

用 No-Stain 免染型蛋白标记试剂和 iBright 1500 系列成像系统对蛋白免疫印迹 (WB) 数据进行简便、准确的归一化

介绍

由于凝胶电泳中的蛋白质上样量因样本而异, 权威期刊已经制定了蛋白质归一化指南, 用于规范定量 WB 数据。

一种常见的蛋白质归一化方法主要依靠测量所有样品中都有恒定表达的内源性管家蛋白的丰度。 α -微管蛋白(α -tubulin)、 β -肌动蛋白(β -actin)或甘油醛3-磷酸脱氢酶(GAPDH)等蛋白通常用作蛋白质归一化的上样对照, 管家蛋白的信号可以在较大的浓度范围内保持线性, 以便用作归一化的可靠参考, 并且较少受实验条件的影响。但是这种方法存在潜在的缺陷。由于丰度较高, 管家蛋白经常出现饱和和信号; 在某些特定实验条件下, 管家蛋白的表达会发生变化, 虽然这些缺陷可以通过优化来降低, 但这是一个耗时的过程。此外还需使用抗体检测管家蛋白, 除了抗体的费用, 还要额外的步骤来剥离和重新检测目的蛋白条带。

另一种蛋白质归一化方法是使用总靶蛋白对翻译后修饰蛋白质进行归一化。使用可识别蛋白不同修饰状态的pan抗体, 将翻译后修饰(例如磷酸化、糖基化、乙酰化和泛素化)的目的蛋白归一化为相应的总蛋白。使用这种方法对翻译后修饰的目的蛋白进行归一化有许多缺点。pan 或总靶蛋白抗体必须识别所有翻译后修饰和未修饰的目的蛋白。另外, 用于归一化的总靶蛋白的表达在所有实验条件下必须是恒定的。这种方法的线性动态范围通常很窄。

比起管家蛋白或翻译后修饰的总靶蛋白归一化, 总蛋白归一化(TPN)是一种更好的替代方法。它避免了使用管家蛋白的可变性和不精确性、减少优化条件的时间消耗和检测归一化靶蛋白的试剂成本。

TPN方法中, 一个印迹上的总蛋白被标记或染色, 使每个泳道中上样的相对蛋白量得以比较并与参考泳道做对比进行归一化。丽春红和几种可逆荧光染料可用于印迹上的TPN总蛋白染色。这些染料的缺点是: 要求在染色之后对印迹进行成像, 然后在免疫印迹步骤之前去除染料。WB 完成后必须再次成像, 然后才能进行结果的归一化。这些染色、洗脱和多个成像步骤非常耗时。

除了使用像丽春红这样的印迹染色剂进行TPN外, 还有另一种替代方法。但是这种方法需要购买和使用一种特殊的凝胶, 这种凝胶可能不能兼容您目前优化过的目的蛋白分离体系。该方法需要一个特定的凝胶成像仪来捕捉图像, 并且需要在免疫印迹步骤之前对印迹上的总蛋白进行成像, 因为来自靶蛋白的化学发光信号会干扰印迹上的总蛋白信号。

Invitrogen™ No-Stain™ 蛋白标记试剂具有 TPN 的优点，且兼容您的任意凝胶类型。它可以轻松标记转印至膜上的蛋白质（图1）。在 1X No-Stain 标记缓冲液中加入 No-Stain 活化剂和 No-Stain 衍生剂，制备 No-Stain 蛋白标记试剂工作溶液，与膜一起孵育 10 分钟。



图1. 用 No-Stain 蛋白标记试剂标记转印后的蛋白印迹。

通过与所有蛋白质上的赖氨酸残基形成共价键，No-Stain 试剂可产生稳定的信号，并可与经过抗体孵育的印迹膜同时成像兼容聚偏氟乙烯 (PVDF) 或硝酸纤维素 (NC) 膜，与化学发光或荧光检测的所有下游抗体检测步骤兼容。

