

荧光蛋白质免疫印迹—多重成像检测指南

成像系统和荧光染料的改进为科学家们提供了更有力的工具，使他们可以利用蛋白质免疫印迹技术挖掘更多数据。荧光蛋白质免疫印迹提供准确定量的结果和稳定的信号，并且能够在单张印迹膜上检测多个目标蛋白，这就是所说的多重成像检测。多重检测有助于使研究更高和更多产，例如，可以同时观察到目标蛋白和上样内参蛋白（图1），区分具有相似分子量的蛋白质（图2），并评价复杂的生物学通路（图3）。在多重检测中，同时检测2种目标蛋白称为二重实验，同时检测3种目标蛋白称为三重实验，以此类推。使用Invitrogen™ iBright™ FL1500成像系统并进行适当实验设计，最多可进行4重荧光蛋白质免疫印迹检测（图4）。在本指南中，我们将分享成功进行多重荧光蛋白质免疫印迹检测的最佳实践和技巧。

开始前的重要提示

在开始多重检测实验之前，请考虑以下几点以尽量减少背景荧光：

- 为了消除背景荧光的主要来源，需要使用具有低自发荧光的转印膜，例如硝酸纤维素膜或低荧光PVDF膜（货号22860）。
- 处理膜时必须佩戴手套并使用清洁的圆头镊子，尽量避免膜上出现可能会增强背景荧光并造成荧光伪迹的污染和刮痕。
- 使用高质量的已过滤缓冲液（例如，Thermo Scientific™ Blocker™ FL荧光封闭缓冲液（货号37565））。封闭和洗涤缓冲液中的微粒和污染物可能会遗留在膜上并产生荧光伪迹。另外，在封闭去污步骤中谨慎使用去污剂，因为普通的去污剂会自发荧光，可能增强非特异性背景。

- 样品缓冲液可能含有自发荧光的组分（如溴酚蓝），这可能会增强背景。我们建议使用荧光相容性样品缓冲液（例如，Invitrogen™ 荧光兼容型上样缓冲液，货号LC2570）。
- 如果蛋白marker中含有用荧光基团标记的蛋白质，或者在某些波长下会发出荧光的化合物染色的蛋白质，在凝胶电泳中则可减少上样量。过量上样可能会遮挡邻近泳道中的信号。建议使用Invitrogen™ iBright™ 预染蛋白质marker（货号LC5615）进行多重荧光检测。一般情况下，只需2–4 μL iBright预染蛋白质marker即可进行可视化和荧光检测。

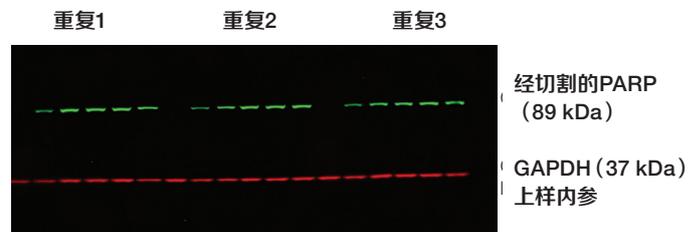


图1.同时检测目标蛋白和上样内参蛋白。在不同的荧光通道中捕获不同蛋白质的信号，从而能够在单张印迹膜上检测两种蛋白质，而不需要进行剥离和重新检测。所示图像为来自每个探针的信号叠加图。

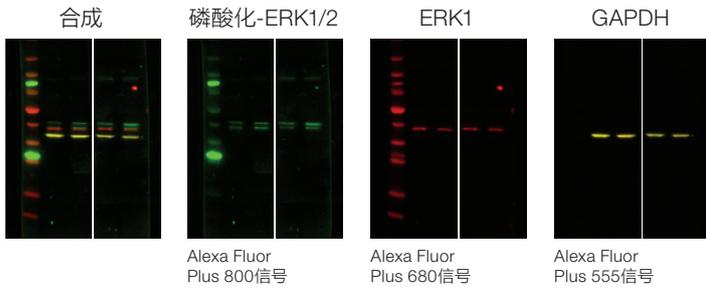


图2.相似分子量靶标的检测。荧光多重检测可以在同一印迹膜上清楚地区分多个靶标,即使它们的分子量相似。所示图像为叠加图像和各个靶蛋白质的单色信号图像。在某些情况下,将各个靶蛋白质的信号可视化可以评估在叠加图像中可能难以看到的细节。

