

低丰度蛋白的免疫印迹检测

在进行蛋白免疫印迹实验时，低丰度蛋白或少量样本中的蛋白检测可能是一大挑战。靶标丰度较低的原因可能是蛋白本身在样本中的表达水平较低或难以提取（因此得率较低），或者样本量有限（可用于凝胶上样的总体积较小），或是多种因素的组合。在这种情况下，成像步骤获得的条带通常会信号微弱，有时甚至不可见，使得数据分析无法获得结论。从而导致实验人员必须花更多时间和资源来重复实验或重新优化条件。本指南讨论了从蛋白样本制备到免疫检测的步骤中，能帮助克服这个挑战并改善低丰度蛋白的信噪比的具体手段，从而实现更成功的蛋白免疫印迹检测。

通过蛋白免疫印迹检测低丰度靶标时，信号强度对于得出可靠的科学结论至关重要。以下几个关键因素有助于实现低丰度靶标的高质量检测：

- 高质量蛋白提取
- 高效蛋白电泳分离
- 高效均一的蛋白转印
- 一抗特异性
- 提高印迹检测灵敏度
- 高分辨率图像采集

蛋白提取



- 使用针对样本来源和靶蛋白定位优化的抽提试剂可以实现高效提取。
- 为防止蛋白样本降解，应使用**广谱蛋白酶抑制剂**

并非所有的蛋白都容易提取，低提取效率会导致蛋白量不足，从而难以在下游蛋白免疫印迹中检测到靶标。蛋白提取方法应根据样本的来源和目标蛋白在细胞内的位置而选择。为了从组织、细胞或亚细胞组分中获得高蛋白产量，推荐使用针对哺乳动物、细菌、酵母、昆虫（杆状病毒）和植物样本优化的试剂。为避免蛋白降解，请在提取和裂解物制备过程中添加**广谱蛋白酶抑制剂**，来保护您的蛋白完整性。

推荐的蛋白酶和磷酸酶抑制剂

Thermo Scientific™ 抑制剂Cocktail	形式	组分
Halt™蛋白酶抑制剂Cocktail	浓缩液	AEBSF-HCl、抑肽酶、苯丁抑制素、E-64、亮抑酶肽、EDTA*
Pierce™蛋白酶抑制剂片剂	速溶片剂	
Halt™蛋白酶和磷酸酶抑制剂Cocktail	浓缩液	抑肽酶、苯丁抑制素、E-64、亮抑酶肽、氟化钠、原钒酸钠、β-甘油磷酸、焦磷酸钠、EDTA*
Pierce™蛋白酶和磷酸酶抑制剂片剂	速溶片剂	

*可提供不含EDTA的配方。

各样本类型的推荐蛋白提取试剂概览

样本类型	目标	推荐的Thermo Scientific™试剂或试剂盒
哺乳动物细胞或组织	总蛋白提取	• RIPA裂解液 • M-PER哺乳动物蛋白提取试剂 • T-PER组织蛋白提取试剂 • N-PER神经元蛋白提取试剂
培养的哺乳动物细胞或组织	亚细胞分离或细胞器分离	• NE-PER核蛋白和胞浆蛋白提取试剂 • 亚细胞蛋白分离试剂盒 • Pierce细胞表面蛋白分离试剂盒 • GPCR提取和稳定试剂 • Syn-PER突触蛋白提取试剂 • 线粒体分离试剂盒 • 组织和培养细胞溶酶体富集试剂盒
细菌细胞	总蛋白提取	• B-PER Complete细菌蛋白提取试剂
酵母细胞		• Y-PER酵母蛋白提取试剂
昆虫细胞（杆状病毒）		• I-PER昆虫细胞蛋白提取试剂

蛋白电泳分离



要获得最佳条带分辨率：为您的蛋白靶标选择合适的凝胶体系

Bis-Tris体系：6–250 kDa
Tris-乙酸体系：40–500 kDa
Tricine体系：2.5–40 kDa

低丰度靶标的有效分离能帮助靶蛋白在免疫印迹步骤中与抗体充分结合，因此对确保靶蛋白的检测至关重要。实现理想电泳分离的关键是为您的靶蛋白选择合适的凝胶。凝胶体系的选择取决于要分离的蛋白大小。通常，靶蛋白的迁移距离应大致为凝胶长度的70%，以获得最佳分辨率（图1）。有两种凝胶体系非常适合宽范围的蛋白分离，分别是Bis-Tris和Tris-甘氨酸。然而，Tris-甘氨酸凝胶的碱性pH运行环境会导致蛋白修饰。Bis-Tris凝胶可提供比Tris-甘氨酸凝胶更高的蛋白检测灵敏度。因为Bis-Tris凝胶具有中性pH运行环境，通过最大限度地减少蛋白修饰或降解来保持蛋白完整性，从而获得更佳条带分辨率。

