

Western 印迹中蛋白质定量分析的替代方法

王尧尧* 税朝祥 方秋红

(清华大学第一附属医院中心实验室和内科, 北京 100016)

摘要 Western 印迹广泛采用显像密度计法对特异性蛋白质表达进行定量, 但是仍然存在敏感性的问题尚未解决。同时, 昂贵的试剂与复杂的设备限制了其应用。建立了一种改良定量检测法, 使用碱性磷酸酶标记的第二抗体, 以萘酚磷酸盐和快红作反应底物。吸附膜上的终末显色用有机溶剂洗脱, 通过测定光吸收值定量。结果显示该法更简便、快速、经济而不失其敏感性。

关键词 Western 印迹; 蛋白质定量分析

Western 印迹是利用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分辨蛋白质样品, 再转移至醋酸纤维或聚偏氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 吸附膜上, 以酶标记的特异抗体直接或间接检测特异性蛋白质的表达, 并分析其相对含量。常用的定量分析法包括使用化学发光剂 (chemiluminescence) 作为酶反应底物, 经曝光处理在放射性感光胶片上显带, 再以显像密度计 (image densitometer) 以及相应的计算机软件进行定量扫描分析^[1]。实践中, 我们发现显像密度计仍然存在敏感性的问题, 所测得的定量指标与蛋白质样品含量的相关性较差, 而且使用化学发光剂和放射性感光胶片等材料费用十分昂贵。相应的特殊设备和计算机软件系统也限制了开展工作的条件。本文介绍一种碱性磷酸酶 (ALP) 标记抗体探测、以萘酚磷酸盐与快红做底物的显带法, 经有机溶剂洗脱后可直接对 Western 印迹定量分析, 方法简便、快速、经济, 而且不影响其敏感性。

1 材料与方法

蛋白质样品来自培养的人体肺成纤维母细胞。纤维母细胞以 2×10^4 个/cm² 接种于盛有 10 ml Dulbecco 改进的 Eagle 培养基 (DMEM, Sigma) 培养液和 10% 小牛血清 (FBS) 的 100 mm × 20 mm 培养皿 (Corning) 中。培养在含 5% CO₂、充分湿化的 37 °C 恒温培养箱 (三洋) 进行。成纤维母细胞达到 80% 以上汇合后弃上清液, 用 4 °C 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4) 洗细胞 3 次。每只皿加 0.5 ml 低渗蛋白提取液 [35 mmol/L Tris-HCl, 0.4 mmol/L EDTA, 10 mmol/L MgCl₂ 及 0.1% 蛋白酶抑制剂混合物 (protease inhibitor cocktail, Sigma), pH 7.4], 待细胞被充分覆盖, 用

自制橡皮刮解离细胞, 收集样本至 1.5 ml 无菌离心管, 置 -20 °C 过夜。复温后剧烈振荡 15 s 促进细胞裂解, 离心 10 000 g 10 min 去不溶物。上清液中的蛋白质含量用 BCA 微孔板法定量^[2], 使用牛血清白蛋白 (BSA) 做标准品。

