

利用蛋白质免疫印迹标准化实现相对定量

简介

将蛋白质免疫印迹与先进的数字成像相结合, 已成为一种功能强大的检测蛋白质丰度和蛋白质修饰的工具。使用最新的成像软件和高灵敏度仪器, 现已可以更轻松地实现蛋白质免疫印迹相对定量。

标准化是获得可靠且可重复的定量蛋白质免疫印迹结果的关键步骤。在理想状态下无需进行标准化, 但诸如上样和转印效率等因素的存在, 使得标准化成为蛋白质免疫印迹的基本步骤。本技术说明提供了使用内参蛋白进行标准化的基本原理, 并介绍了如何准确地进行蛋白质免疫印迹标准化, 以获取有意义且可重复的数据。本文中的所有成像数据均采用 Invitrogen™ iBright™ FL1000 成像系统完成。

使用管家蛋白 (也称内参蛋白、内部上样对照) 进行标准化

使用管家蛋白是蛋白质免疫印迹标准化实验的一个重要组成部分。由于各种原因, 并非全部管家蛋白均可用于所有生物学检测系统中的标准化研究。管家蛋白的选择主要取决于目的蛋白。例如, 如果使用化学发光或单色荧光系统, 则管家蛋白不

应干扰靶点的检测 (如分子量相当)。在开始标准化前, 必须先评估管家蛋白的定量准确性和动态范围, 然后再进行蛋白质免疫印迹标准化。获取的管家蛋白信号应在较宽的浓度范围内保持线性, 这样方可作为可靠的标准化参照。

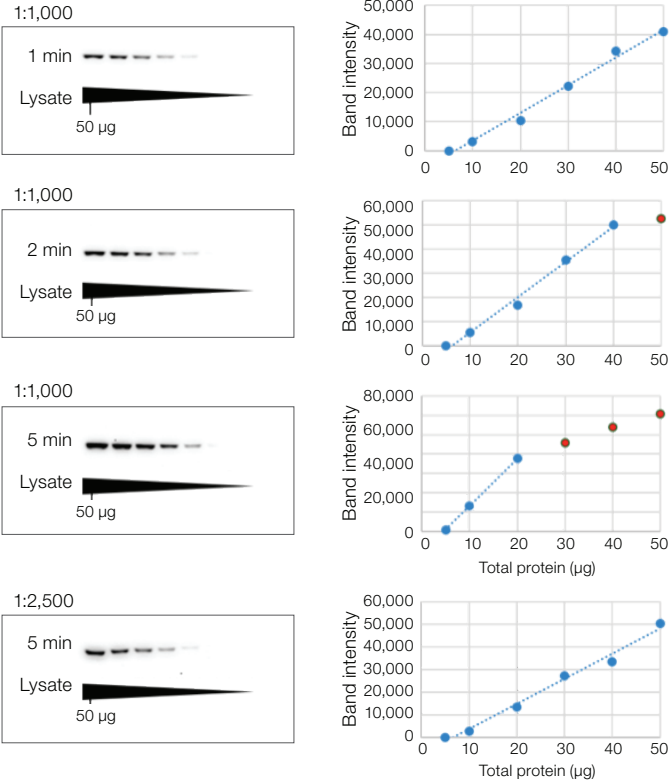
先决条件1: 确定连续稀释的管家蛋白的线性范围

使用内部上样对照的关键是确保其在线性范围内, 可理解为在膜上的蛋白质数量与信号强度呈线性关系的信号强度范围内。可使用连续稀释的细胞或组织提取物, 评估管家蛋白的线性范围。