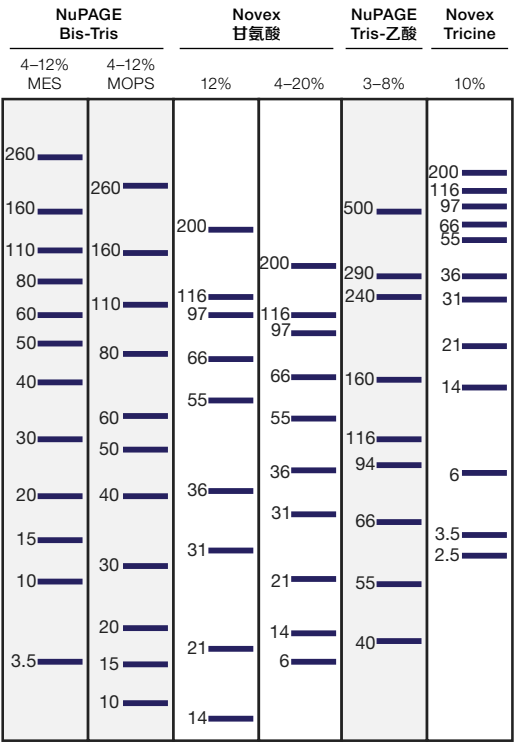


图1.根据靶蛋白分子量选择符合您研究需求的凝胶体系。靶蛋白的迁移距离应大致为凝胶长度的70%，以获得最佳分辨率。

Tris-乙酸或Tricine凝胶分别适用于高分子量或低分子量蛋白的研究。在Tris-甘氨酸和Bis-Tris凝胶中, 高分子量蛋白会被压缩到凝胶上方的狭窄区域, 而在Tris-乙酸凝胶中则可进一步迁移。分辨率的提高实现了转印效率和灵敏度的改善。

在Bis-Tris或Tris-甘氨酸凝胶上运行的低分子量蛋白容易迁移到过于靠近凝胶底部的位置, 从而影响了其分辨率(图2)。使用Tricine凝胶有助于确保蛋白在凝胶中的理想迁移距离, 从而在后续的免疫印迹步骤中能够清晰地分辨。

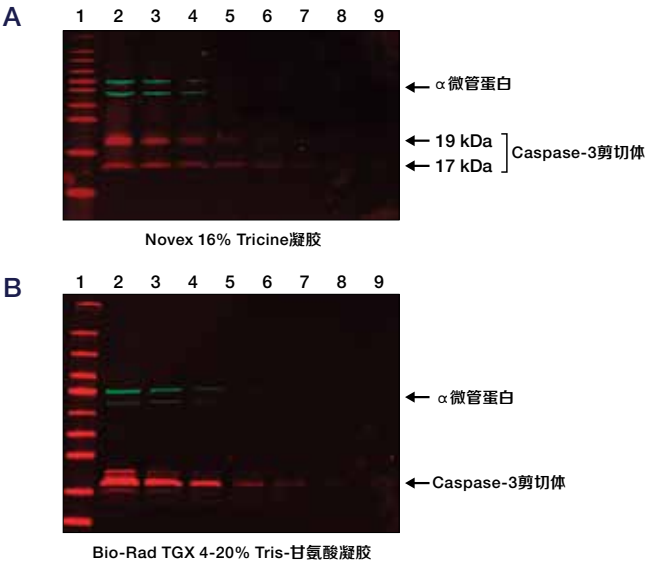


图2.Tricine凝胶具有更理想的低分子量蛋白分辨率。(A) 使用Novex 16% Tricine凝胶分离caspase-3剪切体的17 kDa和19 kDa条带, 而(B) Bio-Rad™ TGX™ Tris-甘氨酸凝胶无法实现相同的分辨率。

