

In-cell Western 和 Cell ELISA 在大分子量蛋白质 相对定量中的应用

高翔 蹇爱荣 李京宝 商澎*

(西北工业大学生命科学院, 西北工业大学特殊环境生物物理学研究所,
空间生物实验模拟技术国防重点学科实验室, 西安 710072)

摘要 探讨两种新的检测方法——In-cell Western 和 Cell ELISA 在大分子量蛋白质相对定量中的应用。将培养细胞原位固定、通透化、封闭, 然后加入目标蛋白质的一抗、红外荧光标记的二抗或酶标记的二抗, 使用双红外成像系统或多功能酶标仪对目标蛋白质进行相对定量。通过这两种方法检测模拟失重环境对成骨细胞中大分子量骨架相关蛋白——微管微丝交联因子(microtubule actin cross-linking factor 1, MACF1)含量的影响, 结果表明模拟失重环境促进了 MACF1 表达, 且这两种方法检测结果一致。In-cell Western 和 Cell ELISA 这两种检测方法灵敏迅速、操作简便, 可以用于大分子量蛋白质的相对定量。

关键词 In-cell Western; Cell ELISA; 大分子量蛋白质; 相对定量

对于细胞中特定蛋白质的相对定量, 当前研究中经典的方法就是将细胞裂解后提取总蛋白进行 SDS-PAGE^[1]和 Western 印迹法^[2]。但是由于在大分子量蛋白质(分子量大于 400 kDa)检测方面 SDS-PAGE 存在一定的局限性, 因此本文介绍两种新方法——In-cell Western 和 Cell ELISA 检测法以相对定量大分子量蛋白质。

In-cell Western^[3,4]和 Cell ELISA^[5,6]是依据抗原抗体结合的免疫学原理利用特异性抗体(一抗)在固定化细胞的原位与目标蛋白质进行结合, 然后再使用红外标记的二抗或酶标记二抗对一抗进行标记, 通过检测二抗的总荧光量或酶反应产物的量从而达到定量某种特定目标蛋白质的目的。

本文利用 In-cell Western 和 Cell ELISA 这两种新的方法来检测模拟失重环境对成骨细胞中大分子量蛋白质微管微丝交联因子(microtubule actin cross-linking factor 1, MACF1) (分子量约为 608 kDa)^[7]表达量的影响, 结果表明这两种方法可以较好地解决实验中遇到的一些困难, 而且简单实用、结果可靠。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

MEM 培养基(HyClone, 美国 Thermo Fisher 公司), 非 CO₂ 依赖培养基 Leibovitz's L-15 (Gibco, 美国 Invitrogen 公司), 胎牛血清(HyClone, 美国 Thermo

Fisher 公司)。MACF1 兔多抗(北京奥维亚生物技术有限公司), IRDye™ 800 标记的羊抗兔二抗(美国 Rockland 免疫化学品公司), 核染料 DRAQ5 (英国 Biostatus 有限公司), 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(美国 Santa Cruz 生物技术公司), 四甲基联苯胺(TMB, 美国 AMRESCO 公司), 96 孔培养板(Costar 3599, 美国 Corning 公司)和 96 孔可拆式微孔板(Costar 9102, 美国 Corning 公司)。可产生大梯度强磁场的 JMTA-16T50MF 超导磁体(日本 JASTEC 公司), Odyssey 双红外成像系统(美国 LI-COR 公司); Synergy HT 多功能酶标仪(美国 BioTek 公司); HERA cell 150 细胞培养箱(德国 Heraeus 公司); 1575 型微孔板洗板机(美国 Bio-Rad 公司); Polymax 1040 振荡混匀器(德国 Heidolph 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 小鼠成骨样细胞 MC3T3-E1 购自中国医学科学院基础医学研究所基础医学细胞中心, 用含 10% 胎牛血清的 MEM 培养基在 100 ml 细胞培养瓶中, 于 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度条件的细胞培养箱中进行培养。取对数生长期的 MC3T3-

