

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.07.008

蛋白免疫印迹法检测小分子蛋白的实验条件优化研究*

王文倩 魏 颖 王 宇 徐玉东 杨永清[△] 尹磊森[△]

(上海中医药大学 上海 201203)

摘要 目的:蛋白免疫印迹法自发明以来被广泛应用于现代生物学研究中的蛋白质定性和半定量分析。为了提高蛋白免疫印迹法的检测效率,需针对不同蛋白的特性调节相关的实验条件参数。本文旨在探讨免疫印迹法不同参数对小分子蛋白检测效果的影响,从而优化并获得最佳实验条件。**方法:**比较不同转膜电压和时间、转移缓冲液甲醇含量、不同化学发光剂对小分子蛋白的检测效果。**结果:**选择 20 V、10 min 转膜电压和时间所获得的信号显著高于 10 V、25 min 转膜条件,选择含 20 % 甲醇转移缓冲液所获得的信号显著高于无甲醇转移缓冲液,选择飞克级化学发光剂所获得的信号显著高于纳克级化学发光剂。**结论:**选用高电压、短时间组合,选择含 20 % 甲醇转移缓冲液和飞克级化学发光剂信号均有助于小分子蛋白免疫印迹检测。

关键词:免疫印迹法; Western blot; 小分子蛋白; 甲醇; 化学发光剂

中图分类号: R446.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2015)07-1230-03

Optimization Research on the Western Blot Experimental Conditions for Detecting Small Molecule Proteins*

WANG Wen-qian, WEI Ying, WANG Yu, XU Yu-dong, YANG Yong-qing[△], YIN Lei-miao[△]

(Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, 201203, China)

ABSTRACT Objective: Since the invention of the Western blotting method, it has been extensively applied as a protein qualitative and semi-quantitative analysis method in modern biology research. In order to improve the efficiency of this method, adjustments of the related experimental parameters were needed according to the characteristics of different proteins. Our purpose is to investigate the effects of different parameters of the Western blot in detecting small molecule proteins, thus optimize and get the ideal experimental conditions. **Methods:** Comparing the effects of different transfer voltages and times, different methanol contents of transfer buffer and different chemiluminescence reagents of western blot technology. **Results:** The signal of small protein obtained at 20 V for 10 min was much higher than that transferred at 10 V for 25 min. The signal of the 20 % methanol in transfer buffer was significantly higher than that of the 0 % methanol in transfer buffer. The effect of chemiluminescence reagent at femtogram level was superior to that of the nanogram level. **Conclusion:** Choosing high voltage and short time, choosing transfer buffer containing 20 % methanol and chemiluminescence reagent at femtogram level could be helpful in the detection of small molecule proteins by using the western blot assay.

Key words: Immunoblotting; Western blot; Small molecule protein; Methanol; Chemiluminescence reagent

Chinese Library Classification(CLC): R446.6 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)07-1230-03

前言

蛋白免疫印迹技术(Western blot)由美国斯坦福大学的乔治·斯塔克发明,其基本原理是通过特异性抗体对凝胶电泳处理过的蛋白样品进行着色,再通过分析着色的位置和深度获得目的蛋白在样品中的表达情况信息^[1-3]。蛋白免疫印迹技术集凝胶电泳、蛋白转印和免疫学标记等三部分于一体,在现代生物医学中广泛应用^[4,5]。然而该方法涉及步骤、因素较多,因此针对不同分子量蛋白需要选择不同参数以便获得较好的检测结果,

常见的影响因素有:转印电压及时间、转移缓冲液成分、化学发光显色液等^[6,7]。

本研究选择 10-20 kD 小分子蛋白作为研究对象^[8],拟比较不同转印电压及时间组合、转移缓冲液中甲醇成分含量、不同检测级别化学发光显色液等参数对免疫印迹法结果的影响,以期对小分子蛋白质研究提供实验技术支持。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

* 基金项目:国家自然科学基金项目(8117334;81173332;81202753;81473760);上海市卫生系统优秀青年人才培养计划(XYQ2013081);上海市中医药事业发展三年行动计划重大项目(ZYSNXD-CC-ZDYJ039)

作者简介:王文倩(1988-),女,博士研究生,主要研究方向:针灸效应物质基础研究,电话:021-54592134, E-mail: wqwang1988@163.com

