

# 半干式蛋白质电泳印迹的影响因素及条件优化

刘彬 韩梅\* 温进坤

(河北医科大学基础医学研究所, 河北省医学生物技术重点实验室, 石家庄 050017)

**摘要** 采用蛋白质分子量标准物和纯化的重组蛋白质进行半干式蛋白质印迹, 探讨半干式电泳印迹的多种因素对印迹效果的影响。结果表明: 在不同电转移条件下, 均存在不同程度的蛋白质透膜转移现象, 当电流强度恒定时, 电转移时间过长和上样量过大是造成实验中透膜转移而丢失的主要原因, 可根据待测蛋白质的分子量和表达丰度确定恰当的电转移时间和上样量。

**关键词** 半干式电转移; 蛋白质; 免疫印迹

1979年, Towbin等<sup>[1]</sup>首次报道了将蛋白质从电泳凝胶转移到硝酸纤维素膜(NC膜)的技术。后来Kyhse-Andersen<sup>[2]</sup>创立了半干式蛋白质转移的方法, 使蛋白质印迹的整个过程变得高效而且迅速。随着这一技术在生物研究领域的广泛应用, 电泳印迹过程中的一些影响因素逐渐得到了大家的关注<sup>[3-5]</sup>。电泳印迹的效果如何直接影响到下一步抗体检测真实性, 以往通常对湿转后印迹膜的蛋白质转移情况用丽春红染色进行初步观察后再继续进行抗体检测<sup>[6]</sup>, 然而在半干式蛋白质转移方面的应用未见报道。我们采用丽春红染色的方法对半干式蛋白质电泳印迹至聚偏氟乙烯膜(PVDF膜)上的蛋白质进行预检测, 并对导致蛋白质透膜转移的几种影响因素进行了观察与比较, 为选择合适的电转移条件提出一些建议和策略。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

丙烯酰胺(acrylamide)、甲叉双丙烯酰胺(bisacrylamide)为Sigma公司产品, 丽春红(分析纯)购自北京化工厂, 蛋白质分子量标准物购自中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所, 0.2 μm PVDF膜购自Millipore公司; 半干式蛋白质印迹转模槽为美国Bio-Rad公司产品。

### 1.2 蛋白质样品的制备

将pGEX-4T-SM22质粒转化基因工程菌株*E. coli* JM109感受态细胞, 经诱导、菌体破裂、蛋白质变性、复性后用谷胱甘肽硫转移酶-琼脂糖凝胶4B(GST-Sepharose 4B)亲和层析柱纯化, 得到48 kDa的具有GST融合标签的SM22融合蛋白(GST-SM22)纯品。

### 1.3 方法

将蛋白质分子量标准物与纯化的GST-SM22融合蛋白上样进行十二酰基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 凝胶浓度为8%。电泳完毕后对凝胶进行半干转膜(转膜缓冲液为48 mmol/L Tris, 39 mmol/L 甘氨酸, 1.3 mmol/L SDS, 含20% 甲醇, pH 9.2)。半干式转膜槽阴极在上, 阳极在下, 在半干转移的凝胶“三明治”中, 先准备阳极侧滤纸, 然后重叠放置两张大小完全一致的0.2 μm PVDF膜, 再铺凝胶及阴极侧滤纸, 缓冲液为连续缓冲液, 蛋白质移动方向由上而下。转移电流50~250 mA, 转移时间15~50 min。电转移结束后, 用丽春红直接染色对印迹至PVDF膜上的蛋白质转移情况进行检测。

## 2 结果与讨论

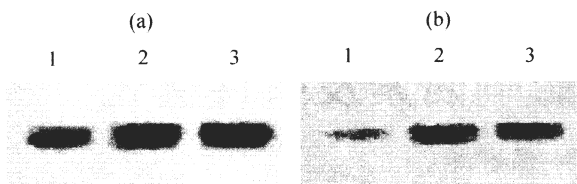
### 2.1 电转移中蛋白质存在转移过度现象

图1显示的是对GST-SM22融合蛋白进行印迹后丽春红染色的结果。由图可见, 直接与凝胶接触的第一张PVDF膜上可见48 kDa的GST-SM22融合蛋白的条带(图1a), 与此同时第二张膜的相同位置也同样出现了该蛋白质的特异印迹条带(图1b), 可见在电转移过程中, 部分蛋白质穿过了第一张PVDF膜后又吸附到第二张PVDF膜上。说明在半干转膜过程中, 存在着待测蛋白质透过PVDF膜而丢失的现象, 而且透膜转移的程度与待测蛋白质的含量成正相关关

收稿日期: 2006-07-25 接受日期: 2006-11-24

国家自然科学基金(No.30570661)和国家科技部基础研究重大项目前期研究专项(No.2005CCA03100)资助项目

\* 通讯作者。Tel: 0311-86265563, Fax: 0311-86265563, E-mail: hanmei@hebm.edu.cn



**Fig.1** PVDF membrane dyed with ponceau showed GST-SM22 (a) Blots of the first PVDF membrane; (b) Blots of the second PVDF membrane. Voltage: 20 V, transfer time: 45 min, loading protein in lane 1-3 was 40, 60 and 80  $\mu\text{g}$ , respectively.