蛋白转印

- 为获得最佳转印效率, 可使用中性pH凝胶, 例如Bis-Tris (6-250 kDa) 或Tris-乙酸 (40-500 kDa) 凝胶。
- 为减少操作的不一致性, 可使用即用型转印膜组。

蛋白转印效率易受凝胶体系和转印方法的影响。选择合适的凝胶是成功转印靶蛋白的关键因素。一种常用的凝胶是4-20% Tris-甘氨酸凝胶, 它可以有效分离不同大小的蛋白。然而, 高分子量蛋白会被压缩在凝胶顶部的狭窄区域, 从而

降低转印效率(图3)。选择能够充分分离靶蛋白的凝胶将有助于转印。此外, 与运行环境为碱性的Tris-甘氨酸凝胶相比, Bis-Tris和Tris-乙酸等中性pH凝胶具有更高的转印效率。中性pH环境可将蛋白降解概率降至最低, 并使蛋白从凝胶中更完整地移出。在分离和转印低丰度蛋白时, 保持蛋白完整性尤为重要。

想成功转印并最终检测到低丰度蛋白, 有几种转印方法可选。传统湿转方法可实现高效转印, 但需要大量的时间和手动操作。这种传统的自制转印膜组的组装更有可能出现处理不一致的情况, 从而影响了转印效率。半干转的速度更快且便捷性更高, 但在转印高分子量蛋白(>300 kDa)时的效率略低。干转方法可实现高质量转印, 并兼顾速度和便捷性。用于干转的即用型膜组无需预制缓冲液或浸泡滤纸和膜, 可最大限度地减少处理步骤中导致性能不一致的影响因素。在干转系统中使用的铜阳极不会通过电解水产生氧气, 从而提高了转印一致性, 并提供与湿转相当或更佳的性能。

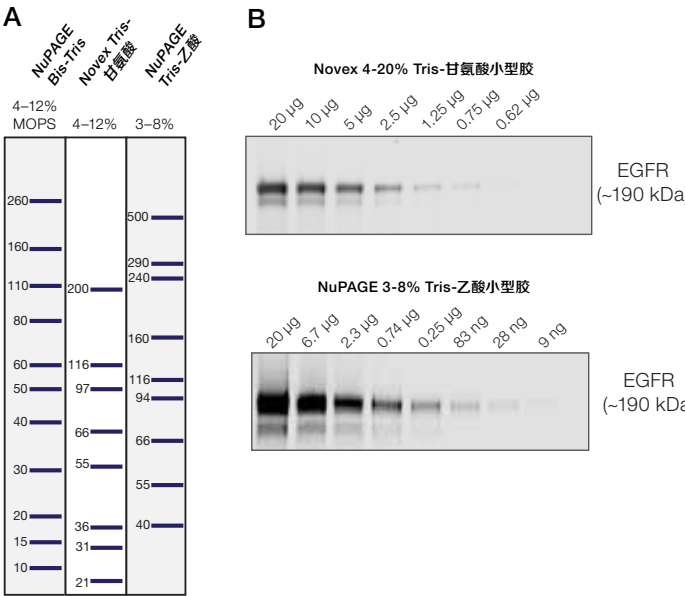


图3.优化高分子量蛋白的转印可提高蛋白免疫印迹检测的灵敏度。(A) 4-12% Bis-Tris凝胶、4-12% Tris-甘氨酸凝胶和3-8% Tris-乙酸凝胶的迁移模式。(B) A431裂解物中EGFR的蛋白免疫印迹分析。在Invitrogen™ Novex™ 4-20% Tris-甘氨酸和NuPAGE™ 3-8% Tris-乙酸凝胶上分离裂解物。Tris-乙酸凝胶的使用提高了EGFR的检测灵敏度。

抗体特异性



为获得理想检测结果, 应使用经过特异性验证和确认, 且适用于蛋白免疫印迹应用的抗体。

为确保从靶蛋白中获得强度理想的信号, 应选择供应商进行过靶标特异性验证和确认的抗体。此外, 应使用专门用于蛋白免疫印迹的抗体或将蛋白免疫印迹列入适用范围的抗体。这有助于确保所选抗体对您的靶蛋白具有高灵敏度和特异性。