△ 通讯作者:杨永清, E-mail: yyq@shutcm.edu.cn;

尹磊森, E-mail: collegeylm@shutcm.edu.cn

(收稿日期:2014-08-04 接受日期:2014-08-30)

十二烷基磺酸钠、过硫酸铵、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、四甲基乙二胺、三羟甲基氨基甲烷、甘氨酸、聚偏二氟乙烯膜(PVDF膜)、Immobilon western 辣根过氧化物酶(HRP)底物增强化学发光剂购自美国密理博公司;细胞裂解液、蛋白上样缓冲液、ECL 化学发光试剂盒购自碧云天生物技术有限公司。小分子蛋白一抗和 HRP 标记二抗均购自美国细胞信号通路技术公司。小型垂直电泳槽、半干转印仪、Gel-doc 凝胶成像系统购自美国伯乐公司。

1.2 凝胶电泳分离

配制 SDS-PAGE 相关缓冲液及凝胶,并根据目的蛋白分子量选取 14 %的浓缩胶配方^[9]。10× Tris-SDS-PAGE 电泳缓冲液室温保存,浓缩胶缓冲液和分离胶缓冲液 4℃ 避光保存。按 4:1 比例将蛋白样品与 5× SDS 上样缓冲液混匀,100℃ 煮沸 3 min,使蛋白样品充分变性。将预染 marker 和蛋白样品加入上样孔中,恒压 80 V,开始电泳,待样品跑至浓缩胶底部充分压至线性,将电压调至 120 V,继续电泳至溴酚蓝跑至分离胶底部,结束电泳。

1.3 蛋白半干转印

取出电泳完毕的凝胶并切除多余部分,利用甲醇浸泡 1 min 激活 PVDF 膜并将厚滤纸置转印缓冲液浸泡 15 min^[10]。在半干转印槽中按厚滤纸、PVDF 膜、凝胶、厚滤纸的顺序排列,避免并消除产生气泡。本研究比较了 20 V、10 min 和 10 V、25 min 两组参数(即高电压、短时间和低电压、长时间组合),以及含有 20 %甲醇和不含甲醇的转移缓冲液对小分子蛋白免疫印迹法结果的影响。

1.4 封闭、抗体孵育及显色

小分子蛋白转移至 PVDF 膜后,用 5 %脱脂奶粉(溶于 PBST 中)在摇床上孵育 2 h 以封闭膜上剩余的疏水结合位点。加入用 5 %脱脂奶粉稀释的一抗(1:1000 稀释)室温孵育 2 h,再用 PBST 漂洗 3 次洗去未结合的抗体,10 min/次。加入 PBST 稀释的 HRP 标记二抗(1:5000 稀释),室温孵育 2 h。用 PBST 洗去未结合的 HRP 标记的二抗,10 min/次,漂洗 3 次。加入化学发光显色液,室温反应 1 min,再将膜沥干,利用 Gel-doc 凝胶成像系统采集相应信号,观察蛋白表达量变化。本研究比较了飞克级和纳克级化学发光显色液对小分子蛋白免疫印迹法结果的影响。

2 结果

2.1 20 V、10 min 转膜条件所获得的信号显著高于 10 V、25 min

实验比较了高电压、短时间和低电压、长时间组合对于小分子蛋白转印结果的影响,发现半干转印时选择 20 V、10 min 和 10 V、25 min 参数对分子量为 10 kD 的蛋白都出现条带聚集无弥散、背景清晰的条带,但 20 V、10 min 的转膜条件组合获得的小分子蛋白信号强度明显高于 10 V、25 min(图 1),提示高电压、短时间的转膜条件组合优于低电压、长时间的转膜条件组合。

2.2 含 20 %甲醇转移缓冲液信号显著高于无甲醇转移缓冲液

实验比较了甲醇在转移缓冲液中作用。研究发现使用含 20 %甲醇转移缓冲液时,可见小分子蛋白条带清晰聚集、无弥散,而使用不含甲醇转移缓冲液时,同等条件下不能检测到蛋