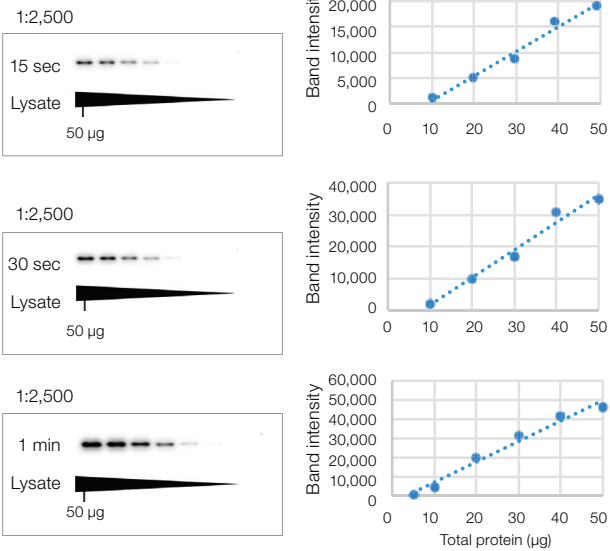
例如, 使用2倍连续稀释的HeLa细胞提取物(起始材料为 50 μ g裂解液)检测5种常见的管家蛋白(β -tubulin、cyclophilin B、GAPDH、 β -actin和热休克蛋白90 α (HSP90 α) 的可用性和线性范围。改变一抗浓度和曝光时间, 重复进行免疫印迹并分析 (图1和2)。

在上述实验条件下, 使用1分钟曝光时间和1:1,000的一抗稀释度, β -tubulin信号的线性范围可达50 μ g HeLa细胞裂解物 (图 1)。但是, 使用同样的一抗稀释度, 将曝光时间延长到2和5分钟, 会导致在高总蛋白浓度条件下出现信号饱和。饱和的条带信号无法准确定量并用于标准化, 因为检测的信号量与相应条带中的蛋白量无直接成比例关系。此时, 曝光时间较长时, 提高一抗稀释度 (1:2,500) (降低浓度) 可以去除 β -tubulin的过饱和, 重回线性范围。

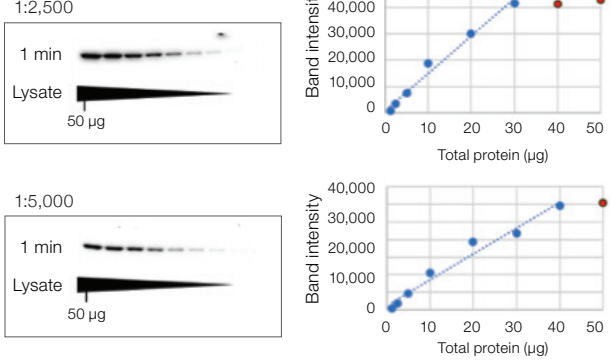
β -tubulin



Cyclophilin B



GAPDH



β -actin

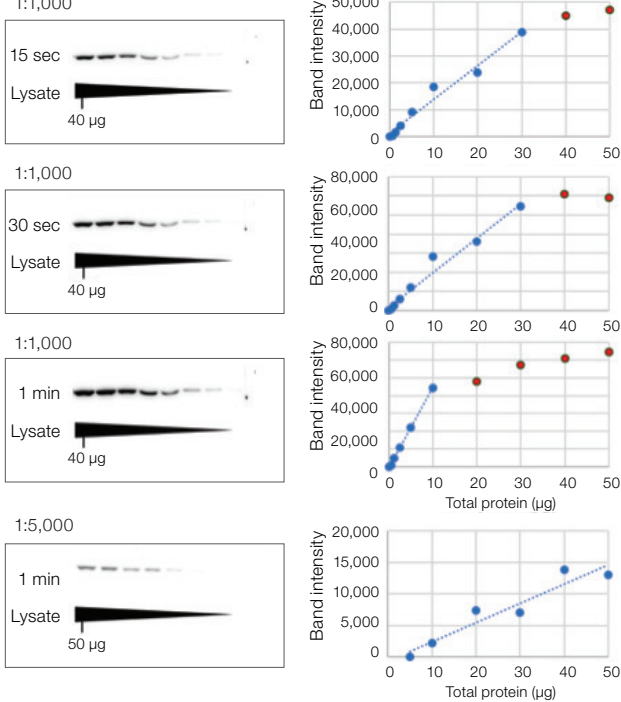


图1. HeLa细胞提取物中管家蛋白 β -tubulin, cyclophilin B, GAPDH 和 β -actin的线性度与饱和。各图中, 位于线性范围以内的点显示为蓝色, 线性范围以外的点显示为红色。