使用 No-Stain 蛋白标记试剂，可在更宽的线性范围内（每孔上样 1–80 μg 总蛋白），针对蛋白检测实现准确的 TPN。低至 20 ng 的蛋白条带也可检测。标记的印迹可使用带有 UV、绿色 LED 或荧光（约 488nm）光源的多种成像仪（包括 Invitrogen™ iBright™ 1500 系列成像系统）来捕获图像。利用 No-Stain 蛋白标记试剂配合 iBright 1500 系列成像系统将提高定量 WB 的准确性和效率。

使用 No-Stain 蛋白标记试剂进行 TPN 比使用管家蛋白更准确

用 No-Stain 蛋白标记试剂进行 TPN 避免了使用管家蛋白的可变性和不精确性，也减少了使用免疫印迹检测管家蛋白所耗费的时间、精力成本，比如剥离印迹和重新检测。一个准确的上样对照应该在所有实验条件下，都具有与样本上样量呈线性关系的信号强度。在我们的测试中，使用 No-Stain 试剂在膜上标记总蛋白获取的信号强度均可确保与样本上样量呈线性关系（图2）。因此，No-Stain 试剂使总蛋白成为定量 WB 应用的理想上样对照。

图2 中的曲线图显示了使用 No-Stain 蛋白标记试剂进行 TPN 的信号响应与每孔蛋白上样量的线性关系。来自管家蛋白的信号在上样量较高的情况下会达到饱和，将不能提供准确的归一化结果。

No-Stain 试剂标记的印迹成像

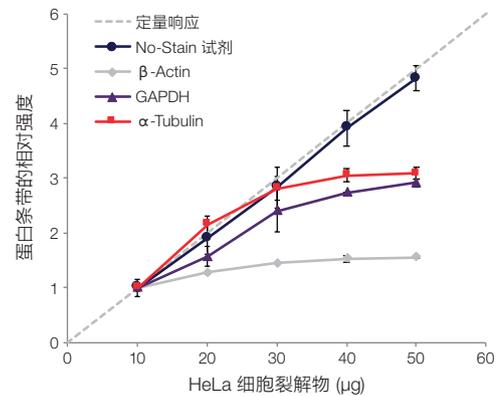
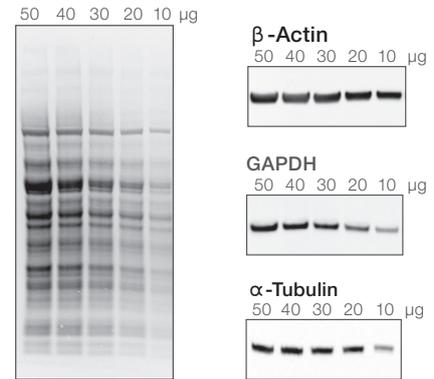


图2. 使用 No-Stain 蛋白标记试剂进行 TPN。

Invitrogen™ Bolt™ 4-12% Bis-Tris Plus 凝胶，加样 10-50μg 的 HeLa 裂解液，用 MES 电泳缓冲液电泳。在 Invitrogen™ iBlot™ 2 蛋白转印仪上用 iBlot 2 转印膜组将凝胶中的蛋白质转移到 PVDF 膜上 (P0 方案 7 分钟)。用 20mL 超纯水洗 PVDF 膜 2 分钟，然后用 10mL No-Stain 蛋白标记试剂工作溶液标记 10 分钟。再用 20mL 超纯水洗膜 3 次，每次 2 分钟，然后加入 Invitrogen™ 抗 β-actin (货号 AM4302)、抗 GAPDH (货号 398600) 和抗 α-tubulin (货号 138000) 一抗和 Invitrogen™ 山羊抗小鼠 IgG-Alexa Fluor™ Plus 680 二抗 (货号 A21058)。Invitrogen™ iBright™ FL1500 成像系统进行成像。用 iBright 软件对泳道上的总蛋白信号进行定量分析。用 No-Stain 试剂确定总蛋白信号的整体范围内拟合 R² 值为 0.9990，而 β-actin、GAPDH 和 α-tubulin 的 R² 值分别为 0.8851、0.9438 和 0.8332。