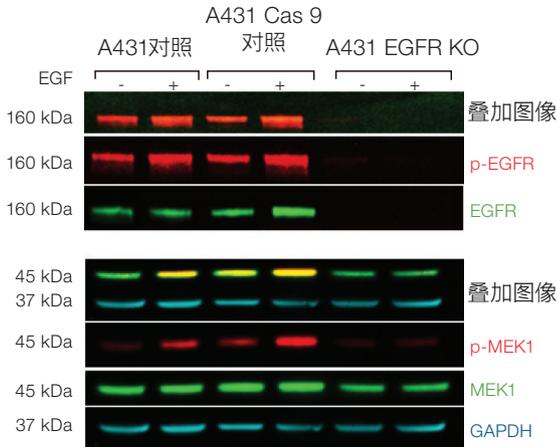


图3.研究复杂的生物信号通路。在对A431 EGFR敲除(KO)细胞进行EGF处理后,对EGFR及其下游靶标MEK1的磷酸化进行蛋白质印迹分析。

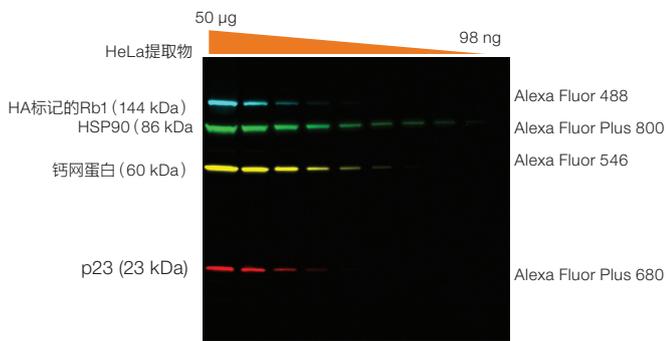


图4.iBright FL1500系统进行4重蛋白质免疫印迹图像。



提示: 使用供应商提供靶特异性验证和确认的抗体,以确保抗体与正确的靶标结合并节省确认时间。有关Invitrogen™抗体的两步验证*测试方法的更多信息,请访问 thermofisher.com/antibodyvalidation

抗体选择

在设计荧光蛋白质免疫印迹多重检测实验时,选择合适的一抗和荧光标记的二抗至关重要。以下是一些需要考虑的因素:

- 选择专门用于蛋白质免疫印迹的抗体或将蛋白质免疫印迹列入应用范围的抗体。在与其他靶蛋白进行多重检测之前,单独验证每个靶蛋白质。这一验证可以使您在进行多重检测实验之前确定每种抗体的带型。
- 使用来自不同宿主的一抗标记每种待测靶蛋白。理想情况下,使用来自两个远亲物种(如大鼠和兔子)的抗体组合,应避免小鼠和大鼠或山羊和绵羊之类的抗体组合。这将有助于选择合适的二抗以尽量减少潜在的抗体交叉反应性,抗体交叉反应性可能导致混乱的实验结果。
- 如果您的蛋白质是表位标签蛋白(例如,6xHis、HA),那么您可以使用针对表位标签的荧光直标一抗。一抗会直接与荧光基团偶联,而不需要使用荧光基团偶联的二抗。这可以最大程度地减少多重检测实验中所需的二抗的数量,但是仍然需要特别注意一抗宿主的选择,以防止二抗与实验中使用的其他一抗产生交叉反应。如果市场上不提供特定的直标偶联物,也可以使用荧光标记试剂盒进行标记。
- 如果难以区分一抗宿主,可以使用单特异性抗体(IgM、IgG等)或亚型(IgG1、IgG2a等)的抗体,以及仅识别该抗体的宿主或亚型的相关二抗。如果您不确定抗体的特异性,请联系您的抗体供应商以获取更多信息。
- 此外,可以使用高交叉吸附的二抗。交叉吸附是一个纯化过程,有助于消除抗体混合物中的非特异性抗体,例如特定类别、亚型或宿主的抗体。如果您不确定二抗的潜在交叉反应性,请联系您的抗体供应商以获取更多信息。

