

如何利用ScanLater免疫蛋白印迹技术 对未知蛋白进行定性分析和定量检测

简介

今天在制药和临床研究领域中对某种蛋白进行检测是整个流程中重要环节，Western Blot（蛋白免疫印迹技术）也是最常见的蛋白检测手段，多种技术方法都可以对膜上的蛋白质进行定量检测，包括荧光法和化学发光法。然而，每种技术手段都有自身的局限性，尤其目前多数研究都急需提高蛋白定量的准确性和动态学范围。这里我们介绍一种全新技术用于Western Blot检测的系统，此系统所需检测仪器为SpectraMax® i3和SpectraMax® Paradigm多功能微孔板检测系统。此篇介绍文章中我们将展示其优势，包括降低背景噪音后带来的超宽动态学范围、以及具有多次检测后依然稳定不变的信号强度值。此外，对比与传统发光检测方式，Scanlater优化了其检测的灵敏度。

检测试验

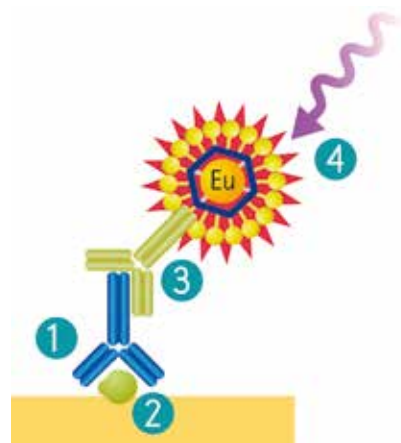
ScanLate® Western Blot检测系统流程与传统经典方式类似，包括制胶、转印直到二抗孵育，将转印蛋白的膜与铕元素标记的二抗或铕元素标记的生物素进行孵育，这些二抗可以与特异性的一抗结合，而这些一抗可与膜上感兴趣的蛋白相互结合(图一)；

成像利用铕元素具有1ms荧光半衰期的时间分辨荧光(TRF)特性进行检测，这样可以大大降低背景自发光和其它短半衰期荧光信号的干扰，显著降低背景信号值。如此方式不会出现化学发光和普通荧光检测时的过曝现象，所以通过此系统进行Western Blot检测时可获得更加锐利的条带和更高的成像质量。

此方法也不涉及对酶分子的检测，同时也利用了铕元素很强的抗光漂白特性。因此，信号在数星期和数月内均稳定可检测。稳定的信号输出可以多次重复检测该膜均可获得一致精确的结果。全新的ScanLater Western Blot检测系统简单、灵活、灵敏，是基于微孔板检测平台之上的蛋白定量检测分析系统。

优势

- 秉承传统Western blot经典流程，仅在孵育二抗时选用特殊标记抗体
- 无须任何底物
- 时间分辨荧光染料分子作为二抗标记物，增加检测动态学范围、降低荧光背景值
- 光子计数模式稳定收集TRF信号
- 铕元素抗光漂白同时具有很高稳定性，数星期内信号强度不变，并且保证膜多次扫描检测



图一：ScanLate® Western Blot检测流程 (1) 一抗识别膜上蛋白 (2) 铕元素标记的二抗与一抗结合 (3) 结合二抗通过ScanLater TRF Western Blot检测卡盒进行扫描成像。

SoftMax Pro 软件分析 Western Blot数据

以下所有实验数据均出自于ScanLater Western Blot与SpectraMax i3或SpectraMax Paradigm多功能微孔板检测系统整合后，利用了微孔板检测系统这个平台，使其具有了许多独一无二的优势。首先，数字光子计数模式使得TRF原始信号值无需转换。成像结果可以存储于SoftMax Pro软件中直接进行优化分析。原始计数结果也可以直接输出至Excel表格中进行分析 and 定量处理。或许直接输出至Image J软件中进行分析。

