方。由于不含 SDS, 该缓冲液也可用于天然 PAGE 应用。

所需材料

- 5× 含 SDS 的电泳运行缓冲液
- 0.125 M Tris
- 0.96 M 甘氨酸
- 0.5% SDS

将 15.1 g Tris 碱、72 g 甘氨酸和 5 g 电泳级 SDS 溶于水中, 加水至总体积 1000 mL。不要调整溶液的 pH 值(稀释后的 pH 值应为 8.3)。在室温下保存。将 1 份缓冲液加入 4 份水中制成工作溶液(25 mM Tris、192 mM 甘氨酸、0.1% SDS, pH 8.3)。

 根据上述配方, 配制不含 SDS 的 5× 或 10× Tris-甘氨酸缓冲液。然后将其用作转印缓冲液的原液。

11.4 蛋白质印迹电转印

在此, 我们会介绍将通过 PAGE 分离的蛋白质电转印到固态膜(通常由硝酸纤维素或聚偏氟乙烯(PVDF)制成)上的方法。电转印是迄今为止蛋白质印迹法中最常用的技术。目前常用的电转印有全湿转印和半干转印两种。

11.4.1 全湿转印

建议采用以下方法进行全湿转印(图 11.1)。由于系统的具体要求, 应始终遵循生产商的建议。

所需材料

- 聚丙烯酰胺凝胶, 电泳后
- PVDF 或硝酸纤维素膜
- 四张 Whatman™ 3 mm 滤纸或类似材料, 裁成与凝胶相同的尺寸
- 两个泡沫垫
- 转印槽系统、电源
- 100% 甲醇(可用乙醇代替)
- 水
- Tris-甘氨酸转印缓冲液: 25 mM Tris 碱, 192 mM 甘氨酸, ≤ 20%(V/V)甲醇, pH 8.3(见第 4 章)

 制备10×Tris-甘氨酸缓冲液作为原液(也可用作运行缓冲液, 在制备工作稀释液后加入 SDS)。制备含有 20% 甲醇的 1× Tris-甘氨酸作为转印缓冲液。使用前预冷。

 转印缓冲液使用前要预冷。

印迹实验方法: 全湿转印

1. 准备足够的转印缓冲液来填充转印槽, 另外再准备 200 mL 来平衡凝胶、膜和滤纸。
2. 电泳后, 用干净锋利的刀片或手术刀切下凝胶的一角, 以便确定凝胶的方向。
3. 在转印缓冲液中平衡凝胶 10 至 15 分钟。请注意, 凝胶平衡不完全可能导致条带出现拖尾。
4. 根据生产商的建议对膜进行切割、预湿和平衡。