收稿日期: 2009-05-11 接受日期: 2009-10-27

国家高技术研究发展计划(863计划)(No.2008AA12A218)和国家自然科学基金(No.30840030, No.30970706)资助项目

* 通讯作者。Tel: 029-88460391, Fax: 029-88491671, E-mail: shangpeng@nwpu.edu.cn

E1 细胞,用 0.25% 胰蛋白酶消化单层培养细胞,用含 10% 胎牛血清的 MEM 培养液配成单个细胞悬液,以每孔 2×10^4 个细胞接种于 96 孔培养板或 96 孔可拆式微孔板中,每孔体积 200 μl 。将培养板放入上述条件的培养箱中培养 6 h,待细胞完全贴壁后更换无血清 MEM 培养液培养 18 h 以使细胞周期同步化。之后更换非 CO_2 依赖培养液(含 10% 胎牛血清),将细胞分为两组,实验组细胞放入由超导磁体产生的磁悬浮模拟失重环境(0 g) [8] 培养 24 h (37 $^\circ\text{C}$ 、无 CO_2); 对照组细胞放置于 37 $^\circ\text{C}$ 、无 CO_2 的培养箱中培养 24 h。

1.2.2 In-cell Western 处理后的细胞立即用每孔 200 μl 1 \times PBS 缓冲液室温小心洗涤一次。然后每孔加入 150 μl 新鲜配制的 4% 多聚甲醛固定缓冲液室温静置固定细胞 30 min。再加入每孔 200 μl 的 0.1% Triton X-100 缓冲液对固定化的细胞进行通透化处理 5 次,每次 5 min。

每孔加入 150 μl 含 1% BSA 的 PBS 缓冲液对细胞室温封闭 120 min。封闭完成后,每孔加入 50 μl 用 PBS 稀释的 MACF1 兔多抗室温温育 120 min。再在每孔中加入 200 μl 含 0.1% Tween-20 的 PBS 缓冲液洗涤细胞 5 次,每次 5 min。

每孔加入 50 μl 用 PBS 稀释的 IRDyeTM 800 标记的羊抗兔二抗(可在 800 nm 处发出红外荧光)室温避光温育 120 min,二抗温育液中同时含有可在 700 nm 处发出红外荧光的核染料 DRAQ5。再在每孔中加入 200 μl 含 0.1% Tween-20 的 PBS 缓冲液避光洗涤细胞 5 次,每次 5 min。最后完全移除洗涤液,避光晾干 30 min,然后将 96 孔培养板用 Odyssey 双红外成像系统以 700 nm 与 800 nm 双通道进行扫描成像,即可获得结果图像。

1.2.3 Cell ELISA 处理后的细胞立即用每孔 200 μl 1 \times PBS 缓冲液室温小心洗涤一次。然后每孔加入 150 μl 新鲜配制的 4% 多聚甲醛固定缓冲液室温静置固定细胞 30 min。再加入每孔 200 μl 的 0.1% Triton X-100 缓冲液对固定化的细胞进行通透化处理 5 次,每次 5 min。

每孔加入 150 μl 含 1% BSA 的 PBS 缓冲液对细胞室温封闭 120 min。封闭完成后,每孔加入 50 μl 用 PBS 稀释的 MACF1 兔多抗室温温育 120 min。再在每孔中加入 200 μl 含 0.1% Tween-20 的 PBS 缓冲液洗涤细胞 5 次,每次 5 min。

每孔加入 50 μl 用 PBS 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗室温避光温育 120 min。再在每孔

中加入 200 μl 含 0.1% Tween-20 的 PBS 缓冲液避光洗涤细胞 5 次,每次 5 min。再在每孔中加入 100 μl 现配的 ELISA 底物使用液(含 0.5 ml 底物溶液、10 ml 底物缓冲液、0.8 μl 30% H_2O_2)于 37 $^\circ\text{C}$ 反应 30 min。最后在每孔中加入 50 μl ELISA 终止缓冲液(2 mol/L H_2SO_4 溶液)振荡片刻,将 96 孔培养板用 Synergy HT 多功能酶标仪在 450 nm 扫描检测,即可获得结果。

1.3 统计学分析

实验数据以均值 \pm 标准差表示,以 GraphPad Prism 5.0 数据统计软件进行统计学分析, $P < 0.05$ 认为具有显著性差异。

2 结果

2.1 In-cell Western 检测模拟失重环境对 MACF1 含量的影响

Odyssey 双红外成像系统以 700 nm 与 800 nm 双通道扫描两组样品,每组 5 个复孔,获得图像结果(图 1A)。使用 Odyssey 双红外成像系统自带的分析软件分别获取双通道扫描结果的荧光数值,然后用 800 nm 通道的荧光数值除以对应 700 nm 通道的荧光数值,所得的结果经统计软件 GraphPad Prism 5.0 进行分析。

磁悬浮条件下培养 24 h 后,实验组 MC3T3-E1 细胞中 MACF1 的含量(0.5463 \pm 0.0254)高于对照组(0.5324 \pm 0.0168),该结果说明模拟失重环境下 MC3T3-E1 细胞中 MACF1 的表达有增加的趋势,统计分析表明这种趋势的增加没有显著性的差异($P = 0.6599$) (图 1B)。