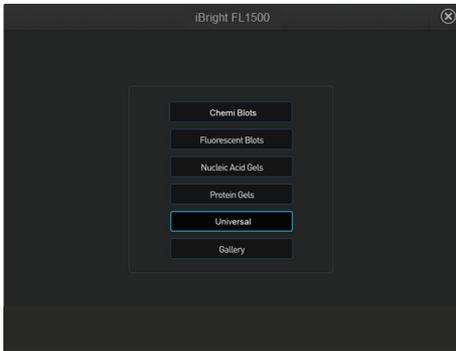
在iBright 1500 系列成像系统上应用 No-Stain 蛋白标记试剂的操作流程

在进行凝胶电泳后, 如前所述, 转印并使用 No-Stain 试剂标记蛋白质, 照常进行 WB。

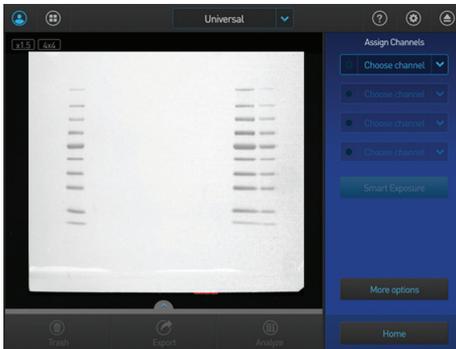
经处理后, WB 可在 iBright 1500 系列成像系统上成像和进行归一化。可以用仪器上的分析软件直接在仪器上进行归一化, 方便快捷。下面是使用 iBright 1500 系列成像系统和 No-Stain 蛋白标记试剂进行 TPN 分析的 9 个简单的上机操作步骤, 5 分钟之内即可完成。

注: 归一化工作流程也可以在基于云或电脑桌面版本的 Invitrogen™ iBright™ 分析软件上完成。有关如何在桌面版软件中执行归一化的更多详细信息, 请访问 thermofisher.com/ibright 下载说明手册。

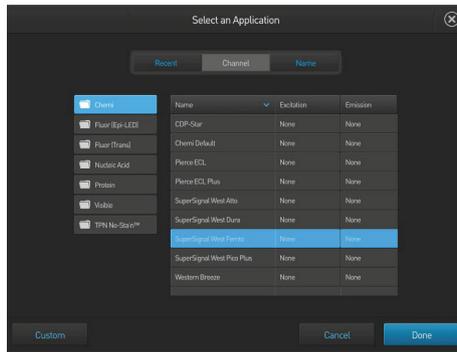
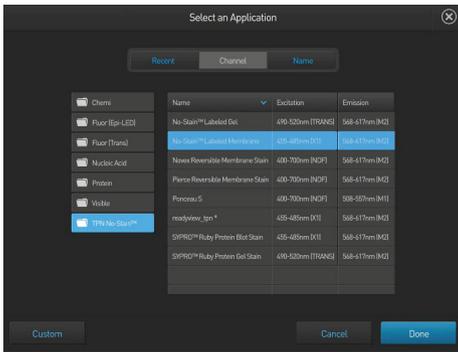
1. 在 Invitrogen™ iBright™ FL1500 或 CL1500 主界面上, 选择 **Universal 模式**。