将不同浓度的蛋白质样品稀释至终体积为 20 μl 的上样缓冲液 (0.5 mol/L Tris-HCl、10% 甘油、2% SDS、5% 二巯基乙醇及 0.1% 溴酚兰, pH 6.8), 96 °C 加热 5 min 变性。分别以 3% 和 9% 的 SDS-聚丙烯酰胺为浓缩胶和分离胶, 在含有甘氨酸与 SDS 的 Tris 电极缓冲液 (pH 8.3) 中以 200 V 电压电泳 45 min。用平板法 (Bio-Rad)、含 20% 甲醇和 10% SDS 的 Tris / 甘氨酸缓冲液、20 V/45 min 转移蛋白质样品至 PVDF 吸附膜 (Amersham) 上。PVDF 膜浸泡于封闭液 (0.1 mol/L Tris-HCl、0.1% 吐温-20、1% BSA 及 5% 马血清, pH 7.6) 0.5 h, 与 1 : 2 500 稀释于 Tris-HCl、0.1% 吐温-20 及 1% 马血清 (pH 7.6) 的鼠抗波形蛋白 (vimentin) 抗体 (中杉金桥公司) 在室温反应 1 h 或 4 °C 温育过夜。洗涤 3 次后加入 1 : 2 500 稀释、ALP 标记的马抗鼠免疫球蛋白 IgG (中杉金桥公司), 室温反应 1 h, 洗 3 次。最后与 ALP 底物溶液 [按每 10 ml Tris-HCl (0.1 mol/L, pH 9.5) 加入 2 mg 事先用 10 μl 无水乙醇溶解的萘酚 AS-MX 磷酸盐 (naphthol AS-MX phosphate) 和 5 mg 快红 (fast red TR, Sigma)] 室温下反应至特异红色蛋白质带清晰显现。平板扫描摄像后, 沿边缘将特异蛋白质带

收稿日期: 2006-07-13 接受日期: 2006-12-01

清华-裕元基金资助项目

* 通讯作者。Tel: 010-64308204, Fax: 010-64361322, E-mail:

lois222@163.com

表 1 Western 印迹不同蛋白质定量分析法比较

	显像密度计量法(image densitometry)	DMSO 萃取法(colorimetric assay)	萃取法评价
抗体标记物	碱性磷酸酶	碱性磷酸酶	无区别
底物	化学发光剂	萘酚磷酸盐	价廉
探测信号	荧光	快红显色	可见色, 反应易控
定量法	显像密度计	DMSO 萃取	无需特殊设备
所需材料	感光胶片, 暗室条件, 显影装置, 电脑软件	96 孔板 酶标阅读仪	简便, 费用低
需样本量	通常 10 μg	0.5~16 μg 均可	敏感性接近或更好

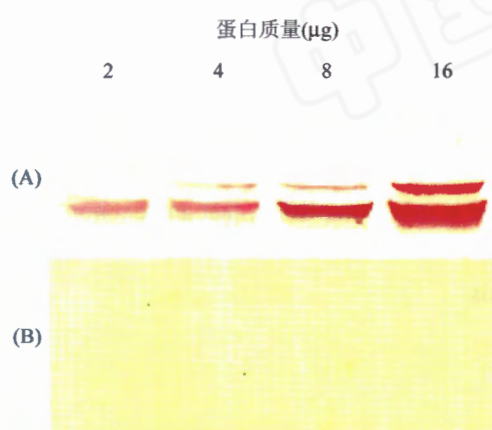


图 1 Western 印迹分析中 PVDF 膜的染色显带

A: 蛋白质样品稀释为 2~16 μg , 在 20 μl 上样缓冲液里加热变性, 经 SDS-PAGE、转膜、抗体杂交, 底物反应显带呈红色; B: 第一抗体替换为非特异性鼠 IgG 作为阴性对照, 未显示染色。

切下, 置入盛有 200 μl 孔二甲基亚砜(DMSO)的 96 孔圆底微孔板, 静置或轻微振荡 15 min, 萃取红色产物直至 PVDF 膜上无着色为止, 以酶联免疫仪(Thermo)测波长为 492 nm 的吸收值(A_{492})定量。

2 结果与讨论

萘酚 AS-MX 磷酸盐在碱性条件下经 ALP 水解生成萘酚, 后者与偶氮染料快红结合形成难溶于水或一般性有机溶剂(比如酒精)的红色产物。但我们发现该产物极易溶于 DMSO, 因而为 Western 印迹定量分析提供了更为简便有效的手段。

图 1 显示, 用萘酚与偶氮染料显色所获得的蛋白质带呈鲜红色且分辨非常清晰。经萃取后红色蛋白质带可以消失, DMSO 呈现红色, 说明产物被完全洗脱而溶于 DMSO。这一结果为酶联免疫仪测定吸收波长进行定量分析打下了基础。