 将 PVDF 膜在甲醇中预湿 15 秒, 然后用水冲洗。在转印缓冲液中平衡至少 10 分钟。

 用水预湿硝酸纤维素膜, 然后在转印缓冲液中平衡至少 5 分钟。

5. 将滤纸和泡沫垫浸泡在转印缓冲液中。
6. 将电转印盒放入装有 3 cm 深冷冻转印缓冲液的托盘中, 阳极 (+) 面朝下。

7. 从阳极(+)面开始, 先放入一块泡沫海绵, 然后放入两张滤纸、准备好的膜、凝胶、另外两张湿滤纸, 最后放入第二块泡沫海绵。

8. 将搅拌磁铁放入转印槽。

 确保去除滤纸、凝胶和膜之间的气泡。

9. 关上转印盒, 将阳极(+)面与其他转印盒同方向放入装有冷转印缓冲液的电转印槽中。

10. 将电转印槽盖缆线的正极连接到电源的正极插座上(见图 11.1 和第 4 章)。

11. 根据生产商的建议进行转印。

12. 转印后, 将膜从电转移盒中取出, 从膜上剪下一角以便定向, 然后用 PBS 或 TBS 简要冲洗。

 膜可以风干, 并用保鲜膜包在 3 mm 滤纸之间, 在 2°C 至 8°C 的温度下可保存长达 3 个月。

 干燥后, PVDF 膜需要在甲醇和水中进行活化, 然后再进行封闭和探测。

 干燥后, 硝酸纤维素膜需要在和水中进行预浸湿, 然后再进行封闭和探测。

 印迹膜可在 4°C 条件下在 PBS 或 TBS 中保存 2 周。不过, 为了获得最佳结果, 应立即继续蛋白质印迹法的流程。

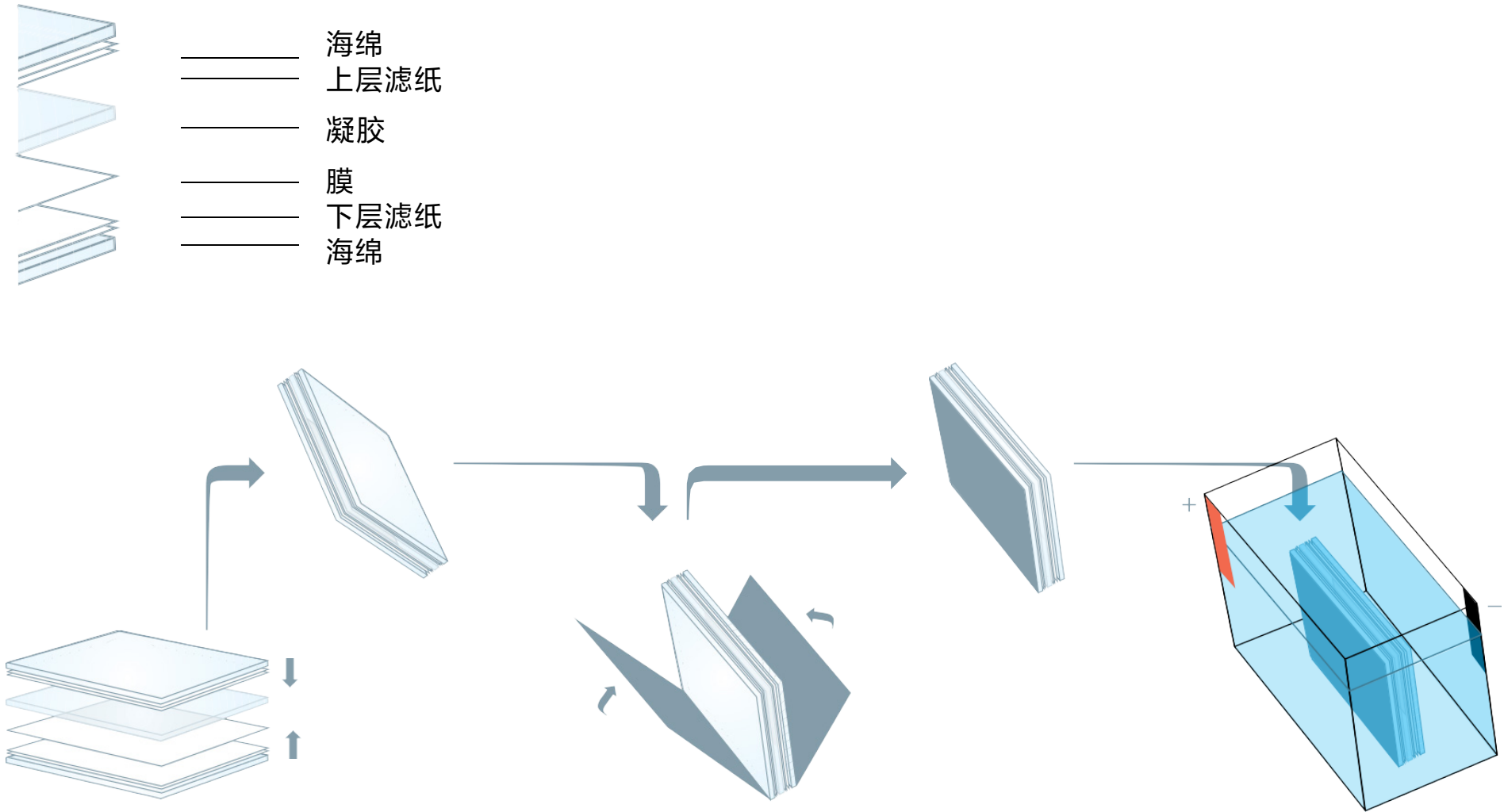


图 11.1.全湿转印系统。转印夹层的组装最好在装有转印缓冲液的槽中进行, 深度至少 3 cm。夹层安装在转印盒朝向阳极(+)的一侧, 首先是一块海绵, 然后是两张润湿的滤纸、所选的膜、凝胶、另外两张润湿的滤纸, 最后是第二块海绵。注意避免各层之间出现褶皱、折叠或气泡。然后将该夹层牢牢固定在转印盒中, 并浸没在装有转印缓冲液的电转印槽中。夹层的方向必须确保膜位于凝胶的阳极(+)侧。

11.4.2 半干转印

建议采用以下方法进行半干转印(图 11.2)。由于系统的具体要求, 应始终遵循生产商的建议。

根据所使用的系统和组合凝胶的总面积, 可以通过并排放置几个相同厚度的小块凝胶, 同时转印多块凝胶。以下方法主要针对单个凝胶的半干转印。

 不建议堆叠凝胶, 但如果不存在重现性问题, 也可以这样做。

全湿转印和半干转印的设置分别如图 11.1 和图 11.2 所示。

所需材料

- 聚丙烯酰胺凝胶, 电泳后
- PVDF 或硝酸纤维素膜
- 至少六张 3 mm 滤纸或类似材料, 裁成与凝胶相同的尺寸
- 半干转印仪、电源
- 100% 甲醇(可用乙醇代替)
- 水
- Tris-甘氨酸转印缓冲液: 25 mM Tris 碱, 192 mM 甘氨酸, ≤ 20%(V/V)甲醇, pH 8.3(见第四章)

 制备 10× Tris-甘氨酸缓冲液作为原液(见 11.3.2)。准备 1× Tris-甘氨酸缓冲液, 用不超过 20% 的甲醇作为转印缓冲液。使用前预冷。

印迹实验方法: 半干转印

1. 用水冲洗阳极(+)和阴极(-), 为电转印做准备。
2. 电泳后, 用干净锋利的刀片或手术刀切下凝胶的一角, 以便确定凝胶的方向。
3. 从凝胶中取出堆积凝胶和染色前沿。
4. 在转印缓冲液中平衡凝胶 10 至 15 分钟。请注意, 凝胶平衡不完全可能导致条带出现拖尾。
5. 剪下至少六张与凝胶尺寸相同或略小的滤纸。
 根据印迹纸的厚度或层数来确定所需的缓冲液量。
6. 用转印缓冲液浸泡至少三张印迹纸。将每张印迹纸逐一放在下电极(阳极 [+])的中心, 用干净的移液管或滚筒从中心向边缘滚动, 清除所有残留的空气。

7. 剪下一张与凝胶尺寸相同或略小的滤纸。在转印缓冲液中预浸湿并平衡膜至少10分钟。

 PVDF膜在转印缓冲液中平衡前必须用甲醇预浸湿并用水冲洗。硝酸纤维素膜应在平衡前用水预浸湿。处理膜时一定要戴上干净的手套, 以免留下指纹。

8. 将预湿膜放在印迹纸上。

 印迹纸和膜的尺寸必须与凝胶相同或小 1 至 2 mm。尺寸越大, 电流越容易绕过凝胶, 导致转印效果不佳。要避免这种情况, 可以使用一个塑料垫圈, 垫圈上开一个与凝胶大小相同的长方形孔, 垫在上下两叠滤纸之间。