由于不同蛋白质的线性范围取决于其丰度和实验条件, 因此特定的实验体系中使用的一抗浓度应取决于需要定量的靶点——必须与管家蛋白相同的线性范围内检测靶蛋白。例如, 如果靶蛋白丰度较低, 需要较长的曝光时间, 则可能要降低管家蛋白的一抗浓度。还应注意的是, 如果使用不同的细胞或组织, 也会改变蛋白质的线性范围。

检测HeLa细胞提取物中的其他常用的管家蛋白, 如cyclophilin B、GAPDH、 β -actin, 可以观察到不同的线性范围 (图1)。对于cyclophilinB, 信号的线性范围可达50 μ g总蛋白, 与曝光时间无关。当一抗浓度为1:2,500时, GAPDH信号的线性范围可达30 μ g, 当抗体浓度降至1:5,000时, 线性范围可提高至40 μ g。同样, 当一抗稀释度为1:1,000时, β -actin的动态范围相对较窄, 但将一抗浓度降至1:5,000时, 动态范围可增加至50 μ g总蛋白。

本研究中使用效果较差的HeLa细胞提取物的管家蛋白是HSP90 α (图2)。在本例中, HSP90 α 的检测信号过高, 且快速达到饱和, 不适合实验使用的系统。其线性范围 (动态范围) 相对较窄, 且在较高的总蛋白浓度下迅速变为双曲线, 这使得其在标准化过程中容易出错, 即使是在提高一抗稀释度的情况下。

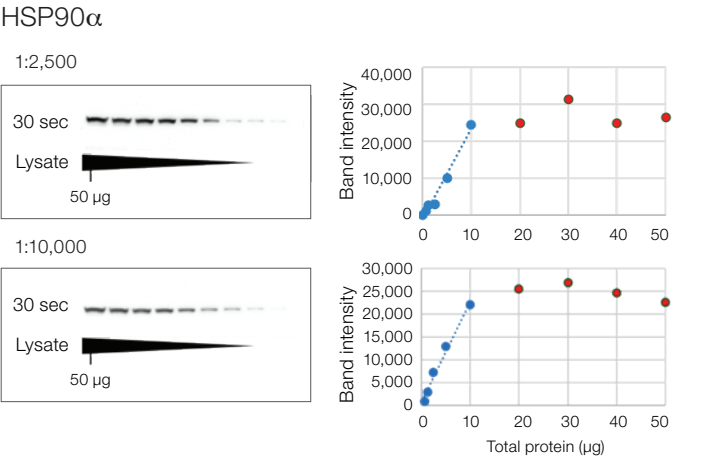
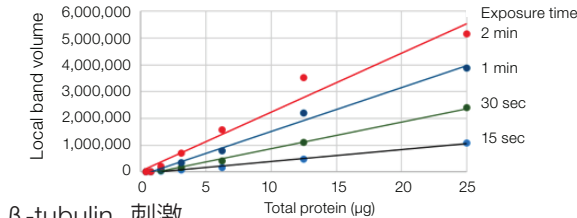


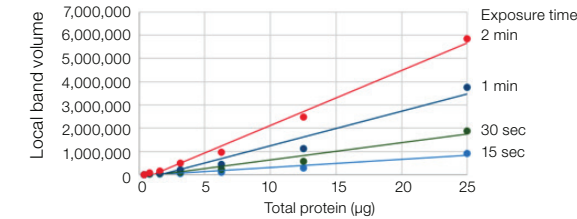
图2. HeLa细胞提取物中管家蛋白HSP90 α 的线性度与饱和。各图中, 位于线性范围以内的点显示为蓝色, 线性范围以外的点显示为红色。