图 2 显示按倍数稀释至 0.5~16 μg 的蛋白质样品, 经电泳、转膜、抗体杂交并最后显带、脱色, 酶联免疫仪测定所获得的 A_{492} 值与稀释倍数呈高度正

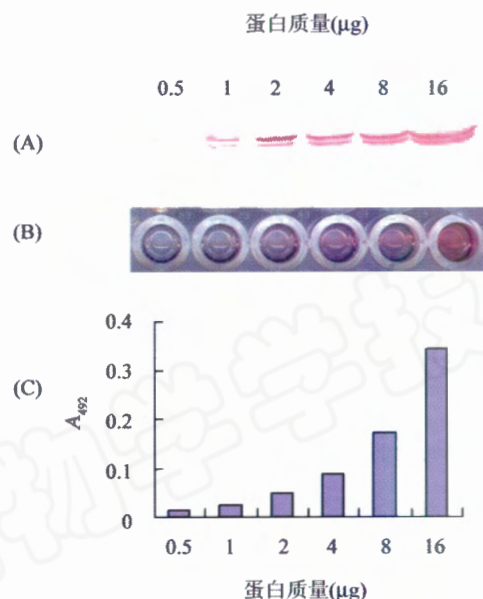


图 2 Western 印迹定量分析

A: 蛋白质样品稀释为 0.5~16 μg , 在 20 μl 上样缓冲液里加热变性, 经 SDS-PAGE、转膜、抗体杂交, 底物反应显带呈红色; B: 将相应的特异蛋白质带切下, DMSO 萃取后酶联免疫仪测 A_{492} 定量; C: A_{492} 与样本蛋白质质量关系曲线($\gamma=0.999$)。

相关($\gamma=0.999$)。该方法省去了显像密度计定量法中要求的昂贵试剂与复杂设备, 也克服了某些方法敏感但必需使用同位素的不足^[1]。DMSO 萃取法敏感性达到能检测 0.5 μg 细胞提取物所含的特异蛋白质成分, 反复测定 A_{492} 产生的误差低于 3%。我们运用该法分析其他细胞成分也获得敏感而且稳定的结果。有关改良后的方法特点和优点见表 1。Western 印迹分析中亦常以 BCIP/NBT 作为 ALP 反应底物进行显带, 在吸附膜上呈深蓝紫色, 定量分析中能否用有机溶剂萃取的办法尚未被尝试。

参考文献 (References)

- [1] Parrado J et al. *Pept Res*, 1993, 6: 13
- [2] Redinbaugh MG et al. *Anal Biochem*, 1986, 153: 267
- [3] Hunger HD et al. *Anal Biochem*, 1994, 217: 98

Alternative Method for Quantifying Protein Expression in Western Blotting Analysis

Yao-Yao Wang*, Chao-Xiang Shui, Qiu-Hong Fang

(*Central Laboratory and Department of Internal Medicine, First Hospital of Tsinghua University, Beijing 100016, China*)

Abstract Image densitometry has been widely used to quantify specific cellular protein expression in Western blotting analysis, but still there exists an unresolved problem of sensitivity. Furthermore, the use of expensive reagents and complex equipment limits its application. Here, we establish an improved method for quantitative examination by using alkaline phosphatase-labeled secondary antibody in combination with substrate compound naphthol AS-MX phosphate and chromagen 4-chloro-2-methylbenzenediazonium salt (fast red TR). The final colorization on blotted membrane is eluted using an organic solvent dimethylsulfoxide (DMSO) and quantified by reading absorbance at 492 nm. Our results prove that this technique is more simplified, fast and economic, without loss of its sensitivity.

Key words Western blotting; protein quantitative analysis

Received: July 13, 2006 Accepted: December 12, 2006

This work was supported by the Tsinghua-Yue-Yuen Foundation

*Corresponding author. Tel: 86-10-64308204, Fax: 86-10-64361322, E-mail: lois222@163.com