9. 将凝胶放在膜上。蛋白质一接触膜就会与之结合, 因此第一次就正确放置凝胶非常重要。

10.在凝胶上覆盖三层浸湿的印迹纸。小心叠放每一层, 边缘要对齐。每添加一层, 用干净的移液管从中心向边缘滚动, 去除所有气泡。

 在印迹纸上滴几滴缓冲液有助于去除气泡。

11.将颜色编码导线连接至电源。连接前, 确保电源已关闭。

12.根据生产商的建议设置电流和计时器。开始转印。半干转印通常在恒定电流下进行。

 大多数设备的推荐极限电流为 0.8 mA/cm²。转印时间通常约为 1 小时。

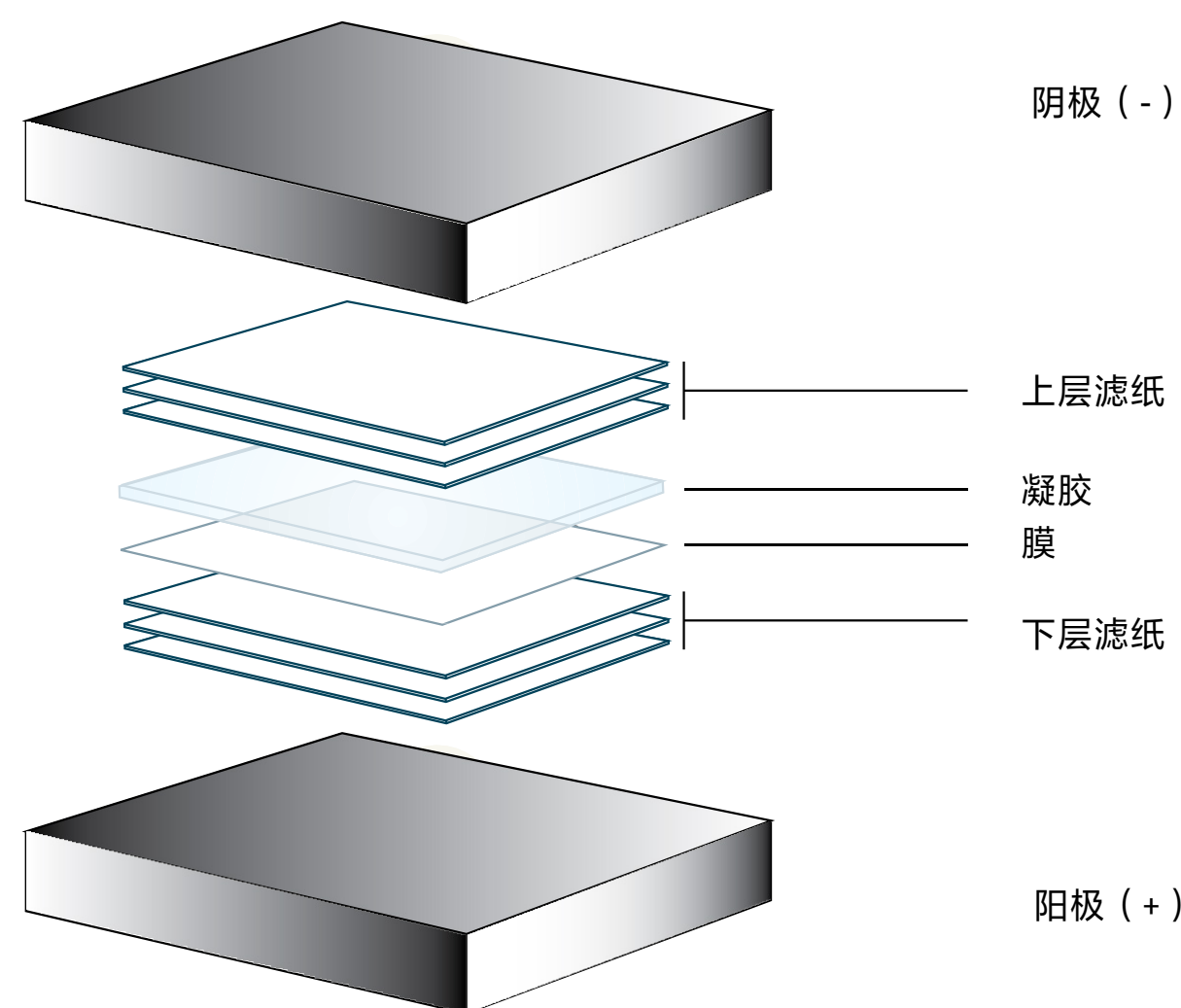


图 11.2. 半干转印系统。夹层放置在下电极(阳极 +)上。第一层至少由三张浸湿的滤纸组成, 然后是滤膜、凝胶, 最后是另外三张浸湿的滤纸。每添加一层, 都要注意避免出现褶皱、折叠或气泡。夹层被放置并压缩在两块导电平板之间, 这两块平板同时也是阴极(-)和阳极(+)。夹层的方向必须确保膜位于凝胶的阳极(+)侧。

11.5 蛋白质印迹缓冲液

转印后, 可考虑用两种缓冲液来稀释封闭剂、稀释抗体以及用于不同的清洗步骤。通常使用 PBS 缓冲液, 但也可使用 TBS 缓冲液, 如果印迹蛋白是磷酸化的, 则使用 TBS 尤为合适。下文介绍了如何制备这些缓冲液。PBS 和 TBS 在蛋白质印迹法中多种用途的性能可通过添加 Tween-20 得到改善。

 在制备蛋白质印迹法所用的缓冲液时, 应始终使用高纯度水。

TBS, pH 7.6

在水中加入 12.1 克 Tris 碱和 40 克 NaCl。用 HCl 将 pH 值调至 7.6, 然后加水将最终体积调至 5 L。在室温下保存。

TBS-Tween

将所需体积的 Tween-20 在 TBS 中稀释成 0.1% (V/V) 溶液。在 2°C 至 8°C 的温度下储存。

PBS, pH 7.5

在水中加入 11.5 g 无水磷酸氢二钠、2.96 g 磷酸氢二钠和 5.84 g NaCl。将 pH 值调至 7.5, 然后加水将最终体积调至 1 L。在室温下保存。

PBS-Tween

将所需体积的 Tween-20 在 PBS 中稀释成 0.1% (V/V) 溶液。在 2°C 至 8°C 的温度下储存。

 在 2°C 至 8°C 温度下储存。配制 20% Tween-20 溶液。这样可以更容易地将 Tween-20 快速溶解在 PBS 中。

11.6 封闭

转印后, 可通过免疫检测对膜进行探测。在抗体检测之前, 使用合适的封闭剂封闭膜上的非蛋白结合位点 (见第 5 章)。下文将介绍如何制备 Amersham™ ECL™ Prime 封闭剂和 Amersham™ ECL™ 封闭剂。建议在荧光检测应用中使用 Amersham™ ECL™ Prime 封闭剂。

用适当的封闭剂封闭膜。

-  如果目标物本身已磷酸化, 则不要使用 PBS 作为稀释缓冲液, 而应使用 TBS。
-  如果使用生物素化或与伴刀豆球蛋白偶联的抗体, 请勿使用脱脂牛奶作为封闭剂。
-  如果目标出现磷酸化, 请勿使用粗蛋白制剂作为封闭剂。
-  **注意:** 并非所有封闭剂都与荧光蛋白质印迹法兼容。

1. 摇动粉末块, 确保各成分分布均匀。
2. 称取适量的封闭剂, 用于 2% (W/V) 溶液(Amersham™ ECL™ Prime 封闭剂)或 5% (W/V) 溶液(Amersham™ ECL™ 封闭剂)。
3. 加入适量的 PBS-Tween 或 TBS-Tween, 用力摇晃并搅拌 15 分钟, 直至所有成分完全溶解。
 制备好的封闭溶液可在 2°C 至 8°C 下储存, 但应在 24 小时内使用。
4. 将膜放入封闭溶液中, 在室温下搅拌孵育 1 小时, 如果背景持续过高, 则在 37°C 下孵育。为了方便, 也可将膜在 2°C 至 8°C 温度下放封闭溶液中过夜。
5. 用清洗缓冲液短暂冲洗膜。