2. 接下来, 根据您的 WB 检测策略分配通道 (以下统称为Channel)。



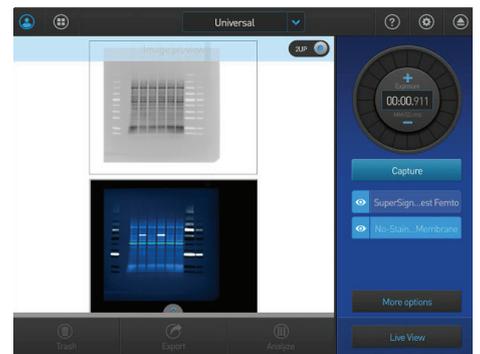
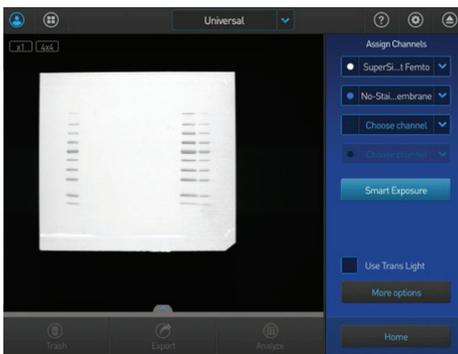
- 利用 No-Stain 蛋白标记试剂对化学发光WB进行归一化处理。点 **Choose channel**, 在 **Channel V**型箭头下, 点 **TPN No-Stain**, 在应用列表下, 点 **No-Stain Labeled Membrane**。对于下一个通道, 选择**Chemi**, 然后在右边的菜单中选择相应的底物, 本例中使用的是SuperSignal West Femto底物(默认颜色是白色)。



- 利用No-Stain蛋白标记试剂对荧光WB进行归一化。第一个Channel 选择 **TPN No-Stain**, 然后再选择 **No-Stain Labeled Membrane**。接下来, 根据使用的荧光基团分配相应荧光通道。

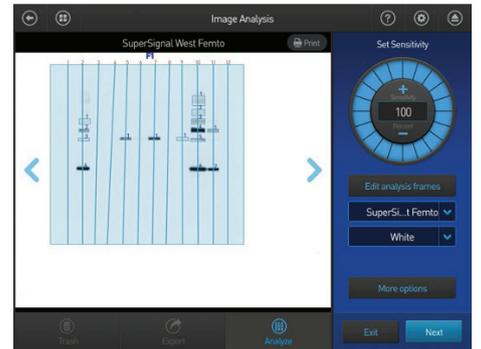
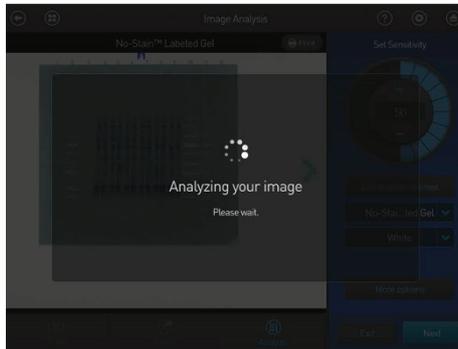
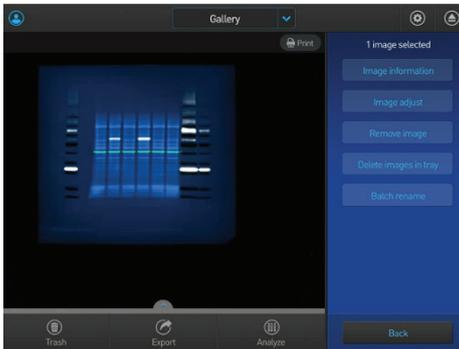
注: 避免使用最大激发波长 <575nm和最大发射波长 <645nm的荧光基团, 因为其可能与 No-Stain 蛋白标记试剂可能发生荧光光谱重叠。

3. 点 **Smart Exposure** 以确定最佳曝光时间。将通过显示图像预览的方式, 根据每个通道的建议曝光时间, 显示捕获后每个通道的捕获图像。如果预览可以接受, 请点 **Capture**。如果需要调整曝光时间, 请使用右侧曝光转盘或数字键盘来提高或降低曝光时间。随着曝光时间的变化, 生成的图像预览会实时调整。