2.2 Cell ELISA 检测模拟失重环境对 MACF1 含量的影响

Synergy HT 多功能酶标仪在 450 nm 扫描检测四组样品,每组 4 个复孔,扫描所获得的数值结果经统计软件 GraphPad Prism 5.0 进行分析。

磁悬浮条件下培养 24 h 后,实验组 MC3T3-E1 细胞中 MACF1 的含量(1.4508 \pm 0.0110)明显高于对照组(1.2522 \pm 0.0367),两者之间的差异具有显著性($P = 0.0021$),该结果表明,模拟失重环境促进了 MC3T3-E1 细胞中 MACF1 的表达(图 2)。

3 讨论

3.1 In-cell Western 与 Cell ELISA 检测法的特点

与常规的 Western 印迹法相比,In-cell Western 和 Cell ELISA 检测法是在细胞原位检测目标蛋白质,

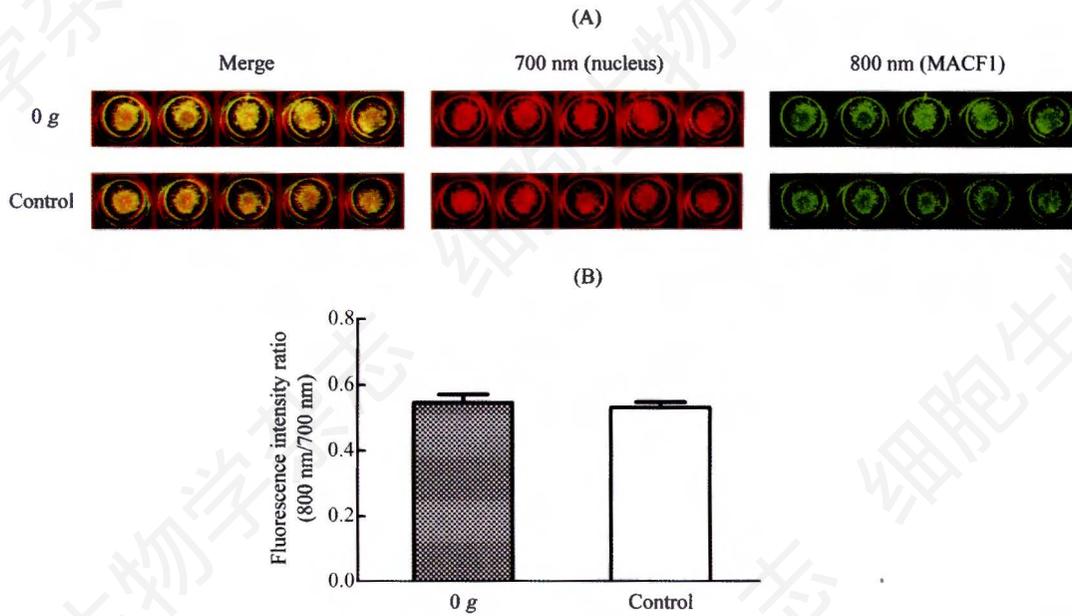


Fig.1 The effects of simulated weightlessness on the expression of MACF1 in MC3T3-E1 cells detected by In-cell Western using Odyssey Infrared Imaging System (A) and the results of statistic analysis (B)

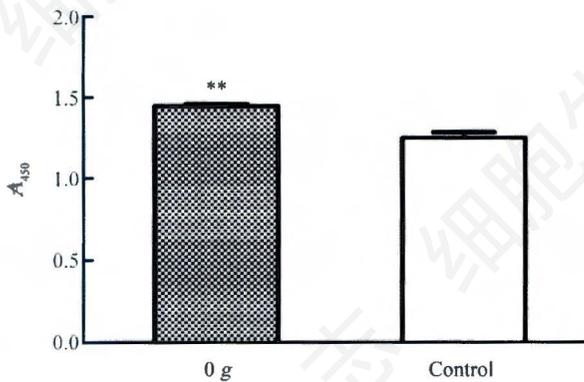


Fig.2 The effects of simulated weightlessness on the expression of MACF1 in MC3T3-E1 detected by Cell ELISA methods (** $P < 0.01$ vs control)