11.7 抗体探测与检测

通常, 首先使用靶定目标蛋白质的未标记一抗对膜进行探测, 然后使用靶定一抗的物种特异性标记二抗对膜进行探测。这种技术最大限度地提高了检测的潜在灵敏度, 下文便是对此技术的介绍。

-  用于储存抗体溶液的所有容器必须严格清洁, 用于稀释抗体的所有溶液必须使用优质水配制。
-  为了获得高质量的结果, 请优化抗体稀释度。
-  应尽可能选择在与目标物种不同的物种中培育的一抗。
-  确保一抗已通过蛋白质印迹法应用验证。

11.7.1 使用 Amersham™ ECL™、Amersham™ ECL™ Prime 和 Amersham™ ECL Select™ 进行化学发光检测

1. 用 PBS-Tween/TBS-Tween 稀释一抗。
2. 将膜(蛋白面朝上)放入一抗溶液中, 室温下搅拌孵育 1 小时或 4°C 条件下放置过夜。请务必参考生产商的建议。

3. 用 PBS-Tween 或 TBS-Tween 冲洗膜三至六次, 每次 5 分钟, 或根据生产商的建议进行冲洗。
4. 将膜放入用 PBS-Tween 或 TBS-Tween 稀释的二抗中, 室温下搅拌孵育 1 小时或在 4°C 下放置过夜。
5. 将膜放入清洗溶液中, 清洗四至六次, 每次 5 分钟。
6. 继续按照所选检测试剂和成像系统的建议进行检测。

11.7.1.1 电荷耦合设备(CCD)成像仪

1. 打开小瓶前, 让检测溶液平衡至室温。
2. 混合等体积的检测溶液 A 和 B, 使溶液总体积足以覆盖膜。需要 0.1 mL/cm² 体积的膜。
3. 排出清洗过的膜上的清洗液, 然后将膜的蛋白面朝上放在一张保鲜膜或其他合适的干净表面上。用移液管将混合好的检测试剂滴到膜上。
4. 室温下孵育 1 分钟(Amersham™ ECL™)或 5 分钟(Amersham™ ECL™ Prime 和 Amersham™ ECL Select™)。
5. 用镊子轻轻夹住膜, 按压边缘, 用纸巾吸走多余的检测试剂。
6. 将膜蛋白质面朝上放在 CCD 成像仪样品托盘上。
7. 将样品托盘放入 CCD 成像仪, 并按照说明操作。选择曝光时间并拍摄图像。
 根据预期信号强度选择曝光时间。建议从 1 分钟开始, 然后调整时间以确定最佳曝光时间。另外, 还可以使用增量功能, 即在给定时间内, 让成像仪在预定的时间点捕捉图像。

11.7.1.2 X 射线胶片检测

- 1. 打开小瓶前, 让检测溶液平衡至室温。
- 2. 混合等体积的检测溶液 A 和 B, 使溶液总体积足以覆盖膜。需要 0.1 mL/cm² 体积的膜。
- 3. 排出清洗过的膜上的清洗液, 然后将膜的蛋白面朝上放在一张保鲜膜或其他合适的干净表面上。用移液管将混合好的检测试剂滴到膜上。
- 4. 室温下孵育 1 分钟(Amersham™ ECL™)或 5 分钟(Amersham™ ECL™ Prime 和 Amersham™ ECL Select™)。
- 5. 用镊子轻轻夹住膜, 按压边缘, 用纸巾吸走多余的检测试剂。将印迹蛋白面朝下放在一张新的保鲜膜上, 包好印迹, 轻轻抹平气泡。
- 6. 将包装好的印迹蛋白面朝上放入 X 射线胶片盒中。
- 7. 将一张 X 射线胶片(例如 Amersham™ Hyperfilm™ ECL™)放在膜上。盖上胶片盒并曝光 15 秒。

 根据预期信号强度选择曝光时间。可以从 1 分钟开始曝光。冲洗胶片, 必要时进行额外曝光。调整到最佳曝光时间。

11.7.2 用 Amersham™ ECL Plex™ 进行荧光检测

- 1. 用清洗液或封闭液稀释小鼠或兔源一抗至最佳浓度。
- 2. 用稀释的一抗在室温下孵育封闭膜(蛋白面朝上)1.5 小时, 或在 4°C 条件下放置过夜。
- 3. 用清洗液冲洗膜两次, 然后用清洗液在室温下摇晃清洗膜两次, 每次 5 分钟。
- 4. 将与 ECL Plex™ CyDye™ 偶联的二抗(制备浓度为 1 µg/mL)稀释至最佳浓度。
- 5. 将清洗过的膜放入二抗溶液中, 室温下摇晃 1 小时。确保膜避光。

- 6. 用清洗液冲洗膜三次, 然后用清洗液冲洗四次, 每次 5 分钟, 室温下摇晃。保护膜免受光线照射。

 使用荧光基团标记的抗体时, 应在黑暗中进行孵育。

- 7. 用 PBS 或 TBS(不含 Tween-20)冲洗膜三次。
- 8. 使用激光扫描仪扫描膜, 检测二抗信号。为获得最佳效果, 扫描前应将膜放在 Hybond™ 印迹纸上晾干, 然后在 37°C 至 40°C 下培养 1 小时, 或在室温下孵育。保护膜免受光线照射。

11.7.3 快速启动方法

- 1. 执行标准凝胶电泳和蛋白质印迹法的流程(推荐使用硝酸纤维素膜)

 在处理膜时, 应始终将蛋白质面朝上。

- 2. 在 PBS-Tween™ 或 TBS-Tween 中的 2% ECL™ Prime 封闭剂封闭膜。
- 3. 根据建议稀释一抗。
- 4. 清洗膜, 与一抗一起孵育。
- 5. 重组 Amersham™ CyDye™ NIR 二抗, 使其与一抗物种发生交叉反应。
- 6. 将 Amersham™ CyDye™ NIR 二抗稀释至应用所需的最佳浓度。我们建议稀释比例为 1:25000, 但使用者需根据实际应用对稀释浓度负责。
- 7. 清洗膜并与 Amersham™ CyDye™ NIR 二抗一起孵育。
- 8. 清洗膜, 最后一次清洗应在无 Tween 的情况下进行。
- 9. 用适当的系统扫描膜, 近红外滤光片的发射波长设置为700nm或800nm, 可以使用 Amersham™ Typhoon™ 5 / NIR 或 NIR Plus 系统。