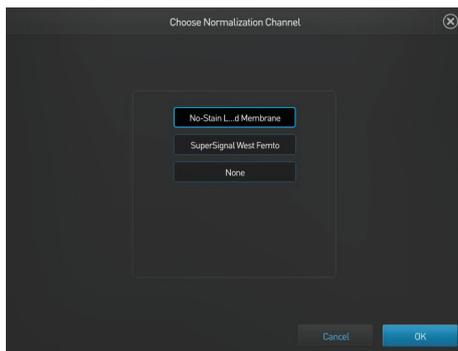
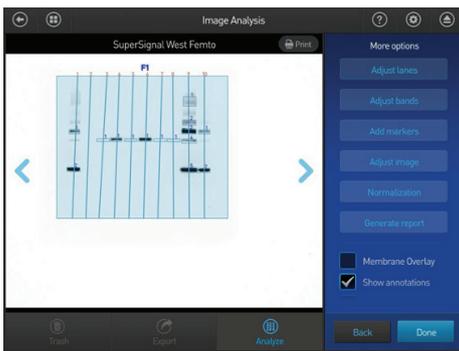


注: 图像也可以分通道单独采集, 并在使用 iBright 电脑端分析软件进行图像合并, 但我们建议使用 **Universal** 模式同时采集化学发光和 No-Stain 信号。No-Stain 标记膜可以用 **Fluorescent Blot** 模式或者**Universal** 模式获得。

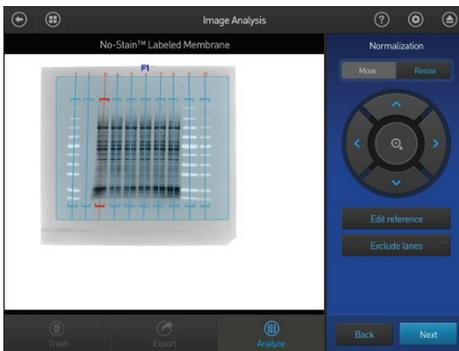
4. 接下来, 点击图像视区正下方的 **Analyze** 图标。软件将自动识别分析框、泳道和条带。右侧的灵敏度调整转盘可以提高和降低条带的灵敏度强度阈值(默认灵敏度为 100, 可以在 0到100之间调整)。分析框圈出所有的印迹条带, 在条带的外部留下足够的空隙, 以确保条带四周数据圈入。有关如何调整分析框、泳道和进行条带识别的详细信息, 请参见附录。



5. 在分析框、泳道和条带调整之后, 点击 **More options** 按钮, 然后点击 **Normalization** 按钮。指定归一化通道(将用于生成归一化因子的通道)——在本例中, 为 **No-Stain Labeled Membrane** 通道。



6. 如有必要, 同时移动和/或缩放所有泳道的归一化区域。每条泳道的归一化区域位于顶部和底部括号之间。归一化区域识别每个泳道用于定量总蛋白密度和计算归一化因子。

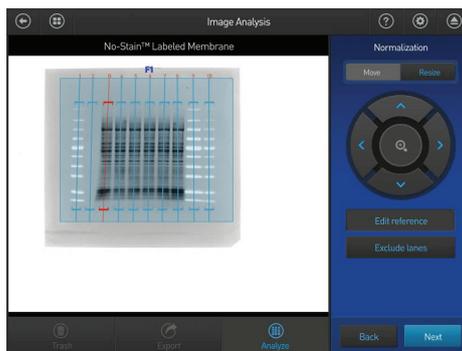


归一化区域的位置都可以在分析框内上下移动,方法是点 Move 按钮,然后使用向上(Λ)或向下(V)箭头逐渐移动归一化区域。所有泳道的归一化区域高度可通过点 Resize (调整大小)然后点击向上(Λ)或向下(V)进行高度增减。归一化区域的高度应完全包含通道中的蛋白质条带。如果出现凝胶分离或伪影转移,可以进行相应调整。点击 **Next**。