可用于 96 孔培养板或 384 孔培养板中细胞蛋白质的相对定量分析, 其所需时间短于 Western 印迹法, 而且还具有特异、灵敏及操作简便的特点。

In-cell Western 用红外标记的二抗直接标记细胞内的蛋白质, 可定量每个微孔内的总荧光量, 在分析过程中, 省略了细胞裂解物的制备、制胶、电泳以及转膜等这些费时又易于产生错误的步骤。In-cell Western 避免了细胞裂解过程的不稳定性和人工产物的干扰, 并且可同时进行多个样品的检测。在 Western 印迹法中, 往往使用蛋白质分子量标准(marker)作为定性判断目标蛋白质的基准, 同时使用一些管家基因编码表达的蛋白质作内参, 作为目标蛋白质相对定

量的依据。而在 In-cell Western 检测时, 使用细胞核酸的荧光标记物(例如 DRAQ5), 即以细胞数作为内参, 这样的内参选择其实更为合理, 因为某些管家基因编码表达的蛋白质在某些特殊的环境中也可能发生变化。

Cell ELISA 除了可极大地减少因裂解细胞获取总蛋白而造成的损失之外, 对于细胞中某些低丰度的蛋白质的检测也十分有利, 在 Cell ELISA 分析过程中, 通过酶与底物反应的级联放大作用, 可以将那些低丰度的蛋白质检测出来。

3.2 实验结果分析

从实验结果来看, In-cell Western 检测法利用 Odyssey 双红外成像系统的近红外探针, 提高了检测灵敏度, 可检测出蛋白质数量或者修饰化程度上的微小改变, 并且结合 Odyssey 双红外成像系统自带的分析软件分析最终的红外荧光图像可以直接获得双通道扫描结果的荧光数值, 使数据处理更加便捷。由 In-cell Western 检测 MACF1 的结果可见两个检测通道的荧光信号都较好, 而且每组内不同复孔间的荧光信号平行性也较好, 因此, In-cell Western 检测法完全适用于大分子量蛋白质 MACF1 的相对定量。

而 Cell ELISA 检测法则利用 Synergy HT 多功能酶标仪进行扫描直接获得实验数据, 因此可以直接对数据进行处理。由 Cell ELISA 检测 MACF1 的结果可见该方法灵敏度较高, 迅速简便, 每组内不同复孔

间的光吸收值平行性较好,因此,Cell ELISA 检测法完全适用于大分子量蛋白质 MACF1 的相对定量。

值得一提的是,由于In-cell Western与Cell ELISA 在实验原理、操作步骤及检测方式等方面都不尽相同,因此使用这两种检测法对相同目标蛋白质进行检测的结果可能会存在差异。

3.3 应用范围

一般情况下,蛋白质的分子量越大,在进行SDS-PAGE时PAGE胶的浓度就应该越低,但实际上PAGE胶的浓度不可能太低(胶的浓度越低,胶就越脆,操作时就越易碎)。而且进行SDS-PAGE时通常都会使用蛋白质marker进行定性分析,以判断电泳后目标蛋白质条带的最终位置,但常用的蛋白质marker最大分子量是200 kDa左右,如果目标蛋白质的分子量较大时(>400 kDa),则蛋白质marker将无法作为确定目标蛋白质最终位置的分子量标准。在进行这样的SDS-PAGE实验时,还有一个方法就是利用凝胶梯度混合器制备梯度PAGE凝胶,以保证大分子量蛋白质与蛋白质marker同时保留在PAGE胶中,但现在大多数实验室使用的都是小型凝胶系统(Mini-PROTEAN电泳槽),制备PAGE胶的体积仅约5 ml,而目前最小的凝胶梯度混合器的容积为15 ml,最小装液总量为6 ml,如果使用这种凝胶梯度混合器灌制PAGE胶,则会因液体量太少而导致凝胶梯度不均匀,最终影响电泳过程中蛋白质条带的分布。

对于大分子量蛋白质的相对定量,In-cell Western与Cell ELISA检测法由于不需要SDS-PAGE就可以对目标蛋白质进行检测,因此与常规的Western印迹法相比就更加具有优势。

同样地,对于贴壁生长的细胞,用Western印迹法检测细胞膜蛋白或细胞外基质蛋白时(如整合素、纤连蛋白等),往往会因为这些蛋白质与生长底物之间有直接或间接的连接而无法获得全部的目标蛋白质,但对于In-cell Western与Cell ELISA检测法则不存在这样的问题,目标蛋白质是在细胞被固定后于原

