

蛋白质印迹分析中总蛋白归一化的新方法

— 避免使用管家蛋白获得的无效结果

Thomas Diller, Jordan Thompson, and Brian Steer, Thermo Fisher Scientific, 5781 Van Allen Way, Carlsbad, California, USA, 92008

摘要

常用的蛋白质印迹归一化方法是基于管家蛋白为内参的归一化。这类蛋白由于表达量高，通常会产生信号饱和，另外，管家蛋白在不同细胞类型和条件下可能会出现细胞表达水平不一致等问题，从而带来结果偏差，导致结论错误。相比之下，总蛋白归一化是一种更准确的替代方法，现在已被视作蛋白质印迹定量的金标准。总蛋白归一化需要对膜上所有蛋白进行均匀染色或标记、成像，然后分析总蛋白。值得注意的是，这种归一化过程不会干扰常规免疫检测方法，可融入现行蛋白印迹工作流程，且在所有实验条件下信号强度均与蛋白上样量呈线性关系。本文介绍了一种新开发的总蛋白归一化试剂，并通过分析四种不同细胞背景（HeLa、MCF-7、Jurkat和A431细胞）下的四种目标蛋白（AKT1、亲环蛋白b、EGFR和磷酸化EGFR），证明了其卓越的蛋白归一化能力。文中通过数据展示了三种管家蛋白如何表现出信号饱和、造成归一化数据的偏差、以及如何产生平均48%的样品间差异。而使用我们的新工具所获得的信号强度与蛋白样品上样量呈线性关系，实现了精确的蛋白归一化，总体平均误差约为8%。基于管家蛋白进行蛋白归一化会造成蛋白质印迹定量偏差，从而导致实验研究结论失效；而这种全新的改良总蛋白归一化工具，则为定量蛋白质印迹提供了一种更准确的替代方法。

引言

尽管蛋白质印迹已实际应用三十多年，但直到近期，同行评审专家和期刊编辑才建议撰稿人更严格地论证所用蛋白质印迹定量方法的有效性。这类论证过程包括蛋白归一化，这种技术可消除蛋白质印迹方法的不准确性，以及其他可能与所研究属性无关的固有实验误差。蛋白归一化是一种相对于

参照物——通常是管家蛋白（HKP），例如 α -微管蛋白、 β -肌动蛋白或甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）——定量目标蛋白的手段。选用HKP作为参照物的前提是，HKP表达水平与所研究样品的蛋白质总量存在直接的比例关系。在此基础上，由设计的实验变量引起的样品中目标蛋白水平变化才可通过与所测HKP水平的比率来表示。遗憾的是，基于HKP进行蛋白印迹归一化的前提往往有效性不充分，这可能导致结论不准确、不一致或无效。

使用HKP对蛋白质印迹进行归一化存在的问题：

- 在大多数样品中，HKP相较于表达量有限的目标蛋白通常丰度过高，导致在常用蛋白质上样范围内信号饱和²⁻⁴（即，HKP水平与蛋白质上样量增量不呈线性关系），造成HKP难以成为准确的内参对照³。
- 并非所有细胞系和组织类型都能表达所需的HKP。即使表达了特定HKP，其表达水平也会随组织类型⁴或其他细胞状态而变化⁵。
- HKP的表达可能会随所研究细胞的处理方式而发生变化⁶。
- HKP的表达水平可能受到培养细胞密度的影响⁷。

为克服以HKP为内参的蛋白归一化存在的上述问题，需要选择其他方法，即总蛋白归一化（TPN）。我们最新研发的Invitrogen™ No-Stain™ 免染型蛋白标记试剂可为蛋白质印迹分析提供一种可靠的归一化方法。