*“验证”一词或其任何变形的使用仅指用于功能测试的研究用途抗体,旨在确认该抗体是否可用于指定研究技术。其不能确保产品已经过临床或诊断用途验证。

滤光片和荧光基团的选择

在蛋白质免疫印迹多重检测中,理想的情况是,在消除荧光探针之间的任何干扰的条件下,单独捕获每种目标蛋白的条带,之后进行图像叠加。因此,有必要在检测开始之前了解蛋白质免疫印迹成像仪的配置,最重要的是了解可用的激发和发射滤光片。许多成像系统使用激发和发射滤光片的组合,可以选择这些组合形成窄谱范围的光波,激发荧光基团,使特定荧光基团发射荧光以进入探测器中。有些仪器也会使用独立的窄谱光源代替滤光片进行激发。所使用的激发和发射条件的特定组合通常被称为“通道”或“层”,滤光片决定了可以单独成像的荧光基团。在不同的仪器中,可用的滤光片可能已安装或需要安装(有关iBright FL1500成像系统中预安装的滤光片,请参见表1)。使用配备有激发和发射滤光片的特定成像仪,利用荧光光谱查看器(thermofisher.com/spectraviewer)等工具查看可用的荧光基团之间的激发和发射光谱叠加图。理想情况下,在多重荧光成像实验中使用的不同荧光基团,其通过成像系统滤光片捕获的激发光谱或发射光谱的波长区域会有所差异。注意,激发或发射光谱中只需有一个存在区域差异(而非两者都有差异)。图5显示了激发和发射光谱高度重叠的两个荧光基团的示例。图6显示了具有最小激发光谱重叠的荧光基团组合的示例。图7显示了具有最小发射光谱重叠的荧光基团组合的示例。

表1.iBright FL1500成像系统滤光片。

激发通道	滤光范围 (nm)	发射通道	滤光范围 (nm)	可检测的荧光基团的示例
EX1	455-485	EM1	510-555	Alexa Fluor 488, Alexa Fluor Plus 488
EX2	515-545	EM2	565-615	Alexa Fluor 546, Alexa Fluor Plus 555
EX3	610-635	EM3	675-720	Alexa Fluor 647, Alexa Fluor Plus 647
EX4	655-680	EM4	725-750	Alexa Fluor 680, Alexa Fluor Plus 680
EX5	745-765	EM5	810-850	Alexa Fluor 790, Alexa Fluor Plus 800

注:避免在多重检测实验中同时使用EX3/EM3和EX4/EM4通道,因为这些通道中捕获的荧光基团的光谱重叠程度很高



提示:使用iBright FL1500成像系统成像时,对于低丰度靶标,使用较亮的低波长荧光基团(例如,Invitrogen™ Alexa Fluor™ 546和Alexa Fluor Plus 647探针),相反,对于高丰度靶标,使用较高波长荧光基团(例如, Alexa Fluor Plus 680和Alexa Fluor Plus 800探针)。