灵敏度和动态学范围

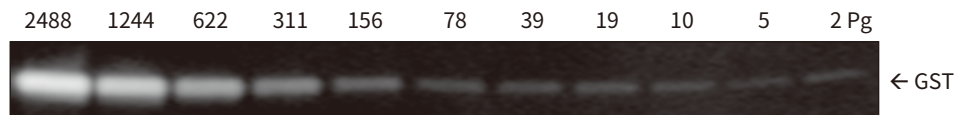
灵敏度和动态学范围的检测利用了谷胱甘肽转移酶(GST)作为研究对象，三倍体系的梯度稀释于1X缓冲液中，上样于4-20%的梯度胶中加电压分离30分钟。蛋白转印至荧光膜上后用生物素标记的兔抗GST探针分子进行孵育2小时，然后在与铈元素标记的链霉亲和素孵育1小时，膜清洗干燥后，使用SpectraMax Paradigm微孔板检测平台进行检测(图二)。系统检测结果展示其亚皮克级别检测灵敏度，超过4数量级的动态学范围(图三)。

信号稳定性

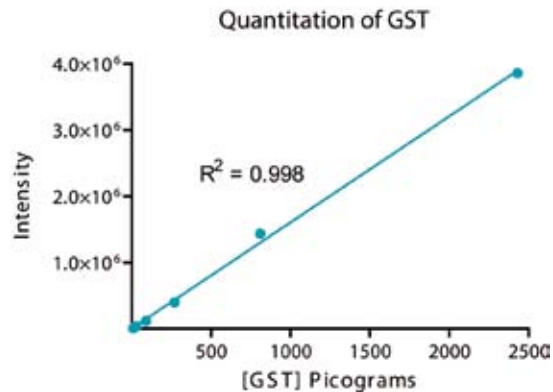
铈元素最特有的优势在于信号稳定性高和抗光漂白性强。膜放置数月后进行检测信号值依然稳定(图四和图五)。

多次膜扫描检测后 信号强度无损失

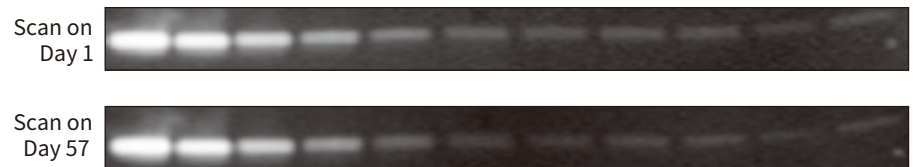
转铁蛋白经过两倍连续稀释于1X样品缓冲液后上样于4-20%梯度胶后稳压30分钟。转印目标蛋白于荧光膜上，使用兔抗转铁蛋白一抗孵育2小时，随后使用铈元素标记的抗兔IgG孵育1小时。膜清洗、干燥和使用SpectraMax Paradigm多功能微孔板检测平台重复七次进行扫描(图六)。