印迹检测



为提高印迹检测灵敏度, 应使用高灵敏度的化学发光底物, 如SuperSignal West Atto极敏底物。

为达到更高的检测灵敏度, 应使用化学发光HRP体系。在所有蛋白免疫印迹检测方法中, 化学发光法具有最高的灵敏度水平。HRP相对较小, 这使得每个IgG分子能够结合更多的HRP分子, 从而提供比碱性磷酸酶 (AP) 系统更高的灵敏度。此外, HRP化学发光底物的发展和性能提升也使其比其他蛋白免疫印迹检测系统具有更高的灵敏度。经过优化后, 化学发光系统可实现低至阿克级水平的检测。

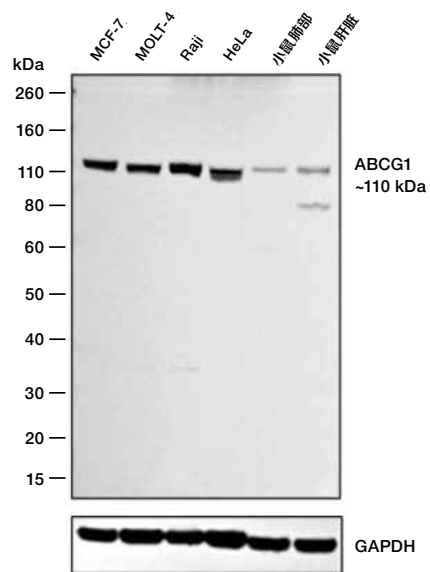


图4.蛋白免疫印迹抗体验证。*通过蛋白免疫印迹检测ABCG1重组兔单克隆抗体 (货号MA5-24857) 在多种细胞系中识别ABCG1的能力, 以确认该抗体用于蛋白免疫印迹的有效性。

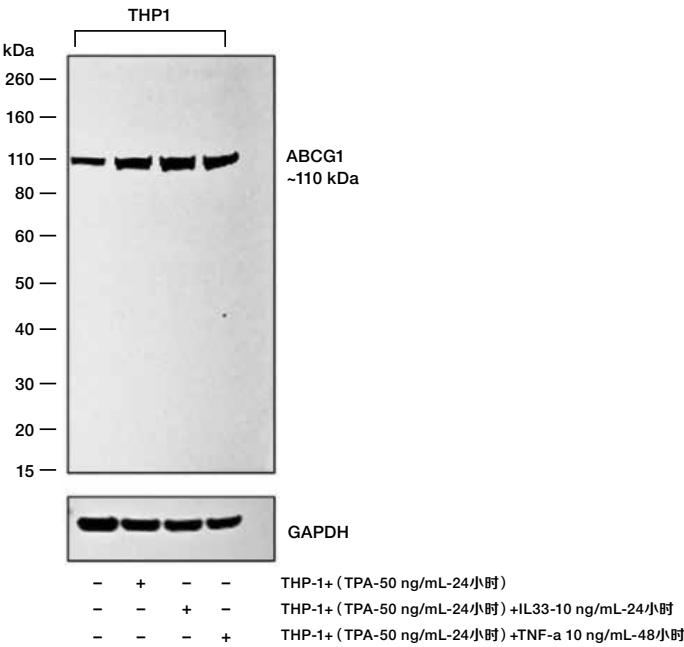


图5.抗体特异性验证。*通过细胞处理确认抗ABCG1抗体的特异性, 以确保抗体与所述抗原结合。细胞处理后蛋白表达的改变证明了抗体特异性。使用ABCG1重组兔单克隆抗体 (2A10) (货号MA5-24857) 的蛋白免疫印迹结果表明, 与泳道1中未经处理的THP-1细胞相比, 经泳道2中的TPA (24小时)、泳道3中的TPA (24小时) 和IL-33 (24小时) 以及泳道4中的TPA (24小时) 和TNF-alpha (48小时) 处理后的THP-1细胞中的ABCG1表达量增加。

* “验证”一词或其衍生词仅指用于功能测试的科研用途抗体, 旨在确认该抗体是否可用于指定的研究技术。其不能确保产品已经过临床或诊断用途确认。

与蛋白免疫印迹系统中的其他组分一样，化学发光HRP底物的选择很多。高灵敏度底物，如Thermo Scientific™ SuperSignal™ West Atto极敏底物，适用于对灵敏度要求高的WB检测，其灵敏度为常规底物的三倍以上（图6）。SuperSignal West Atto极敏底物是一种增强型超灵敏化学发光（ECL）底物，可实现高阿克级（ag）水平的蛋白检测，是检测极低丰度靶标或上样量有限的珍贵样本，需要最高灵敏度时的理想选择（图7）。