注: 对于总蛋白归一化工作流程,软件定义了泳道的归一化区域:泳道顶部和底部各有一个括号,中间有一条直线穿过。泳道宽度由算法自动设置,不可调整。对于所有泳道,归一化区域的面积都是相同的。

7. 指定一条参考泳道。参考泳道是所有其他泳道以其为标准并设置值为 1.000。参考泳道以红色突出显示。默认情况下,软件将参考泳道指定为具有最高密度的泳道。



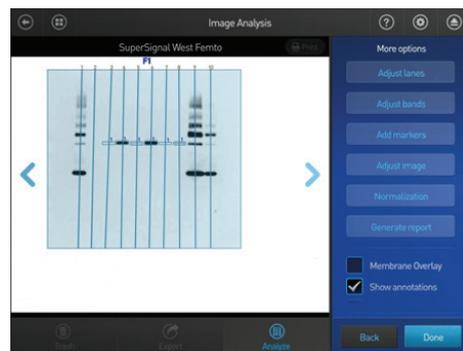
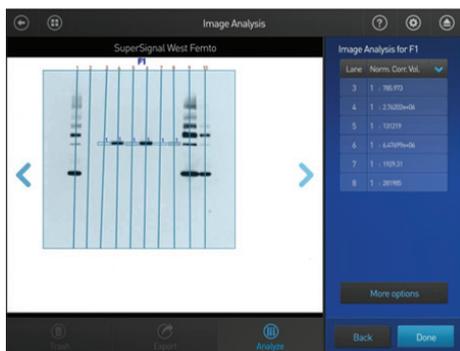
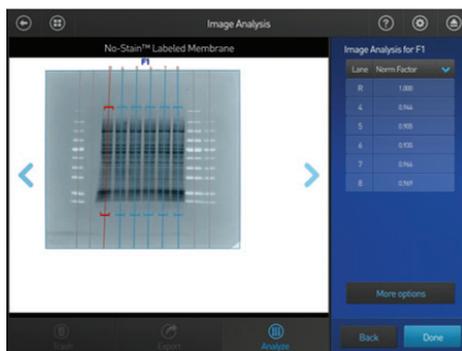
注: 有时蛋白 ladder 会是默认分配的参考泳道,但不能用作归一化参考泳道;应选择样本泳道作为归一化参考泳道。

如果需要,通过点 **Edit reference** 按钮,然后选择需要的泳道来替换参考泳道。选择需要的泳道后,点击 **Done**,然后点 **Next**。

8. 要从归一化中排除无关泳道，请点 **Exclude lanes**，然后点所需泳道上方的 (-) 符号。选定泳道上方的符号将变为一个 (+) 符号。点击 **Done**，然后点 **Next**。



9. 归一化因子和归一化条带数据现在可以直接在iBright仪器上进行查看和/或作为报告或原始数据导出。点 **More options** 和 **Generate report** 可创建包含文件信息、图像和数据的可打印报告。报告可以导出为 PDF 文件。原始数据将自动导出为 CSV 文件，可以在商业电子表格应用程序 (如 Microsoft™ Excel™ 软件) 中打开。



解读报告

归一化因子是从归一化通道计算出来的，本例中是 No-Stain 通道。归一化因子的计算方法是将每个泳道的调整后的总泳道蛋白量除以参考泳道的调整后的总泳道蛋白量。参考泳道的归一化系数始终为 1.000，所有其他泳道归一化系数都与参考泳道成比例。

通道 2	总泳道蛋白量	背景量 (Rolling Ball)	调整后的总泳道蛋白量	归一化因子
泳道 3	233,559,000	162,680,000	70,879,200	1.000
泳道 4	231,545,000	164,642,000	66,903,700	0.944
泳道 5	231,837,000	167,711,000	64,126,300	0.905
泳道 6	234,800,000	168,528,000	66,271,800	0.935
泳道 7	236,146,000	167,698,000	68,448,300	0.966
泳道 8	234,745,000	166,097,000	68,648,500	0.969