No-Stain试剂由三部分组成：No-Stain标记缓冲液、No-Stain活化剂和No-Stain衍生剂。活化剂的活性成分为带有亲电氟基碳的扁桃腈，衍生剂的活性成分为荧光氨基衍生化分子3-(2-呋喃基)喹啉-2-羧醛。存在活化剂时（如图1所示），该荧光分子可在腈存在条件下与伯胺快速反应，形成具有可见光激发波长，且不受大多数其他反应性荧光团常见背景荧光影响的高荧光复合物，从而超灵敏地检测伯胺（例如，赖氨酸侧链和蛋白质的氨基末端）⁸。根据图2所示的方法，使用No-Stain试剂的蛋白归一化非常适合替代其他现有复杂总蛋白成像方法（如考马斯凝胶染色或Ponceau S膜染色）。

图1. No-Stain标记反应

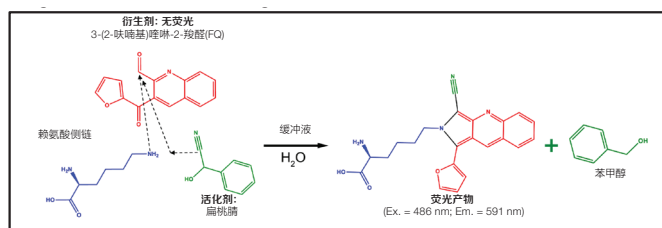


图2. No-Stain标记操作方法



结果

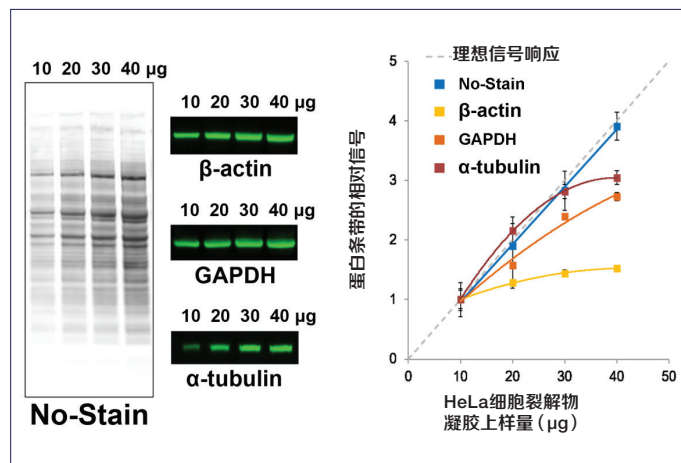
在各种细胞系中评估No-Stain蛋白标记试剂的TPN能力，并将其与HKP定量结果进行比较。采用一种方法进行蛋白归一化，必须至少确保该方法的蛋白质上样量与测得信号强度呈线性关系。

将HeLa细胞裂解物按照常见的几种上样量加入凝胶后进行电泳，转印至PVDF膜并使用No-Stain标记，然后免疫检测三种HKP（即 α -微管蛋白、 β -肌动蛋白和GAPDH）。图3所示为使用iBright成像仪采集的膜印迹图像。利用iBright软件定量荧光信号。图3中的虚线为理想信号响应，代表每种蛋白上样量下的预测定量信号响应。图3中显示的结果表明，在研究人员常用的一系列HeLa蛋白上样量范围内（每个泳道为10-40 μ g），No-Stain试剂产生的信号与蛋白上样量呈线性关系，且与预期的理想信号响应相符。而在此常见蛋白上样范围内，HKP的光密度信号强度与蛋白上样量呈非线性关系，导致信号响应低于预期且显示信号饱和（例如，信号强

度并未随蛋白上样量成比例增加）。HKP的信号饱和是由于HKP常具有高细胞表达水平所致，且这种特征使其难以在常用实验条件下作为准确的内参对照，或难以有效进行目标蛋白的归一化。