先决条件2: 确认在不同实验条件下, 管家蛋白的丰度是恒定
选择的内部上样对照的丰度必须在不同的实验评估条件下尽可能保持恒定, 这一点至关重要。这可以通过取相同量的用于靶点检测的不同实验裂解物或样本, 进行蛋白质免疫印迹确定。例如, 使用星孢菌素——蛋白激酶的一种广谱抑制剂——处理HeLa细胞。在两种实验条件下检测两种管家蛋白的一致性和丰度。如图3所示, 在未处理和星孢菌素处理的HeLa细胞中检测到相当的 β -tubulin和GAPDH水平, 这两种管家蛋白在不同的曝光时间下均保持线性。

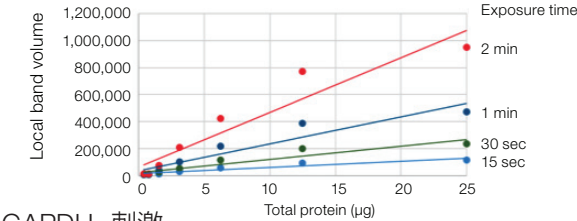
β -tubulin, 未刺激



β -tubulin, 刺激



GAPDH, 未刺激



GAPDH, 刺激

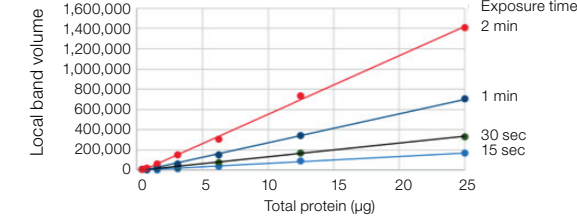


图3. 未刺激和星孢菌素刺激的HeLa细胞提取物中 β -tubulin和GAPDH的检测。

管家蛋白的数据分析——标准化您的蛋白质免疫印迹数据

验证好管家蛋白后, 可以使用该管家蛋白进行数据标准化。必须注意的是, 标准化数据时, 必须计算每次印迹的标准化因子。不推荐在不同的印迹中使用同样的标准化因子。

第一步: 定量各泳道中的实验靶点和上样对照信号

蛋白质免疫印迹标准化的第一步是定量各泳道中实验靶点和管家蛋白的蛋白信号 (如强度或密度)。这可以利用Invitrogen™ iBright™ 分析软件或其他分析软件完成。各种软件程序将提供不同的信号数值, 这取决于它们采用的算法, 但条带之间的相对信号始终相同。确定好各条带的信号值后, 应从各条带信号中减去背景信号。根据使用的软件不同, 上述步骤可以自动完成。

泳道编号	条件 (μM 星孢霉素)	GAPDH信号	激活型PARP信号
1	0	1,691,755	0
2	0.125	1,527,534	416,165
3	0.25	1,780,149	1,034,564
4	0.50	1,869,046	1,342,778
5	1.00	1,370,796	1,783,420
6	2.00	1,072,007	1,247,725

图4. 使用不同浓度的星孢霉素处理的HeLa细胞中的激活型PARP和GAPDH的信号强度。

例如, 使用不同浓度的星孢霉素处理HeLa细胞3小时, 评估激活型聚 (ADP核糖) 聚合酶 (PARP) 的水平, 该蛋白家族参与了多种细胞过程, 如DNA修复、基因组稳定性和程序性细胞死亡。标准化激活型PARP与GAPDH的相对水平 (图4)。使用iBright图像分析软件确定信号强度。

第二步: 计算泳道标准化因子

要确定实验强度数值标准化中各泳道的标准化因子, 必须确定管家蛋白的最高检测信号。该条带值将被用于印迹中其他管家蛋白条带的标准化。要确定泳道的标准化因子, 应使用各泳道的管家蛋白信号除以印迹中最高的管家蛋白信号。在我们的范例中, 泳道4的GAPDH信号强度最高, 因此用其他各泳道的GAPDH信号值除以泳道4的GAPDH信号值 (图5)。