白信号(图 2),提示甲醇在小分子蛋白转印中起重要作用。

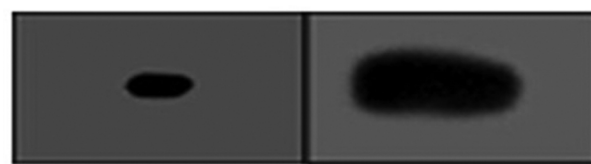


图 1 电压和时间对小分子蛋白免疫印迹结果影响

Fig. 1 The effects of voltage and time of western blot in detecting small molecule proteins

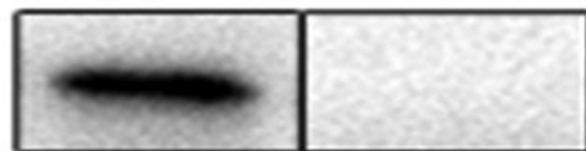


图 2 转移缓冲液中甲醇含量对小分子蛋白免疫印迹结果的影响

Fig. 2 The effects of methanol content in transfer buffer of western blot in detecting small molecule proteins

2.3 使用飞克级化学发光剂信号显著高于纳克级化学发光剂

实验使用不同检测级别化学发光剂发现两者都能检测到清晰聚集、无弥散的蛋白条带,但使用飞克级化学发光剂可以更迅速的检测到小分子蛋白条带,且信号更强(图 3)。

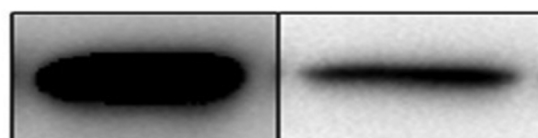


图 3 化学发光剂对小分子蛋白免疫印迹结果的影响

Fig.3 The effects of chemiluminescence reagent of western blot in detecting small molecule proteins

2.4 实验参数比较和优化选择

本研究比较了转膜电压、时间组合,转移缓冲液中甲醇含量和化学发光剂灵敏度对小分子蛋白 Western blot 检测效果的影响(表 1)。结果发现,选择高电压、短时间组合,使用含 20 %甲醇的转移缓冲液转膜并配合飞克级化学发光剂检测,可以更迅速有效获得小分子蛋白的信号。

3 讨论

根据最初对 DNA Southern 印迹法的命名,1981 年尼尔 o 伯奈特首次将蛋白免疫印迹法称为 Western blot,而后者逐渐成为作为分子生物学、生物化学和免疫遗传学等研究领域常用的检测蛋白表达水平的实验方法^[11],现有大量针对提高 Western blot 实验敏感性、速度、质量的文献可供参考^[12],按照严格规范方法操作的 Western blot 还可以获得蛋白的定量数据^[13,14]。

表 1 实验参数比较

Table 1 The comparison of experimental parameters

Experimental parameters	Optimization	Comparison
Transfer voltage	20 V	10 V
Transfer time	10 min	25 min
Methanol contents of transfer buffer	20 %	0 %
Chemiluminescence reagents	Femtogram level	Nanogram level

转印是 Western blot 的关键环节, 即将凝胶中已分成条带的蛋白质转移到一种固相支持物上, PVDF 膜因其蛋白结合力高, 韧性较好, 化学性质稳定而较为常用^[15]。其中 0.2 μm 孔径的膜吸附小分子蛋白的能力高于 0.45 μm 孔径的膜, 可有效避免小分子蛋白丢失^[16], 而本研究检测蛋白分子量在 10-20 kD 左右, 故选择孔径为 0.2 μm 的 PVDF 膜。

电压和时间是影响转印效率的关键条件^[17,18], 需要根据目的蛋白分子量、凝胶厚度等因素调节。本研究均采用 0.75 mm 薄胶进行电泳分离, 而对于 10-20 kD 的小分子蛋白, 实验发现高电压、短时间组合优于低电压、长时间的转膜条件组合, 提示高电压有助于小分子蛋白从胶上转移到 PVDF 膜, 而短时间也可能会降低小分子蛋白分解概率。

转移缓冲液成分也是影响转膜效率的因素之一。在转移缓冲液中, 甲醇被认为可通过疏水作用增加了膜结合蛋白的能力, 然而甲醇又会减少小分子蛋白的洗脱效果, 因此需要提前确定转移缓冲液中合适的甲醇浓度^[19]。本研究发现浓度为 20 % 的甲醇可以有效获得小分子蛋白免疫印迹信号, 而缺少甲醇的转移缓冲液无法将小分子蛋白转印至 PVDF 膜。