11.7.3.1 多重检测方法

1. 用 PBS-Tween 或者 TBS-Tween 稀释一抗。
 -  可将一种以上的抗体混合在单一溶液中进行多重检测。
 -  为防止交叉效应, 必须在不同物种中培养一抗。如果使用化学发光检测, 相关蛋白质必须在电泳后充分分离。
 -  如果要重复使用一抗, 可以在复用时将一抗分开孵育。
2. 将膜(蛋白面朝上)放入一抗溶液中, 室温下搅拌孵育 1 小时或在 4°C 条件下放置过夜。
3. 用清洗液冲洗膜两次, 然后用清洗液在室温下摇晃清洗膜两次, 每次 5 分钟。
4. 将二抗混合成单一溶液。
5. 将膜放入混合的二抗溶液中, 室温下孵育 30 分钟至 1 小时。保护膜免受光线照射。
 -  使用荧光基团标记的抗体时, 应在黑暗中进行孵育。
6. 用清洗液冲洗膜三次, 然后用清洗液冲洗三次, 每次 1 分钟, 并在室温下摇晃。保护膜免受光线照射。
7. 用 PBS 或 TBS(不含 Tween-20)冲洗膜三次。
8. 使用具备荧光检测能力的 CCD 成像仪或激光扫描仪扫描膜, 检测二抗信号。为获得最佳效果, 扫描前应将膜放在 Amersham™ Hybond™ 印迹纸上晾干, 然后在 37°C 至 40°C 下培养 1 小时, 或在室温下孵育。保护膜免受光线照射。

11.7.3.2 三层探测方法

1. 将膜放入一抗溶液中, 室温下搅拌孵育 1 小时或在 4°C 条件下放置过夜。
2. 将膜放入清洗溶液中, 清洗三次, 每次 5 分钟。
3. 将膜放入生物素化的二抗溶液中, 室温下搅拌孵育 1 小时或在 37°C 条件下孵育。
4. 将膜放入清洗溶液中, 清洗三次, 每次 5 分钟。
5. 在 PBS-Tween 或 TBS-Tween 中稀释链霉亲和素-HRP 偶联物(或链霉亲和素 CyDye™ 偶联物, 如使用 Amersham™ ECL Plex™ 检测)。
 -  我们强烈建议您优化浓度(优化方案见附录)。
6. 在室温下用轨道摇床将膜在溶液中孵育 45 至 60 分钟。
7. 用清洗液简单冲洗膜两次。
8. 将膜悬浮在足够覆盖膜的清洗液中, 在室温下搅拌 5 分钟。至少重复四到六次。
9. 继续按照所选检测试剂和成像系统的建议进行检测。

11.7.3.3 CyDye™ 与抗体偶联

Amersham™ ECL Plex™ 经过优化, 可获得最佳信号性能, 并将二抗之间的交叉反应降至最低。使用 Cytiva CyDye™ 标记试剂盒标记一抗可以实现三重检测, 但这些抗体的检测限(LOD)较低, 可能会产生交叉反应问题。因此, 在使用前应对此类试剂的性能进行测试。

1. 将蛋白溶液(1 mL)加入偶联缓冲液瓶中, 轻轻涡旋或手动倒置封盖好的试管 10 次, 充分混匀。
2. 将全部体积的蛋白质和偶联缓冲液转移到活性染料瓶中, 盖上盖子并充分混匀。

 应注意防止蛋白质溶液起泡。

3. 室温下, 在黑暗环境中孵育 30 分钟, 大约每隔 10 分钟搅拌一次。
4. 在进行标记反应物时, 倾析掉层析柱顶部的缓冲液。将层析柱放到环架上。
5. 加入 13 mL 新鲜的洗脱缓冲液。
6. 取下层析柱出液口, 让缓冲液流出, 让所有缓冲液通过层析柱流入收集管或小烧杯中。
 当弯液面到达柱填料顶部的圆盘时, 流体将自动停止。无需担心层析柱会变干。
7. 小心地将抗体标记混合物转移到层析柱顶部, 让溶液进入填料。
8. 加入 2 mL 洗脱缓冲液。当缓冲液通过层析柱时, 一条移动较快的标记蛋白质色带就会从未结合的染料中分离出来。这些条带可能很难从颜色上区分, 但使用长波紫外线(UV)灯可以通过荧光将它们区分开来。
9. 当洗脱缓冲液完全流入层析柱填料时, 移动较快的色带前缘应接近填料底部。
10. 在层析柱顶部再加入 2.5 mL 洗脱缓冲液, 在层析柱洗脱过程中将移动较快的色带收集到一个干净的试管中。标记的蛋白质应完全被 2.5 mL 缓冲液洗脱, 并收集在一个试管中。

11.8 剥离和重新检测

以下方案说明了如何从膜上去除一抗和二抗。膜可多次剥离和重新检测。有关剥离和重新检测的更多信息, 请参见第 5 章。如果计划进行剥离和重新检测, PVDF 膜比硝酸纤维素膜更耐用, 建议用于此应用。

11.8.1 通过高 pH 值和高温进行剥离

1. 将膜浸没剥离缓冲液(100 mM β -巯基乙醇、2% SDS、62.5 mM Tris-HCl[pH6.7])中, 在 70°C 下搅拌孵育 30 分钟。

 虽然较低的温度(50°C 至 70°C)也可能取得理想的效果, 但应根据所用抗体的使用经验来决定(见 5.3)。

2. 室温下使用大量清洗液在 PBS-Tween 或 TBS-Tween 中清洗膜两次, 每次 10 分钟。
3. 在室温下用适当的封闭液封闭膜 1 小时。
4. 重复探测和检测过程。

11.8.2 通过低 pH 值进行剥离

1. 将膜浸没剥离缓冲液(100 mM β -巯基乙醇、1% SDS、25 mM Tris-HCl[pH 2.0])中, 搅拌孵育 30 分钟。
2. 室温下使用大量清洗液在 PBS-Tween 或 TBS-Tween 中清洗膜两次, 每次 10 分钟。
3. 在室温下用适当的封闭液封闭膜 1 小时。
4. 重复探测和检测过程。

11.8.3 通过高 pH 值进行剥离

- 1. 将膜浸没在 0.2 M NaOH 中, 在室温下搅拌孵育 5 分钟。
- 2. 取出并加入新的 0.2 M NaOH, 再孵育 5 分钟。
- 3. 在水中清洗 5 分钟。
- 4. 重复免疫检测过程(无封闭)。

👉 如果仍有信号残留, 可将 NaOH 浓度提高到 2 M, 孵育时间延长至 30 分钟。

👉 使用 NaOH 溶液进行剥离后, 通常不需要再次封闭。不过, 根据 NaOH 浓度和浸泡时间的不同, 可能有必要重新封闭。

11.8.3 通过高 pH 值进行剥离

- 1. 将膜浸泡在添加了 0.5 M NaCl 和 0.2% SDS 的 PBS 或 TBS 溶液中 30 分钟至 2 小时。
 - 2. 用水冲洗印迹。
 - 3. 重复免疫检测过程(无封闭)。
- 👉 使用盐溶液进行剥离后, 通常不需要再次封闭。不过, 根据浸泡时间的不同, 可能有必要重新封闭。