泳道标准化因子 = $\frac{\text{各泳道观察到的管家蛋白强度}}{\text{印迹上观察到的管家蛋白最高强度}}$

泳道编号	GAPDH信号	标准化因子
1	1,691,755	0.91
2	1,527,534	0.82
3	1,780,149	0.95
4	1,869,046	1.00
5	1,370,796	0.73
6	1,072,007	0.57

图5. 确定泳道标准化因子。使用上述泳道标准化因子方程确定标准化因子。

第三步: 计算靶点的标准化信号, 用于相对定量比较

要计算各实验目的条带的标准化信号, 应将观察到的各实验目的条带的信号强度乘以泳道标准化因子 (图6)。

通过第1–3步可以获得调整后的 (标准化) 实验靶点的相对密度。利用上述数值, 现在可以在生物学重复样本中比较实验数

据。在我们的范例中, 使用GAPDH和 β -tubulin作为上样对照, 对三个生物学重复样本进行实验, 观察使用星孢霉素处理后的实验趋势 (图7)。使用GAPDH和 β -tubulin进行标准化, 可以观察到类似的趋势。

标准化的实验信号 = (观察到的实验信号)÷ (泳道标准化因子)

泳道编号	激活型PARP信号	泳道标准化因子	标准化的信号
1	0	0.91	0
2	416,165	0.82	507,518
3	1,034,564	0.95	1,089,015
4	1,342,778	1.00	1,342,778
5	1,783,420	0.73	2,443,041
6	1,247,725	0.57	2,188,991