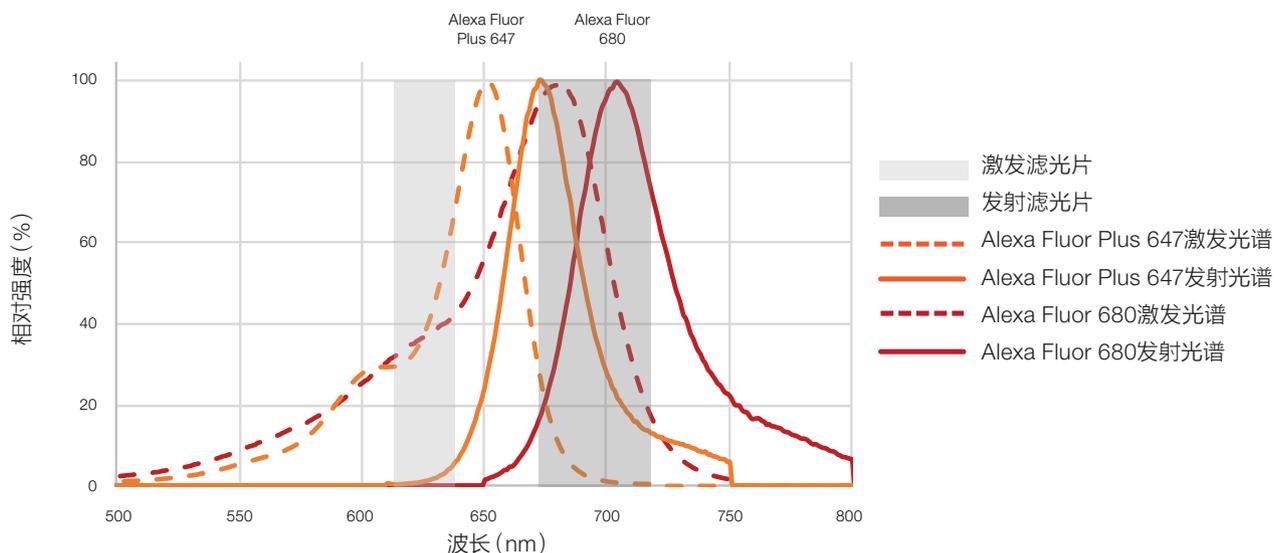


图5. 明显光谱重叠的示例。上图为在线荧光光谱查看器生成的图像,该示例中, Alexa Fluor Plus 647和Alexa Fluor 680荧光基团的部分激发和发射光谱都在激发和发射滤光片的范围内,因此会同时激发两种荧光基团,此时,它们发射的荧光都会到达摄像头的探测器,导致难以区分检测到的荧光的来源。

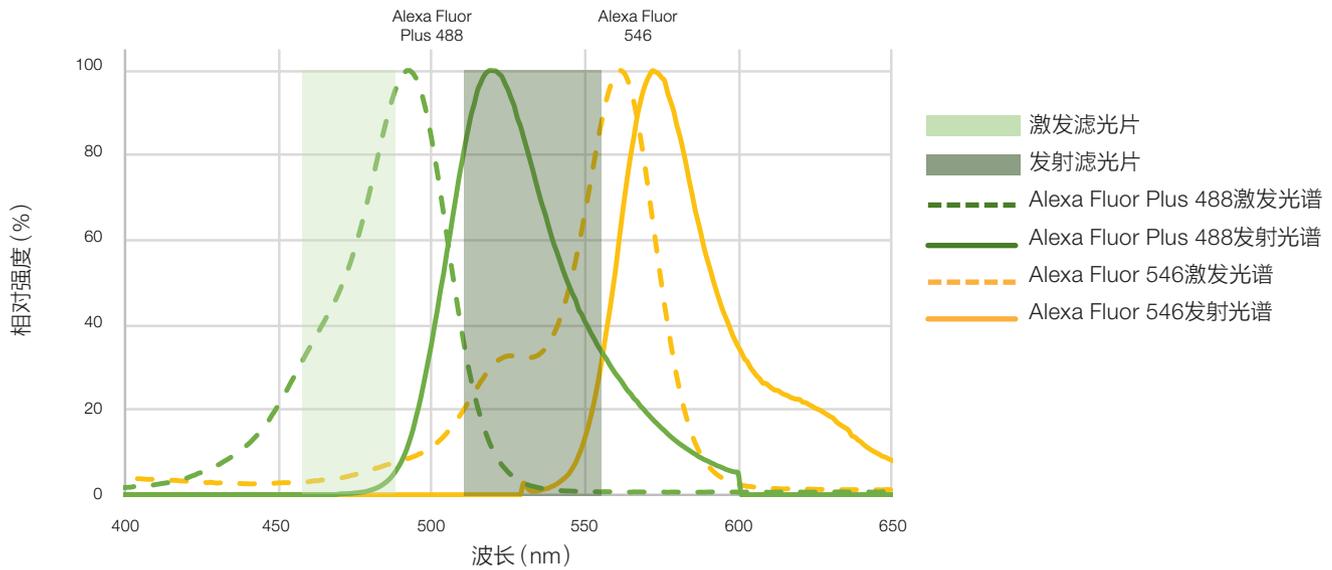


图6. 用精心挑选的具有不同激发光谱的荧光基团进行多重检测实验的示例。上图为荧光光谱查看器生成的图像, 该示例中, Alexa Fluor Plus 488和Alexa Fluor 546荧光基团的激发光谱 (虚线) 在激发滤光片的范围内具有最小重叠。尽管两种荧光基团的部分发射光谱 (实线) 都在发射滤光片的范围内, 但Alexa Fluor 546不会被用于Alexa Fluor Plus 488的激发滤光片所激发, 因此来自Alexa Fluor 546的荧光不会通过发射滤光片。