11.9 确定一抗和二抗最佳浓度的优化方案

有必要优化一抗和二抗的浓度, 以获得优异的灵敏度和特异性。斑点印迹法是常用方法, 但更可靠的方法是进行蛋白质印迹法, 将膜分成条状(图 11.3)。抗体优化的两种方法如下。这些方法还可用于优化其他参数, 如封闭剂、一抗种类和一抗质量。

- 1. 进行电泳和印迹处理。在每个上样系列之间使用彩虹分子量标记物(图 11.3 中的 M)。
- 2. 将膜切成含有不同数量样品的条状(图 11.3 中的 c1 至 c3)。如图 11.3 所示, 为不同的条带剪切不同数量的凹槽, 以此来标记不同的条带。
- 3. 用不同稀释度的一抗和二抗孵育这些条带。
- 👉 使用 15 或 50 mL 试管进行孵育可节省一抗。确保在孵育过程中整个条带都被抗体溶液覆盖。
- 4. 如前所述进行检测。

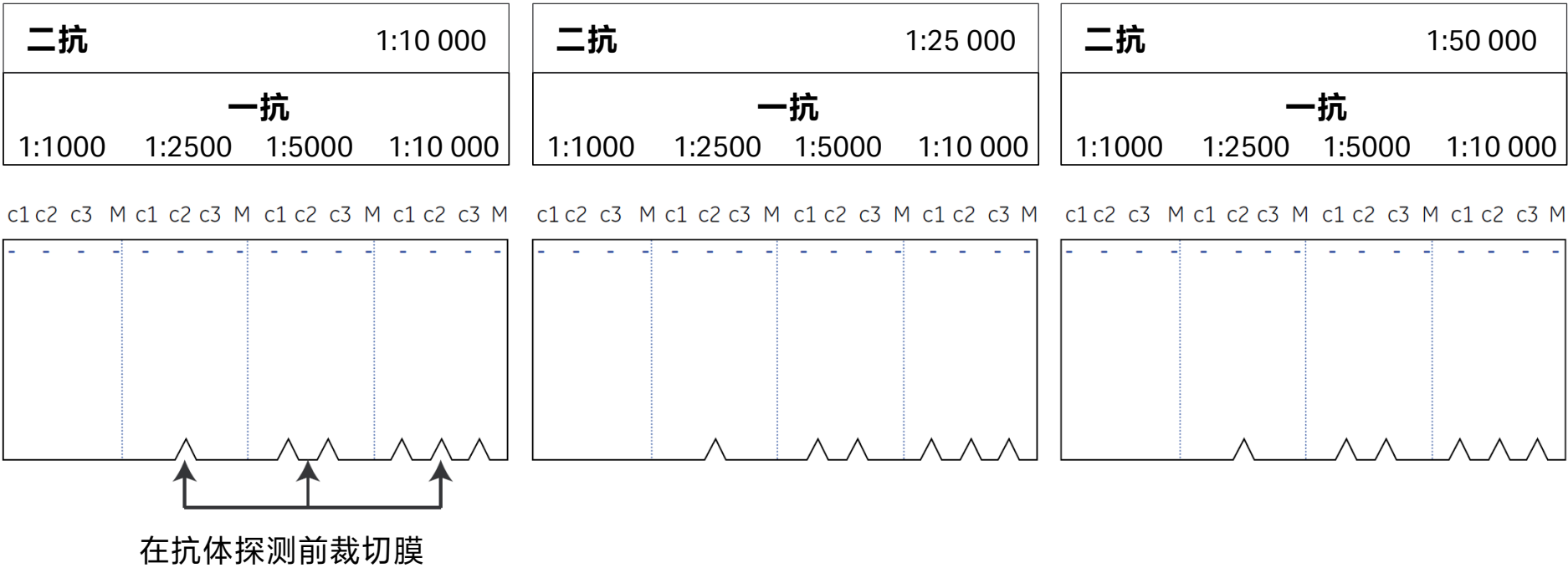


图 11.3. 膜条用于确定一抗和二抗的最佳稀释倍数。c1、c2 和 c3 = 样品的三种备选数量。M = 彩虹分子量标记物。请注意, 这个例子仅供参考。请选择检测系统推荐的抗体稀释度。高灵敏度的化学发光检测试剂通常需要较低浓度的抗体, 尤其是在使用 X 射线胶片的情况下, 而荧光检测则需要较高浓度的抗体。

11.9.1 通过斑点印迹法优化一抗浓度

1. 在硝酸纤维素膜上点样经过一系列两倍稀释的蛋白质样品(五份稀释样品), 然后风干。为每份待测的稀释一抗准备一份印迹。
2. 在室温下搅拌, 在封闭液中孵育 1 小时。
3. 用清洗液简单冲洗膜两次。在推荐的抗体稀释范围内配制一定数量的溶液。在室温下搅拌, 每份印迹在封闭液中孵育 1 小时。
4. 用清洗液简单冲洗膜两次。将膜悬浮在清洗液中对其进行清洗, 在室温下搅拌 5 分钟。更换清洗液三至四次。
5. 稀释二抗(仅使用一种浓度), 室温下搅拌孵育膜 1 小时。
6. 用清洗液冲洗印迹两次, 然后清洗三至六次, 每次 5 分钟; 再用新的清洗液清洗三至六次, 每次 5 分钟。
7. 按照所选检测试剂的操作方法进行检测。应选择信号最强、背景最小的抗体稀释度。

11.9.1 通过斑点印迹法优化一抗浓度

1. 在硝酸纤维素膜上点样经过一系列两倍稀释的蛋白质样品(五份稀释样品), 然后风干。为每份待测的稀释一抗准备一份印迹。
2. 在室温下搅拌, 在封闭液中孵育 1 小时。
3. 在室温下搅拌, 在稀释一抗中孵育 1 小时。
4. 清洗膜三至六次, 每次 5 分钟, 或按照所选检测试剂的操作方法进行。
5. 在推荐的二抗抗体稀释范围内配制一定数量的溶液。在室温下搅拌, 每份印迹在封闭液中孵育 1 小时。
6. 用清洗液简单冲洗膜两次。