图4和图5显示的结果与图3近似，是使用非HeLa细胞系提取物获得的结果。

图3. HeLa细胞裂解液



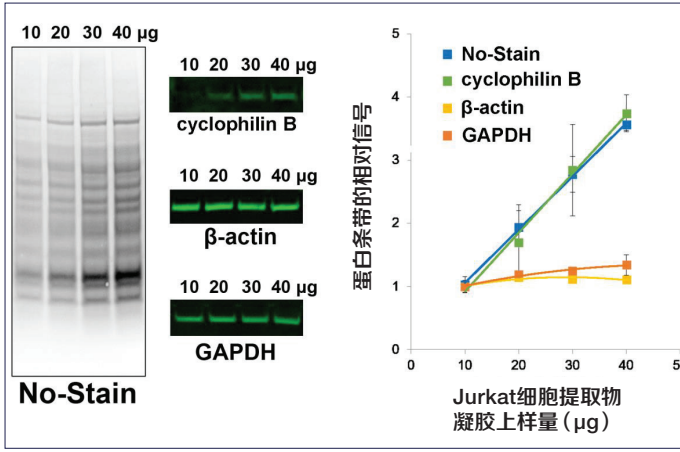
针对三种HKP和No-Stain标记的HeLa裂解物蛋白，比较光密度信号与蛋白上样量的线性关系。与HKP相比，在HeLa裂解物中使用No-Stain标记试剂进行归一化的准确度更高。

表1. HeLa裂解液的误差百分比

归一化方法	此方法相对于凝胶中HeLa总蛋白上样量预测结果的误差百分比				
	10 μ g	20 μ g	30 μ g	40 μ g	平均值
No-Stain	0.0	5.1	5.8	2.3	4.4
β -actin	0.0	35.9	51.9	61.9	49.9
GAPDH	0.0	21.4	20.1	31.8	24.4
α -tubulin	0.0	7.9	6.3	23.9	38.1

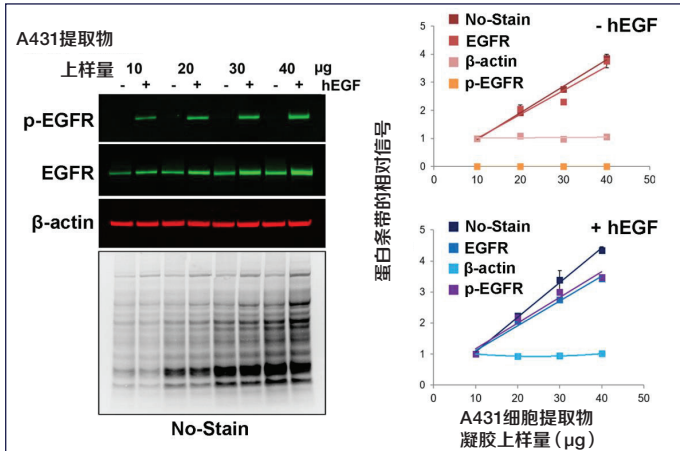
利用图3数据计算出所有方法相对于预测响应的误差百分比。误差百分比越大，光密度信号与预测理想响应的差距就越大，该方法在此蛋白上样量下的准确性就越低。与HKP相比，使用No-Stain试剂进行TPN的结果与蛋白上样量具有更好的相关性。

图4. Jurkat细胞提取物



与使用HKP为内参的归一化相比, No-Stain试剂的归一化结果准确度更高。

图5. A431细胞提取物



No-Stain试剂显示准确的归一化结果, 而β-肌动蛋白则未显示。

根据上文针对HeLa裂解物的说明, 利用图4和5中的图表数据计算相较于预测响应的误差百分比。Jurkat和A431细胞提取物的结果如表2和3所示, 其中包含相对于亲环蛋白b以及EGFR和磷酸化EGFR (作为目标蛋白) 的预测误差百分比。同时, 利用图4和图5中的数据归一化目标蛋白质水平 (即通过光密度测定法确定的条带定量), 归一化数据的统计评估结果如表2和表4所示。