系。

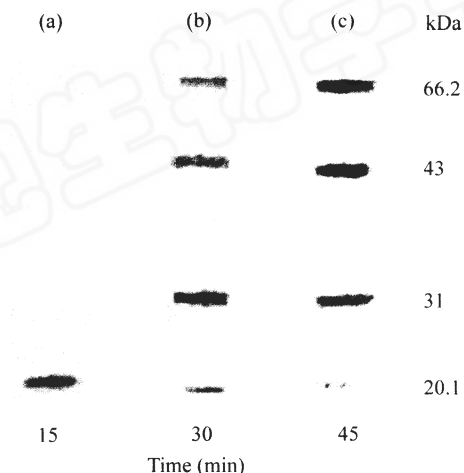
Towbin等<sup>[1]</sup>在最初进行蛋白质电泳印迹时,将重叠在一起的两张0.45  $\mu\text{m}$ 的NC膜置于凝胶之后浸泡于电泳缓冲液中进行电转移,转移完毕后对第二张NC膜进行了氨基黑染色,也观察到蛋白质透膜转移的现象。国内学者采用了不同的电泳装置和不同类型的吸附膜进行了类似的实验,同样观察到相似的结果<sup>[7]</sup>。由此可见,蛋白质印迹中的透膜转移的现象是普遍存在的,与印迹中使用的电转移方式(湿转或半干转移),膜材料的孔径(0.2  $\mu\text{m}$ 或0.45  $\mu\text{m}$ )及自身的物理性质(NC膜或PVDF膜)并无直接的联系。

## 2.2 半干转移中蛋白质印迹的影响因素

为了清楚地显示不同影响因素下蛋白质从凝胶到PVDF膜的电转移情况,我们采用丽春红直接显示PVDF膜上的待检测蛋白质,这样不仅相对省时,而且操作起来方便易行。实验结果发现下列因素对电转移效果影响较大。

**2.2.1 蛋白质上样量** 图1a和图1b是在上样量不同的条件下进行半干式电泳印迹的结果。在其他条件完全一致的情况下,分别取40  $\mu\text{g}$ 、60  $\mu\text{g}$ 和80  $\mu\text{g}$  GST-SM22融合蛋白上样,进行SDS-PAGE后电转移印迹的结果。从图中可以看到蛋白质过度转移的现象受上样量影响较大,蛋白质上样量越高,蛋白质透膜转移的现象越严重。当印迹的蛋白质样品量超出PVDF膜的吸附容量时,就会使“过载”的蛋白质透膜吸附到第二张PVDF膜上。

NC膜通过疏水作用与蛋白质结合起到吸附蛋白质的作用,其吸附蛋白质的量受最大吸附容量的限制,只有当上样量超过其最大吸附容量时才会出现转移过程中的蛋白质丢失<sup>[1]</sup>。尽管选用吸附容量更强大的PVDF膜,它不仅可以通过疏水作用与蛋白质结合,还主要通过膜上的正电荷与蛋白质发生作用,其结合蛋白质的能力约为NC膜的6倍<sup>[7]</sup>。然而,在实验中观察到,当上样量尚未达到PVDF膜的吸附容量(170



**Fig.2** Electrophoretic transfer time affected the result of Western blot

Electrophoretic transfer conditions: Voltage: 20 V, loading protein marker in lane: 10  $\mu\text{l}$ .

$\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )时就发生了透膜现象。由此推测,虽然PVDF膜具有强大的吸附蛋白质的能力,但是结合到PVDF膜上的蛋白质在电场的作用下,可以继续迁移到达阳极从而穿过PVDF膜。与此同时,仍不断有蛋白质从凝胶中移出再吸附到PVDF膜上,并且这个“一进一出”的动态平衡在电转移的一开始就是存在的,找到这个“吸附”与“移出”的平衡点对于我们实验结果的真实性与可靠性起着关键的作用。上样量过大,由于相同分子量的其他蛋白质也会相应增多从而干扰目的蛋白与膜的结合,导致目的蛋白的检出率和信号强度降低。因此,在进行正式实验前,有必要对上样量做一个梯度测试,在最佳上样量的条件下取得满意的实验结果。

**2.2.2 转移时间** 电转移时间的确定主要取决于待检测蛋白质的分子量。图2显示的是在电转移时间不同的条件下,蛋白质分子量标准物印迹条带的动态变化情况:在转移时间分别是15 min、30 min和45 min时,较小分子量蛋白质的特异转移印迹条带由强到弱,而较大分子质量的蛋白质印迹条带则由无到有。在转移15 min时,除了20 kDa的蛋白质在PVDF膜上清晰显示外,其他几种蛋白质均没有明显的印迹条带。当转移时间延长至45 min时,分子质量为66 kDa的大分子量蛋白质特异印迹带显色明显,然而此时20 kDa的蛋白质条带显色明显比转膜15 min时弱,这意味着一部分的20 kDa的蛋白质由于发生了透膜转移已经丢失。经过SDS以及 $\beta$ 巯基乙醇处理过的蛋白质样品二硫键被还原,分子量不同的蛋白质



**Fig.3 Current of electrophoretic transfer affected the result of Western blot**  
(a) Current 40 mA; (b) Current 80 mA. Transfer time: 40 min, loading protein: 120  $\mu$ g.