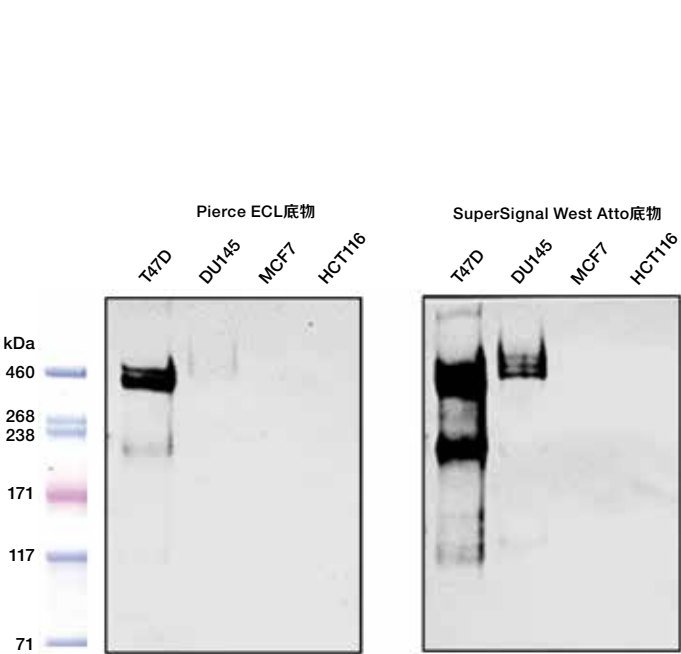


图6.高灵敏度底物可优化低丰度蛋白的检测。膜结合蛋白或核表达蛋白（如粘蛋白1，MUC1）的错误折叠和疏水性使其难以提取，导致可用于蛋白免疫印迹检测的蛋白量较低。MUC1的分子量可在250到500 kDa之间变化，具体取决于糖基化程度。使用SuperSignal West Atto极敏底物和Thermo Scientific™ Pierce™ ECL底物检测多种具有不同MUC1糖基化程度的细胞系中的粘蛋白。SuperSignal West Atto底物能够检测到高于460 kDa和低于200 kDa的低糖基化MUC1，而Pierce ECL底物无法实现该水平的检测。

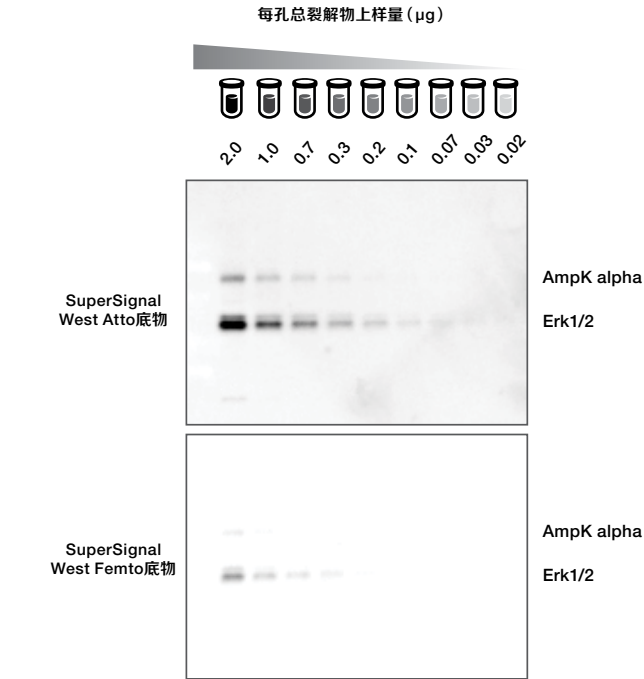


图7.SuperSignal West Atto极敏底物可检测极低浓度的靶蛋白。使用SuperSignal West Atto极敏底物和SuperSignal West Femto超敏底物检测HeLa细胞裂解物中的AmpK alpha和Erk1/2。SuperSignal West Atto底物能够在较低的样本上样量下充分检测AmpK alpha和Erk1/2，而SuperSignal West Femto底物检测需要更高的样本上样量。