7. 清洗膜三至六次, 每次 5 分钟, 或按照所选检测试剂的操作方法进行。
8. 按照所选检测试剂的操作方法进行检测。应选择信号最强、背景最小的抗体稀释度。

11.10 参考文献

1. *Affinity Chromatography Handbook, Vol. 1: Antibodies*, Cytiva, 18103746

附录优化

在蛋白质印迹法实验中运行珍贵的样品和使用昂贵的抗体之前,投入一些时间选择最佳的实验设计以获得理想的实验结果是非常值得的。无论是以灵敏度、定量精度为主要目标,还是以实验室日常使用所需的稳健性和一致性为主要目标,都需要对蛋白质印迹法进行优化。只要优化得当,就可以轻松获得值得信赖的结果,既提高了质量,又节省了时间。所以,花时间进行优化能够产生良好的效益。

以下章节提供了一些指导原则,帮助您从一开始就正确设计实验。有关优化协议的详细信息,请参见 11.9。

A.1 膜的选择

膜的选择取决于实验是否涉及化学发光或荧光检测。同时还取决于您是否计划剥离和重新探测膜，以及是否要对印迹进行后染色。建议在涉及剥离和重新检测的实验中使用聚偏氟乙烯(PVDF)膜，因为这种膜比硝酸纤维素膜更坚固耐用。硝酸纤维素膜与总蛋白后染色兼容。PVDF 膜也可以后染色，但脱色效果可能更差一些。因此，在检测微弱的总蛋白信号时，如果需要低背景，建议使用硝酸纤维素膜。

自体荧光特性低的膜对于荧光检测至关重要，尤其是在检测微弱信号时。建议使用Amersham™ Hybond™ LFP 0.2 和 Amersham™ Protran™ Premium 膜进行这种检测，尤其适合与 Amersham™ ECL Plex™ 荧光蛋白质印迹系统结合使用。

对于大多数应用，0.45 μm 的膜孔径是适用的，但如果您处理的是小目标蛋白(Mr 5000至25000)，建议使用孔径较小(0.2μm)的膜，因为它们在凝胶转印过程中对较小的蛋白有更高的结合能力，并能减少样品损失。

表 A.1 列出了 Cytiva 为每种检测系统推荐的膜。

检测系统	硝酸纤维素	PVDF
Amersham™ ECL™	Amersham™ Protran™ Premium 0.2 或 0.45	Amersham™ Hybond™ 0.2 和 0.45 PVDF
Amersham™ ECL™ Prime	Amersham™ Protran™ Premium 0.2 或 0.45	Amersham™ Hybond™ 0.2 和 0.45 PVDF
Amersham™ ECL Select™	Amersham™ Protran™ Premium 0.2 或 0.45	Amersham™ Hybond™ 0.2 和 0.45 PVDF

👉 这些 Amersham™ Hybond™ 和 Amersham™ Protran™ Premium 膜对环境敏感，应在室温下清洁干燥的环境中存放，避免接触热源、光线和有毒气体。为防止污染，处理膜时应使用手套或钝镊子。正确的储存可实现稳定的蛋白质结合能力、溶剂吸光度和减少处理过程中出现的问题。

A.2 封闭剂的选择

选择封闭剂对于获得最佳结果非常重要，尤其是对于低丰度蛋白质而言。非特异性结合和背景水平以及信号强度都会受到封闭剂选择的影响。最佳封闭剂取决于与一抗和二抗以及所用检测系统的兼容性。请注意，并非所有的封闭剂都与荧光蛋白质印迹法兼容，如果封闭剂本身具有荧光特性，可能会出现背景问题。在使用 Amersham™ ECL Plex™ 的应用中，避免这些问题的方法之一是使用 Amersham™ ECL™ Prime 封闭剂。

应使用第 11 章所述的斑点印迹法检测封闭剂与检测试剂之间的兼容性。简而言之，将封闭液滴在空白膜上。然后将检测试剂添加到印迹上，孵育 5 分钟后成像。出现信号则表明封闭剂与检测试剂不兼容。一种模仿真实实验条件的更全面的方法是制备蛋白质印迹，并将其分成条状。这会比斑点印迹法花费更多时间，但在一次实验中可以监测更多参数。

如果使用牛奶蛋白，会出现背景偏高的问题，这可能是因为目标蛋白也存在于牛奶中。由于牛奶中含有复杂的蛋白质混合物(因奶牛的饲养地而异)，使用牛奶蛋白质进行封闭会导致难以预测的结果。