在化学发光法的选择上, HRP 活性高且特异性强^[20,21], 而本实验结果显示飞克级化学发光剂和纳克级化学发光剂都能获得一定的阳性蛋白信号, 但飞克级化学发光剂获得的阳性信号明显增加且响应时间更少, 有利于小分子蛋白检测。

参考文献(References)

- [1] Green MR, Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual[C]. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012
- [2] Kurien BT, Scofield RH. Protein blotting: a review [J]. J Immunol Methods, 2003, 274(1-2):1-15
- [3] Towbin H. Origins of protein blotting [J]. Methods Mol Biol, 2009, 536:1-3
- [4] MacPhee DJ. Methodological considerations for improving Western blot analysis[J]. J Pharmacol Toxicol Methods, 2010, 61(2):171-177
- [5] Kumar S, Zheng H, Mahajan B, et al. Western blot assay for quantitative and qualitative antigen detection in vaccine development[J]. Curr Protoc Microbiol, 2014, 33(18): 41
- [6] Luo H, Rankin GO, Straley S, et al. Prolonged incubation and stacked film exposure improve sensitivity in western blotting[J]. J Pharmacol Toxicol Methods, 2011, 64(3):233-237
- [7] Kurien BT, Scofield RH. Western blotting [J]. Methods, 2006, 38(4): 283-293
- [8] Wei Y, Xu YD, Yin LM, et al. Recombinant Rat CC10 Protein Inhibits

PDGF-Induced Airway Smooth Muscle Cells Proliferation and Migration[J]. Biomed Res Int, 2013, 2013:690937

- [9] 尹磊森, 魏颖, 王宇, 等. Tricine 电泳优化方法在针灸效应小分子蛋白检测中的应用[J]. 上海针灸杂志, 2012, 31(3):191-193
Yin Lei-miao, Wei Ying, Wang Yu, et al. Application of Optimized Tricine Electrophoresis Method in Detecting Low Molecular Weight Proteins of Acupuncture Effect[J]. Shanghai J Acu-mox, 2012, 31(3): 191-193
- [10] Too CK, Murphy PR, Croll RP. Western blotting of formaldehyde-fixed neuropeptides as small as 400 daltons on gelatin-coated nitrocellulose paper[J]. Anal Biochem, 1994, 219(2):341-348
- [11] Lewis CW, Taylor RG, Kubara PM, et al. A western blot assay to measure cyclin dependent kinase activity in cells or in vitro without the use of radioisotopes[J]. FEBS Lett, 2013, 587(18):3089-3095
- [12] Kurien BT, Scofield RH. A brief review of other notable protein detection methods on blots[J]. Methods Mol Biol, 2009, 536:557-571
- [13] Taylor SC, Berkelman T, Yadav G, et al. A defined methodology for reliable quantification of Western blot data[J]. Mol Biotechnol, 2013, 55(3):217-226
- [14] Taylor SC, Posch A. The Design of a Quantitative Western Blot Experiment[J]. Biomed Res Int, 2014, 2014:361590
- [15] Kurien BT, Scofield RH. Introduction to protein blotting[J]. Methods Mol Biol, 2009, 536:9-22
- [16] Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A[J]. Anal Biochem, 1981, 112(2):195-203
- [17] Na SJ, Kim WJ, Kim SM, et al. Clinical, immunohistochemical, Western blot, and genetic analysis in dystrophinopathy[J]. J Clin Neurosci, 2013, 20(8):1099-1105
- [18] Liu ZQ, Mahmood T, Yang PC. Western blot: technique, theory and trouble shooting[J]. N Am J Med Sci, 2014, 6(3):160
- [19] Gibbons J. Western blot: protein transfer overview [J]. N Am J Med Sci, 2014, 6(3):158-159
- [20] Ji K, de Carvalho LP, Bi X, et al. Highly sensitive and quantitative human thrombospondin-1 detection by an M55 aptasensor and clinical validation in patients with atherosclerotic disease[J]. Biosens Bioelectron, 2014, 55:405-411
- [21] Ma L, Sun Y, Kang X, et al. Development of nanobody-based flow injection chemiluminescence immunoassay for sensitive detection of human prealbumin[J]. Biosens Bioelectron, 2014, 61:165-171