图像采集



为获得宽动态范围和最佳曝光结果, 应使用数字成像系统采集蛋白免疫印迹图像。

在信号检测方面, 数字成像系统具有最宽的动态范围, 并且能轻松确定检测低丰度蛋白的最佳曝光条件。随着相机性能的升级和成像软件的发展, 使用传统X光胶片来采集信号的局限性越来越明显。电荷耦合器件 (CCD) 相机基于光敏硅芯片, 可将光子转换为数字信号。芯片设计的改进促进了灵敏的冷CCD相机的开发, 实现了优于X光胶片的光捕获性能。Invitrogen™ iBright™ 成像系统等仪器采用性能强大的高分辨率冷CCD相机, 能够以比X光胶片更高的灵敏度、线性度和动态范围进行蛋白免疫印迹的采集和分析。相比于iBright成像系统和其他同类16位CCD相机, X光胶片的动态范围仅为1.5个数量级, 而iBright最多可显示4个数量级的动态范围 (图8)。更宽的动态范围使得在捕捉弱信号条带的同时可以采集强化学发光信号。对参考光度计板的成像结果表明, 与传统X光胶片相比, iBright成像系统具有更宽的信号动态范围 (图8)。

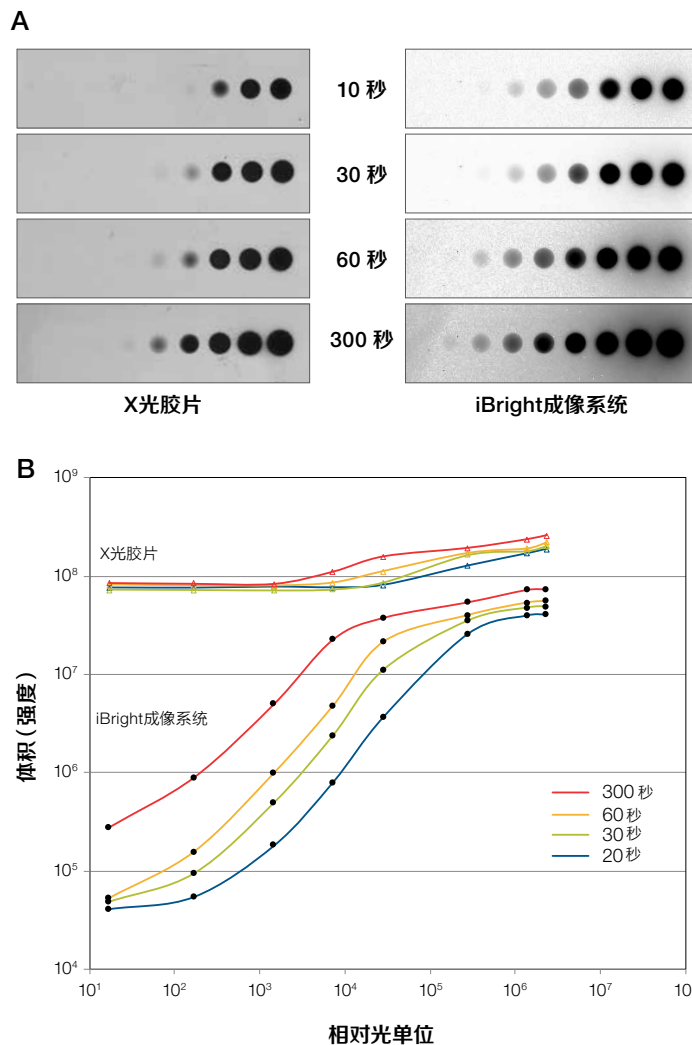


图8.X光胶片和iBright成像系统的图像灵敏度和动态范围比较。(A) 在3×3像素组合下, iBright成像系统上参考光度计板的图像显示出比X光胶片更高的灵敏度。(B) 对参考光度计板的图像分析表明, 与X光胶片相比, 使用iBright成像系统可获得更宽的信号动态范围。

获取更多蛋白免疫印迹技巧和方案, 请浏览
thermofisher.cn/westerneducation



赛默飞
官方微信



赛默飞
生命科学小助手

免费服务电话: 800 820 8982/400 820 8982
信息咨询邮箱: LifeScience-CNTS@thermofisher.com
www.thermofisher.cn

ThermoFisher
SCIENTIFIC