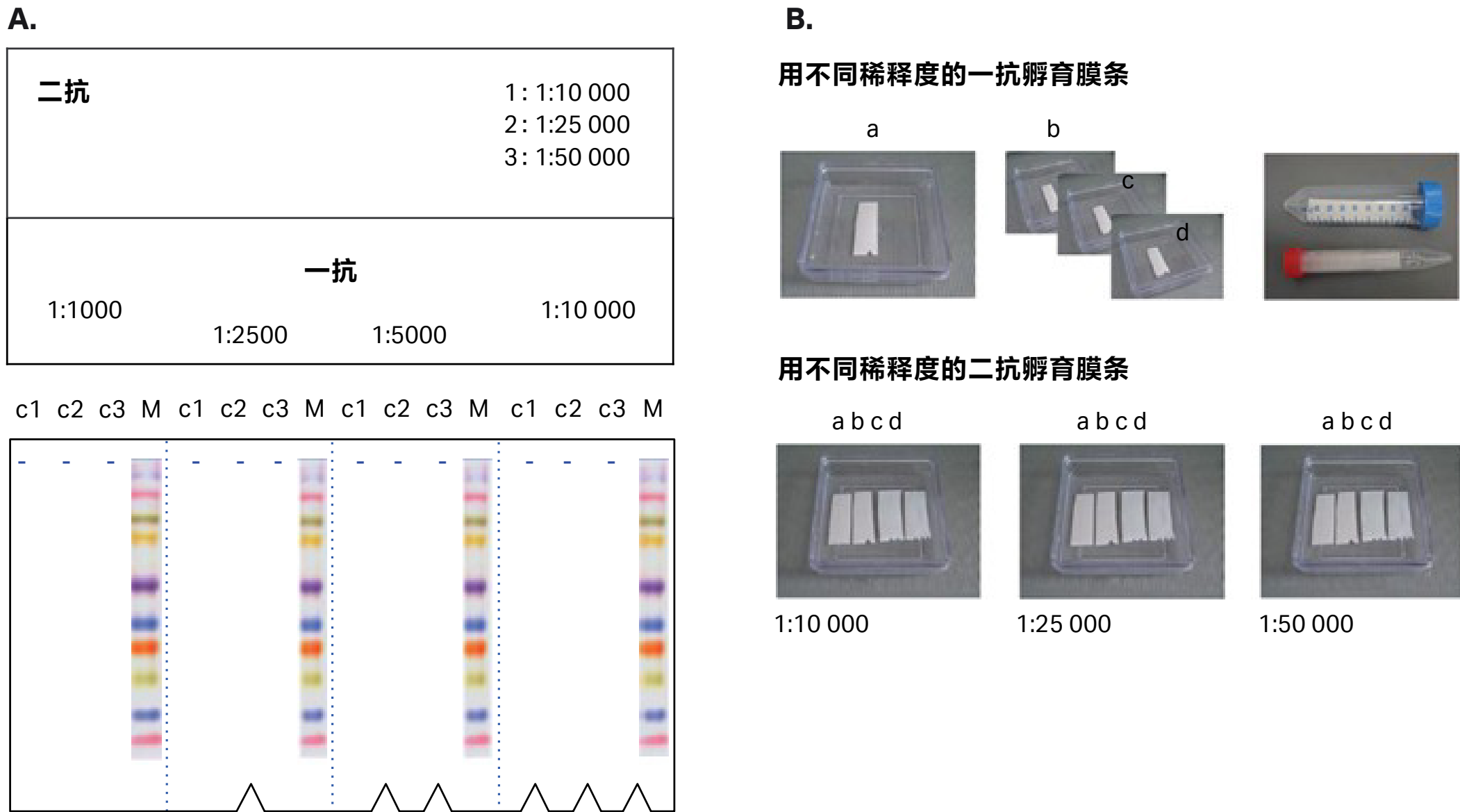
A.3 清洗缓冲液的选择

磷酸盐缓冲盐水(PBS)-Tween 是适合大多数应用的清洗缓冲液。但对于磷酸化的目标蛋白，我们建议使用 Tris-缓冲盐水(TBS)-Tween 作为清洗缓冲液，因为 PBS-Tween 中的磷酸盐会干扰抗体结合。在这种情况下，切记在所有基于清洗缓冲液的溶液以及封闭溶液中使用 TBS-Tween 或 TBS。

👉 制备缓冲液时，水质非常重要，因为微量的杂质会造成不同程度的干扰。例如，辣根过氧化物酶(HRP) 的酶活性会受到高纯度水中常见的热原的抑制。

A.4 使用膜条优化抗体浓度

最佳抗体浓度通常是通过测试一系列供应商推荐的抗体稀释度来确定的。例如, 如果建议的稀释比例为 1:100, 则应基于此数值进行一些列两倍稀释的滴定, 即 1:25、1:50、1:100、1:200 和 1:400。为进一步优化探测条件, 可延长或缩短同一滴定时间, 如室温下滴定 1、2 和 3 小时或在 4°C 条件下过夜。可通过斑点印迹法进行, 但更可靠的方法是进行蛋白质印迹法, 然后将膜分成条状(图 A.1)。这会比斑点印迹法花费更多时间, 但在一次实验中可以监测更多参数。使用这种方法可以获得特定信号强度、背景水平和非特异性检测水平的信息。此外, 还可以使用膜条选择一抗和二抗的最佳稀释度、最佳样品量、封闭剂、一抗种类以及最高质量的一抗。



图A.1.在优化过程中, 封闭、抗体孵育和清洗等步骤与正常的蛋白质印迹法程序相似。(A)在蛋白质印迹法中选择最佳一抗和二抗浓度的推荐方案。c1、c2、c3 = 三种浓度的样品。M = 彩虹分子量标记物或 Amersham™ ECL DualVue™ 蛋白印迹法标记物。(B) 评估抗体时, 应先将转印后的膜切成条状, 然后用不同的一抗稀释液(a = 1:1000、b = 1:2500、c = 1:5000、d = 1:10 000)进行孵育。此处的抗体稀释度仅供参考, 您应根据检测系统选择合适的抗体稀释度范围。使用 15 或 50 mL 试管可节省一抗。清洗后, 将与相同稀释度的二抗一起孵育的膜条可合并在一个托盘中孵育。在进行蛋白质印迹法应用时, 应选择能产生最佳信号且背景最小的抗体稀释度。

cytiva.com.cn

Cytiva 和 Drop 标志是 Life Sciences IP Holdings Corporation 或附属公司的商标。

ÄKTA、Amersham、Capto、Cy、CyDye、ECL、ECL DualVue、ECL Plex、ECL Select、Ettan、ExcelGel、HisTrap、HiPrep、HisTrap、HiTrap、Hybond、Hyperfilm、illustra、ImageQuant、Immobiline、IPGphor、MidiTrap、MiniTrap、Multiphor、MultiTemp、PhastGel、Phast System、Protran、Rainbow、Sepharose、SpinTrap、triplePrep、Typhoon 和 Whatman 是 Global Life Sciences Solutions USA LLC 或其关联公司的商标。

Microsoft Excel 是 Microsoft Corporation 的注册商标。Pefabloc 是 Pentapharm Ltd. 的商标。Polytron 是 Kinematica AG 公司的商标。Triton 是 Union Carbide Chemicals 和 Plastic Company Inc.的商标。Vivaspin 是 Sartorius Stedim Biotech GmbH 公司的商标。Waring 是 Dynamic Corp. of America 的商标。SYPRO 是 Molecular Probes Inc.的商标。

CyDye: 本产品或其部分内容是根据美国专利号 5,268,486 及美国和其他国家的同等专利, 在卡内基梅隆大学的独家许可下生产的。

购买 CyDye 产品包括将 CyDye 产品用于内部研发的有限许可证, 但不可用于任何商业用途。将 CyDye 商标用于商业目的的许可需与 GE Healthcare 签署单独的许可协议。商业用途包括:

出售、出租、许可或其他转让材料或从中派生或产生的任何材料。

出售、租赁、许可或授予其他权利使用本材料或从中派生或产生的任何材料。

使用该材料为第三方提供服务, 收取费用, 包括合同研究和药物筛选。

如果您需要商业许可才能使用本材料, 但却没有商业许可, 请将本资料原封退回至 GE Healthcare Bio-Sciences AB, Björkgatan 30, SE-751 84 Uppsala, Sweden, 我们将退还为本材料支付的任何款项。

ECL Prime: 本产品或其部分产品是在 Cyanagen Srl 的许可下进行生产和销售, 并获得了美国第 7,855,287、7,803,573 和 9,040,252 号专利, 以及其他国家的同等授权专利和专利申请。

IMAC Sepharose、Ni Sepharose 和 Fe Sepharose 产品: 这些产品是根据 Sigma-Aldrich 公司的许可销售的, 其专利号为 EP 1276716 (金属螯合组合物), 在其他国家也有同等的专利和专利申请。

© 2025 Cytiva

如需查看当地办公室的联系信息, 请访问 cytiva.com/contact

CY13930-17Feb22-HB