$$\text{归一化因子 (泳道 X)} = \frac{\text{调整后的总泳道蛋白量 (泳道 X)}}{\text{调整后的参考泳道总泳道蛋白量}}$$

$$\text{归一化因子 (参考泳道)} = \frac{70,879,200}{70,879,200} = 1.000$$

$$\text{归一化因子 (泳道 6)} = \frac{66,271,800}{70,879,200} = 0.935$$

在含有目的蛋白质的通道中计算归一化校正量, 计算方法是将每个条带的信号强度 (局部校正) 除以其所在泳道的归一化因子。

框 1, 通道 4, 磷酸化 AKT						
名称	泳道	条带	总量	局部校正量	归一化因子	归一化校正量
Untreated	3	1	129,453	786	1.000	786
hIGF	4	1	2,790,000	2,607,000	0.944	2,762,000
hIGF + LY	5	1	318,845	118,717	0.905	131,219
hIGF + Rap	6	1	6,259,000	5,972,000	0.935	6,387,000
hIGF + Rap + LY	7	1	108,734	1,863	0.966	1,929
hIGF + BEZ	8	1	425,214	271,943	0.969	280,780

$$\text{归一化校正量 (泳道 X)} = \frac{\text{局部校正量 (泳道 X)}}{\text{归一化因子 (泳道 X)}}$$

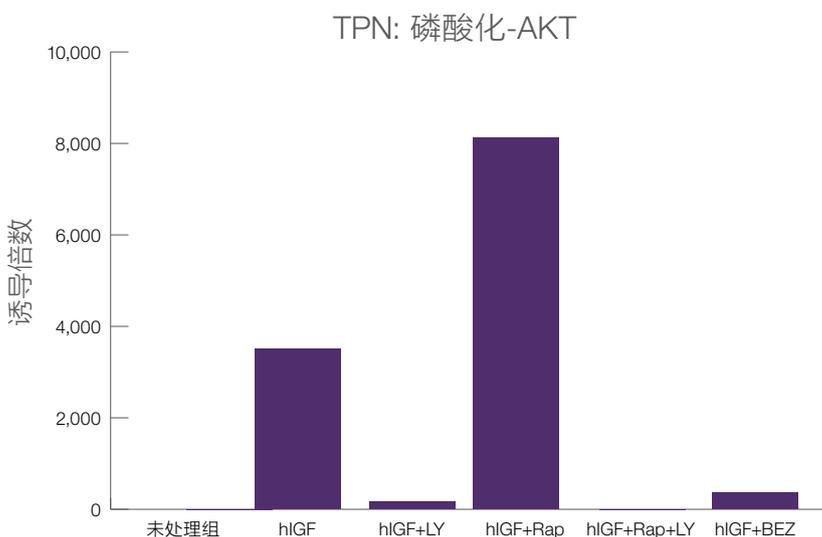
$$\text{归一化校正量 (泳道 6)} = \frac{5,972,000}{0.935} = 6,387,000$$

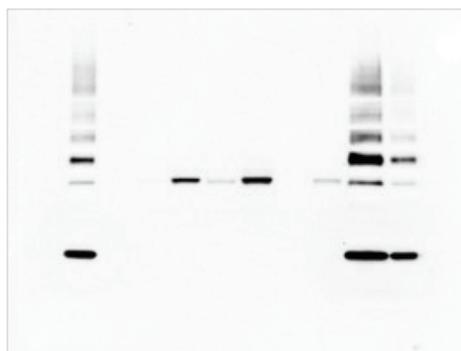
展示归一化数据

将数据导出到 Excel 电子表格或相似类型的应用程序中, 以便轻松地整理和记录密度测量结果。

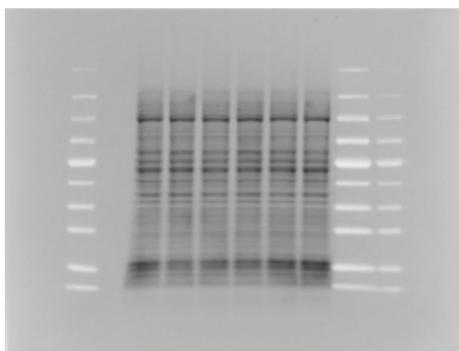
在下面的例子中, 磷酸化-AKT 的归一化校正量以诱导倍数形式呈现 (处理组对比未处理组)。