位进行检测,如此就显示出了这两种新方法在检测膜蛋白或细胞外基质蛋白时的优势。

然而,任何检测方法都有各自的适用范围和优缺点,In-cell Western与Cell ELISA检测的结果中也可能会有非特异性荧光(显色),对此可以通过更换识别目标蛋白不同表位的抗体或优化抗体的使用浓度等手段来降低非特异性荧光(显色)。此外,In-cell Western与Cell ELISA可能不适用于细胞核内或细胞器内蛋白质的检测。

综上所述,In-cell Western和Cell ELISA检测法快速灵敏,操作简便,而且能够同时检测多个样品,可适用于细胞骨架蛋白、细胞膜蛋白及细胞外基质蛋白等蛋白质的相对定量,特别是大分子量蛋白质的相对定量。另外,对于一些不具备Odyssey双红外成像系统的单位,采用Cell ELISA检测法廉价简便、结果可靠。

参考文献(References)

- [1] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 1970, 227 (5259): 680-685
- [2] Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76(9): 4350-4354
- [3] Sowell J, Strekowski L, Patonay G. DNA and protein applications of near-infrared dyes, *J Biomed Opt*, 2002, 7(4): 571-575
- [4] Chen H, Kovar J, Sissons S, et al. A cell-based immunocytochemical assay for monitoring kinase signaling pathways and drug efficacy, *Anal Biochem*, 2005, 338(1): 136-142
- [5] Abdillahi H, Poolman JT. Whole-cell ELISA for typing *Neisseria meningitidis* with monoclonal antibodies, *FEMS Microbiol Lett*, 1987, 48(3): 367-371
- [6] Erdile LF, Smith D, Berd D. Whole cell ELISA for detection of tumor antigen expression in tumor samples, *J Immunol Methods*, 2001, 258(1-2): 47-53
- [7] 赛爱荣, 胡丽芳, 商澎. 微管微丝交联因子1的结构与功能, *细胞生物学杂志*, 2008, 30(4): 187-190
- [8] Qian AR, Yin DC, Yang PF, et al. Development of a ground-based simulated experimental platform for gravitational biology, *IEEE Trans Appl Supercond*, 2009, 19(2): 42-46

Application of In-cell Western and Cell ELISA for Relative Quantification of Large Molecular Weight Protein

Xiang Gao, Ai-Rong Qian, Jing-Bao Li, Peng Shang*

(Key Laboratory for Space Biosciences and Biotechnology, Faculty of Life Sciences, Institute of Special Environmental Biophysics, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, China)

Abstract The purpose of this study is to discuss two new methods, In-cell Western and Cell ELISA, which are used to relatively quantify the large molecular weight proteins. Cultured cells were fixed *in situ*, permeabilized, blocked, and then primary antibody for the aim protein and secondary antibody labeled by IRDye™ 800 or horseradish peroxidase (HRP) were added respectively. The aim proteins were relatively quantified using Infrared Imaging System or Multi-Mode Microplate Reader. The expression of microtubule actin cross-linking factor 1 (MACF1), a cytoskeleton related protein of large molecular weight, was detected by the two methods in osteoblast. The results of both In-cell Western and Cell ELISA showed that the expression of MACF1 was increased under simulated weightlessness environment. With the advantages of sensitivity, rapidity, and convenience, In-cell Western and Cell ELISA are therefore useful two new methods to relatively quantify the large molecular weight proteins.

Key words In-cell Western; Cell ELISA; large molecular weight protein; relative quantification

Received: May 11, 2009 Accepted: October 27, 2009

This work was supported by the National High-Tech Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2008AA12A218) and the National Natural Science Foundation of China (No.30840030, No.30970706)

*Corresponding author. Tel: 86-29-88460391, Fax: 86-29-88491671, E-mail: shangpeng@nwpu.edu.cn

本刊将于 2010 年 2 月更名为《中国细胞生物学学报》

经新闻出版总署批准,《细胞生物学杂志》将于 2010 年第一期(2010 年 2 月)起更名为《中国细胞生物学学报》。更名后的《中国细胞生物学学报》作为中国细胞生物学学会会刊、旗下唯一的中文期刊,将继续坚持“提高与普及兼顾”的办刊方针,邀请著名专家撰文介绍国内外细胞生物学研究热点,扩大研究论文的刊登比例,提高综述文章的质量,增加介绍细胞生物学领域的新技术、新方法以及细胞生物学教学方面的文章;宣传和报道我国细胞生物学领域的最新进展,中国细胞生物学学会(包括会员)及各省市细胞生物学学会(包括会员)的各种活动和信息,竭诚为广大会员及从事细胞生物学研究的科研人员服务,使《中国细胞生物学学报》成为国内生命科学领域领先的中文期刊。