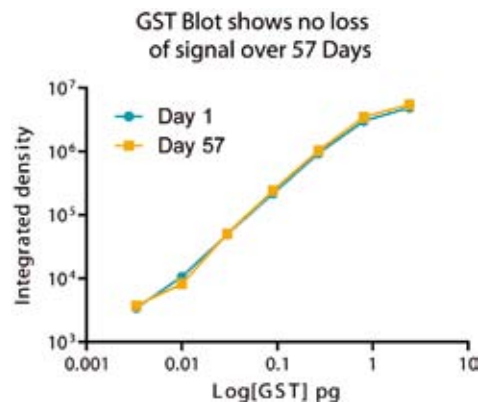
图二：GST梯度稀释后利用SpectraMax Paradigm检测结果。



图三：整和单独条带的信号强度值，将数据导出至Excel进行分析获得4个数量级动态学范围，线性范围可达3个数量级。



图四：铈元素标记后信号稳定性高和抗光漂白性强。

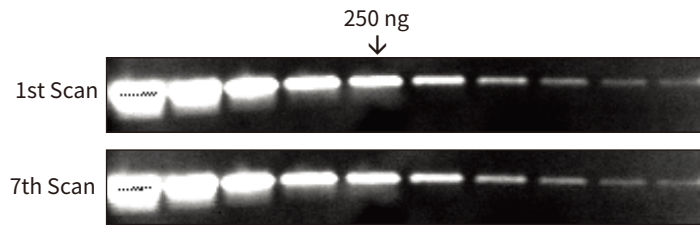


图五：以荧光平均强度值Vs皮克级别的GST含量作图比较，信号强度在57天后依然稳定。

与化学发光Western Blot法比较

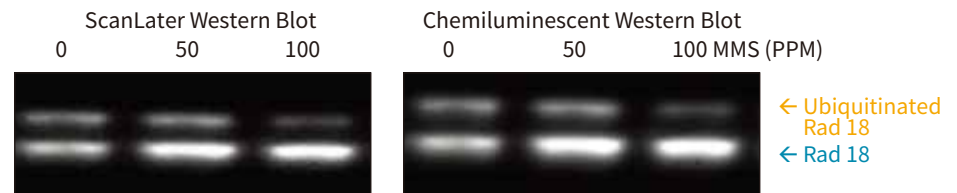
用0,50和100ppm不同浓度的甲基磺酸甲酯(MMS),即是一种致癌物质可导致DNA损伤,处理HEK293T细胞。抽提(80ug)细胞蛋白跑胶,转膜后使用鼠源anti-Rad18抗体进行孵育,二抗分别选用镧元素标记的抗鼠抗体或辣根过氧化物酶标记的抗鼠抗体(HRP化学发光底物选用Millipore产品 cat.on.WBKLS0500)。

已知Rad18是在DNA损伤修复过程中发挥作用的重要一种蛋白,目前有两种形式存在,泛素化和非泛素化形式。如图七所示经过MMS处理后的细胞其泛素化的Rad18含量降低而非泛素化的Rad18含量明显增加。荧光检测时使用SoftMax Pro软件收集膜上信号后直接输出信号至Excel中进行分析,化学发光时使用Alphainnotech化学发光成像设备检测膜上信号。ScanLater膜定量分析结果如图八所示,清洗分辨出随着MMS含量增加其Rad18蛋白增加和泛素化Rad18蛋白的减少,这种相关变化一目了然。



250 ng	Area	Mean	Integrated Density
Scan 1	261	8678	2264874
Scan 7	261	8609	2247047

图六: 经过多次扫膜后信号强度稳定、重复检测信号值不变。

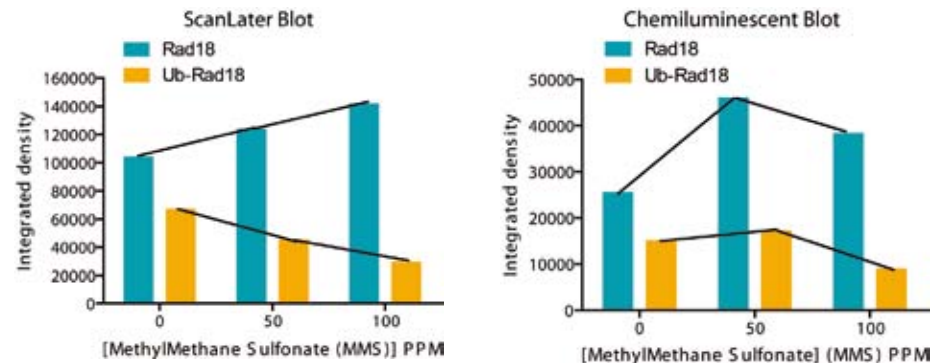


图七: 比较两种方式进行内源性泛素化形式的Rad18蛋白的检测结果如上图所示。

结论:

本文中介绍的ScanLater Western Blot技术,用户可以按照如下流程来优化自己的应用,其次,镧元素标记的二抗因为具有时间分辨荧光优势特点即其大大降低背景噪音,当在SpectraMax i3 或SpectraMax Paradigm多功能微孔板检测平台上进行检测时,通过仪器自带的SoftMax Pro 软件可以方便导出Excel或ImageJ中进行分析。

ScanLater Western Blot检测技术可以在蛋白定量检测时达到4个数量级的动态学范围,线性动态学范围可以达到3个数量级,多次扫描后其信号不变。所以我们可以发现ScanLater Western Blot系统是一种简单、灵敏、稳定性高的检测平台,可以在基于多功能微孔板检测系统上具有出色的蛋白定量分析能力。



图八: 使用ScanLater方式可检测出伴随着MMS梯度增加,其泛素化Rad18蛋白含量规律性的降低和非泛素化Rad18含量规律性的增加,可以发现ScanLater方法获得检测结果与经典化学发光方法比较具有一样的灵敏度,但是表现出更高的精确度。



扫一扫关注我们的官方微信