肽链伸展形成大小不同的 SDS-蛋白质复合物, 它们在电场作用下迁移时受到的阻力不同。小分子量的蛋白质复合物受到的阻力小, 最先穿过凝胶吸附到 PVDF 膜上, 随着转移时间的不断延长, 这些分子量较小的蛋白质在电场的作用下继续向阳极移动, 最终通过了 PVDF 膜。而分子量较大的蛋白质在相同的情况下迁移时阻力较大, 转移相对缓慢, 在转移时间达到 45 min 时才能比较充分地吸附到 PVDF 膜上。因此, 在电转移过程中必须要根据待检测蛋白质的分子量大小设置电转移时间, 如果需要对同一凝胶上分子量相差悬殊的两种蛋白质进行电转移印迹时, 可以将凝胶裁开分别进行转膜。例如目的蛋白分子量为 20 kDa 和 60 kDa 时, 可以将电转移时间分别控制在 15 min 和 45 min, 这样可避免出现低分子量的蛋白质已经发生了透膜转移而高分子量的蛋白质转移尚不完全的现象, 尽可能的使蛋白质印迹真实可靠。

**2.2.3 电流强度** 图 3 显示的是在不同电流强度下, GST-SM22 融合蛋白在 PVDF 膜上的印迹结果。在电转移时间和上样量相同的条件下, 采用不同的电流强度, 蛋白质印迹的结果也出现了明显的差别。相同上样量的 GST-SM22 融合蛋白在 80 mA 的电流强度下比 40 mA 时显示的印迹条带变浅、变细(图 3a), 说明已有部分蛋白质转移过度而丢失。提示在较高的转移电流下, 蛋白质所受到的电场力较大, 能以较快的速度脱离凝胶结合到 PVDF 膜上, PVDF 膜对蛋白质的吸附力又不足以对抗电场力的作用, 因此发生较严重的蛋白质透膜转移的现象(图 3b)。另外,

电流强度过大还可使电转移温度升高, 导致蛋白质降解, 并引起“三明治”中的凝胶缩小变形而影响下一步的检测。通常情况下, 选择恒流而调整电转移时间为宜。

总之, 半干式蛋白质电泳印迹具有操作简单、快速、节约缓冲液、印迹条带背景清晰等特点, 但也存在一定局限性, 对于分子量过低或者过高的蛋白质的印迹效果不太理想。在上述各种影响因素中, 首先以电转移时间和上样量作为条件优化的主要对象。由于条件选择的失误, 尤其是在检测那些低表达、低丰度的蛋白质时, 因蛋白质的透膜转移所致的目的条带消失, 极易出现假阴性结果。另外, 用丽春红对印迹膜染色, 可以在短时间内清楚地显示出电转移印迹的效果, 故可用于电泳印迹条件的优化。在确定电转移条件时, 应充分考虑到上述各种因素之间的相互影响, 逐一进行优化, 避免同时改变多个因素, 以期达到最佳效果。

### 参考文献 (References)

- [1] Towbin H *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, **76**: 4350
- [2] Kyhse-Anderson J. *J Biochem Biophys Meth*, 1984, **10**: 203
- [3] Stellwag EJ *et al.* *Nucleic Acids Res*, 1980, **8**: 299
- [4] Renart J *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, **76**: 3116
- [5] Bowen B *et al.* *Nucleic Acids Res*, 1980, **8**: 1
- [6] 萨姆布鲁克 J 等。分子克隆实验指南, 第二版, 北京: 科学出版社, 1992, 893
- [7] 董 燕等。生物化学与生物物理进展, 2002, **29**: 449
- [8] 萨姆布鲁克 J 等。分子克隆实验指南, 第三版, 北京: 科学出版社, 2002, 1723

## Influencing Factors of the Semi-dry Electrophoretic Transfer and the Optimize Conditions

Bin Liu, Mei Han\*, Jin-Kun Wen

(Hebei Laboratory of Medical Biotechnology, Institute of Basic Medical Science, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

**Abstract** To elucidate the effect of the semi-dry electrophoretic transfer and its influencing factors in Western blot, the protein marker and purified recombination protein were used to analyzed. In the different electrophoretic transfer condition, the phenomenon of protein transmembrane was detected on the PVDF membrane. When the electric current is permanent, the transfer time and loading protein were the main causes in the excess transfer. It is demonstrated that the loading protein and transfer time in the transfer depend on the molecular mass and expressive abundance of protein which is detected.

**Key words** semi-dry electrophoretic transfer; protein; Western blot

Received: July 25, 2006 Accepted: November 24, 2006

This work was supported by National Natural Science Foundation of China (No.30570661), Special Found for Preliminary Research of Key Basic Research Project of Ministry of Science and Technology of China (No.2005CCA03100)

\*Corresponding author. Tel: 86-311-86265563, Fax: 86-311-86265563, E-mail: hanmei@hebm.u.edu.cn