图6. 确定目的条带的标准化信号。

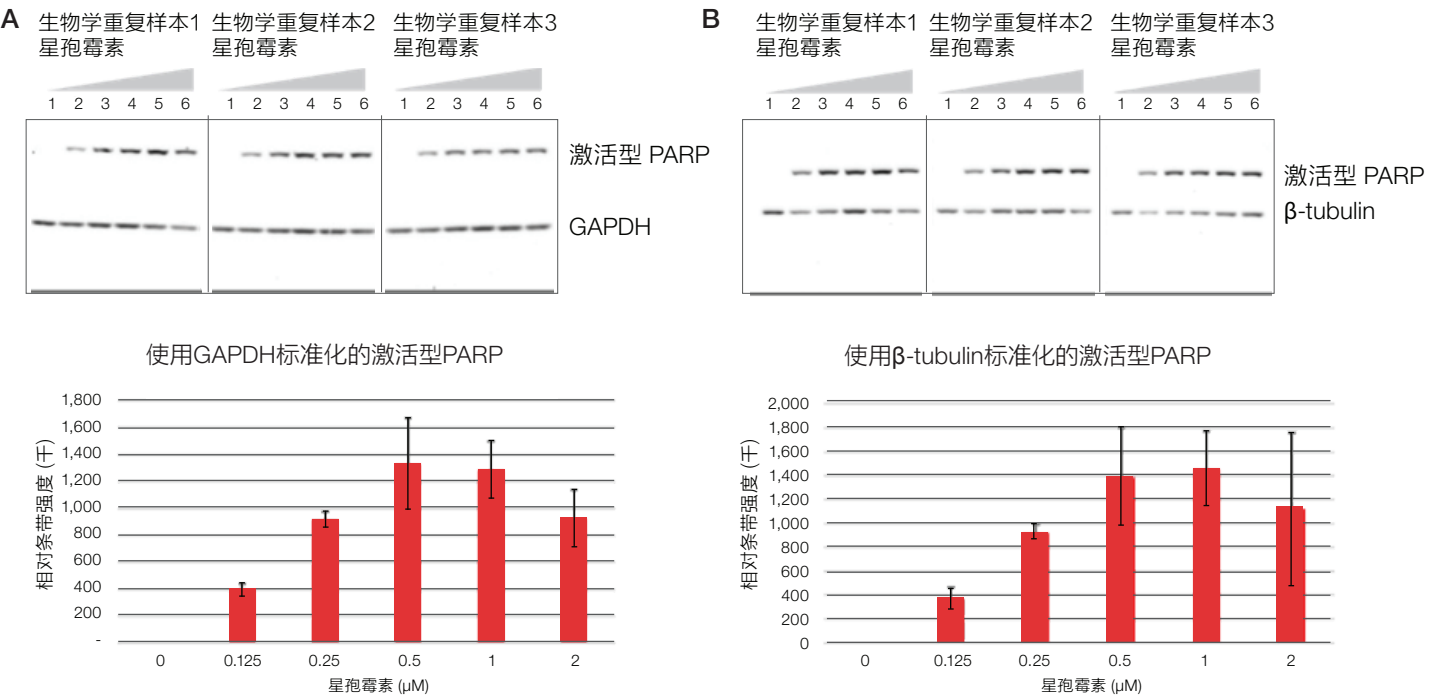


图7. 星孢霉素对PARP剪切的影响。使用 (A) GAPDH和 (B) β -tubulin对不同浓度的星孢霉素处理的HeLa细胞中激活型PARP的信号强度进行标准化。

结论

在考虑适当因素的情况下, 使用内部上样对照 (管家蛋白) 可以标准化信号, 实现定量蛋白质免疫印迹。准确的上样对照应在所有实验条件下, 使信号强度与上样量之间保持线性关系。操作时, 标准化应对蛋白质免疫印迹过程中的差异来源进行校正。

方法

细胞刺激

使用Invitrogen™ Countess™ 自动细胞计数仪计数HeLa细胞, 每个10 cm培养皿中接种 2.0×10^6 个HeLa细胞, 使其贴壁过夜。第二天, 使用不同浓度的星孢霉素刺激一部分细胞3小时 (0、0.125、0.25、0.50、1.0、2.0 μ M), 另一组细胞未进行刺激。刺激后, 离心收集细胞, 使用Thermo Scientific™ Pierce™ IP裂解缓冲液 (货号: 87788) 裂解细胞沉淀。使用Thermo Scientific™ Pierce™ Rapid Gold BCA蛋白分析试剂盒 (货号: A53225) 及Thermo Scientific™ Pierce™ BSA Standard Pre-Diluted Set (货号: 23208) 确定各细胞裂解物的蛋白浓度。

蛋白质免疫印迹

将HeLa全细胞提取物与Thermo Scientific™ Pierce™ Lane Marker还原性样本缓冲液 (货号: 39000) 混合。取不同量的总蛋白 (从50 μ g到1.6 μ g连续稀释) 上样至Invitrogen™ Novex™ 4–20% Tris-甘氨酸Plus 20孔中型胶上 (货号: WXP42020BOX)。分离后, 使用Thermo Scientific™ Pierce™ Power Blotter (货号: 22834)和Pierce™ 一步法转印缓冲液(货号: 84731), 将蛋白质转印至Thermo Scientific™ 硝酸纤维素膜(货号: 88018)上。使用5%脱脂牛奶 (溶解于Thermo Scientific™ Pierce™ TBS Tween™ 20缓冲液 (货号: 28360) 中) 封闭膜, 然后使用一种或多种Invitrogen™ 一抗检测: β -tubulin (货号: MA5-16308)、GAPDH (货号: MA5-15738)、 β -tubulin (货号: MA5-15739)、cyclophilin B(货号: PA1-027A)、HSP90 α (货号: PA3-013)和激活型PARP(货号: 44-698G), 随后使用适当的Invitrogen™ 二抗检测: 山羊抗小鼠IgG, HRP (货号: 31430) 或山羊抗兔IgG, HRP (货号: 31460)。使用Thermo Scientific™ SuperSignal™ West Dura化学发光底物 (货号: 34076) 显色, 采用iBright FL1000成像系统 (货号: A32752) 成像。曝光时间如各图所示。

如需进一步了解iBright成像系统和iBright分析软件, 请登录
thermofisher.com/ibright

ThermoFisher
SCIENTIFIC