框 1, 通道 4, 磷酸化 AKT							
名称	泳道	条带	总量	局部校正量	归一化因子	归一化校正量	诱导倍数
未处理组	3	1	129,453	786	1.000	786	1
hIGF	4	1	2,790,000	2,607,000	0.944	2,762,000	3,514
hIGF+LY	5	1	318,845	118,717	0.905	131,219	167
hIGF+Rap	6	1	6,259,000	5,972,000	0.935	6,387,000	8,126
hIGF+Rap+LY	7	1	108,734	1,863	0.966	1,929	2
hIGF+BEZ	8	1	425,214	271,943	0.969	280,780	357

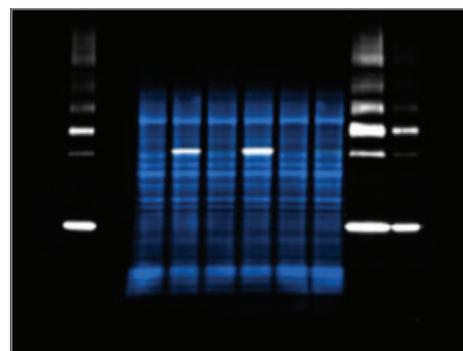




通道 1: 化学发光检测 (SuperSignal West Femto), 10s 曝光



通道 2: No-Stain labeled membrane, 911ms 曝光



叠加

图3. 用各种试剂处理 HCT116 细胞: 人结肠癌细胞 (HCT116) 血清饥饿 24小时, 并用 LY294002 (50 μ M, 1小时)、雷帕霉素 (10nM, 1小时) 和/或 BEZ235 (500nM, 1小时) 预处理。预处理后, 在每个样品 (12.8nM, 15min) 中加入胰岛素样生长因子-1 (hIGF-1)。细胞裂解, 用 WB 法测定 p-AKT (Ser473) 的相对含量, 用 No-Stain 蛋白标记试剂进行归一化。IGF-1 诱导 AKT 磷酸化。雷帕霉素通过 IGF-1R 依赖机制抑制 mTOR 功能并诱导 AKT 磷酸化。LY294002 和 BEZ235 是 PI3K 途径和阻断 PI3 激酶依赖性 AKT 磷酸化的抑制剂。

结果

图3 中的 WB 归一化数据显示 hIGF-1 诱导磷酸化-AKT 为 232倍。在加入 hIGF-1 前使用雷帕霉素预处理, 磷酸化-AKT 诱导为 529倍。加入 hIGF-1 前用 LY294002 或 BEZ235 预处理抑制磷酸化-AKT 的诱导, 使其分别保持在 15倍和 22倍。当用 LY294002 和雷帕霉素预处理时, 根本没有诱导磷酸化-AKT。

结论

与使用管家基因相比, 利用 iBright 1500 系列成像系统搭配 No-Stain 蛋白标记试剂进行 TPN, 将简化定量 WB 的工作流程, 同时提高结果的准确性。该方法快速、简便, 且与市售的绝大部分凝胶以及荧光或化学发光检测兼容。

请看我们的视频, 了解如何使用 No-Stain 蛋白标记试剂和 iBright 1500 系列成像系统进行定量 WB:
thermofisher.com/how-to-no-stain.



了解更多信息, 请浏览: thermofisher.com/no-stain



赛默飞
官方微信



赛默飞
生命科学官方微信

免费服务电话: 800 820 8982/400 820 8982

信息咨询邮箱: cnbidmarketing@thermofisher.com

ThermoFisher
SCIENTIFIC