表2. Jurkat提取物数据的误差百分比

归一化方法	此方法相对于凝胶中Jurkat提取物蛋白上样量预测结果的误差百分比					归一化亲环蛋白B条带定量	
	10 µg	20µg	30 µg	40µg	平均值 (20-40 µg)	范围(x 10 ⁶)	CV
hEGF	0.0	5.5	9.8	13.2	9.5	3.22	13.5%
No-Stain	0.0	42.7	62.8	72.3	59.3	10.17	55.7%
β-actin	0.0	40.5	58.5	66.5	55.2	10.23	49.8%

表3. A431提取物数据的误差百分比

EGFR和磷酸化EGFR归一化方法	此方法相对于凝胶中A431提取物蛋白上样量预测结果的误差百分比									
	10 µg		20µg		30 µg		40µg		平均值 (20-40 µg)	
hEGF	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
No-Stain	0.0	0.0	3.8	11.7	8.0	12.9	3.7	8.5	5.2	11.0
β-actin	0.0	0.0	45.8	53.6	67.5	68.7	73.3	74.7	62.2	65.7

表4. A431提取物数据的归一化准确度

EGFR和磷酸化EGFR归一化方法	归一化EGFR条带定量				归一化磷酸化EGFR条带定量			
	范围(x 10 ⁷)		CV		范围(x 10 ⁷)		CV	
hEGF	-	+	-	+	-	+	-	+
No-Stain	0.34	1.09	4.4%	10.7%	---	2.32	---	5.8%
β-actin	2.58	3.40	47.9%	43.7%	---	11.77	---	46.2%

结论

本文描述并证明了使用HKP进行蛋白质印迹归一化时存在的一些固有问题。具体而言, 在常用的蛋白上样量范围内, 尤其是研究细胞中低丰度蛋白时, HKP会表现出信号饱和, 所以无法作为内参。这种饱和会导致对蛋白上样量变化的非线性信号响应, 且会与预期值产生明显偏离。我们通过使用新工具No-Stain试剂进行总蛋白归一化, 解决了使用HKP进行蛋白归一化所产生的问题, 并且可提供更高的准确性和可重复性, 使结果更接近预期。与HKP不同, 在所有测试的细胞系中, No-Stain试剂都具有与蛋白质上样量存在线性关系的信号强度。使用HKP的平均误差为48%, 而使用No-Stain试剂的平均误差为8% (以预期的平均误差百分比形式表示)。

参考文献

1. Ghosh, R., Gilda, J. E. & Gomes, A. V. Accuracy of Western Blots. **11**, 549–560 (2016).
2. Dittmer, A. & Dittmer, J. β -Actin is not a reliable loading control in Western blot analysis. *Electrophoresis* **27**, 2844–2845 (2006).
3. Aldridge, G. M. *et al.* The use of total protein stains as loading controls. **172**, 250–254 (2009).
4. Barber, R. D. *et al.* GAPDH as a housekeeping gene: Analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol. Genomics* **21**, 389–395 (2005).
5. Li, R. & Shen, Y. An old method facing a new challenge: Re-visiting housekeeping proteins as internal reference control for neuroscience research. *Life Sci.* **92**, 747–751 (2013).
6. Bass, J. J. *et al.* An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scand. J. Med. Sci. Sport.* **27**, 4–25 (2017).
7. Greer, S. *et al.* Housekeeping genes; expression levels may change with density of cultured cells. *J. Immunol. Methods* **355**, 76–79 (2010).
8. Beale, S. C. *et al.* Application of 3-(2-furoyl)quinoline-2-carbaldehyde as a fluorogenic reagent for the analysis of primary amines by liquid chromatography with laser-induced fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* **499**, 579–587 (1990).

致谢

感谢Greg Kilmer为本研究提供HeLa IVT细胞裂解液, 感谢Brian Webb及Thermo Fisher Scientific为我们提供支持。同时, 感谢Alok Tomar和David Piper为本文提供指导及文稿审核。

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