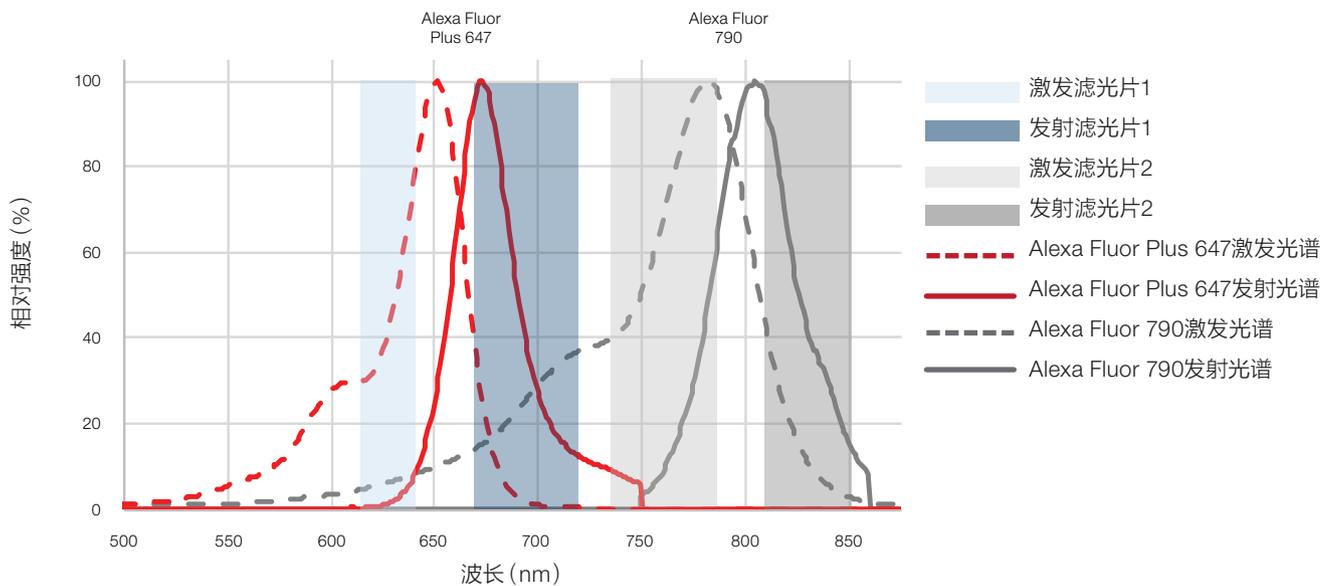


图7. 用精心挑选的具有不同发射光谱的荧光基团进行多重检测实验的示例。上图为荧光光谱查看器生成的图像, 该示例中, Alexa Fluor Plus 680和Alexa Fluor 790的发射光谱 (实线) 在两种发射滤光片的范围内无重叠。尽管两种荧光团在激发滤光片1的范围内具有部分激发光谱 (虚线) 重叠, 但在该激发范围内产生的任何Alexa Fluor 790荧光的波长都不能通过发射滤光片1, 因此来自Alexa Fluor 790的荧光将无法到达该通道中的摄像头探测器。

荧光蛋白质免疫印迹多重检测的一般步骤

材料

- 硝酸纤维素膜或低荧光PVDF膜 (货号88018、22860, 或同类产品)
- 经过滤的封闭缓冲液, 如封闭剂FL荧光封闭缓冲液 (货号37565)
- 洗涤缓冲液, 如含0.05% Tween™ 20的Thermo Scientific™ Tris缓冲或磷酸盐缓冲盐水 (货号28360或28352)

- 孵育盘和容器 (如Thermo Scientific™ Mini或Midi凝胶孵育盘 (货号22843或22841))
- 来自不同物种的Invitrogen™一抗
- Invitrogen™荧光标记的高度交叉吸附的二抗
- iBright FL1500成像系统或其他设计用于荧光印迹成像的系统

方案

免疫检测

1. 蛋白质转印后, 用去离子水洗涤4次, 每次5分钟, 以平衡转印膜。
2. 在室温下用充足体积的封闭缓冲液 (以封闭非特异性结合位点) 孵育膜30分钟。

用范围可能会因仪器的不同而有所差别。与传统的Alexa Fluor二抗相比, AlexaFluor Plus二抗 (thermofisher.com/alexafluorplus) 可实现荧光蛋白质免疫印迹的高信噪比和低交叉反应性, 因此所需优化时间较少 (表2)。



提示: 对于mini印迹应当使用容积至少15 mL的孵育盘, 对于midi印迹应当使用容积30 mL的孵育盘, 以将膜完全覆盖。避免使用较少体积, 因为覆盖的不一致会导致背景荧光较高或不均匀。

3. 在封闭缓冲液中将所有浓度已优化的一抗混合在一起。将膜的蛋白质面朝上, 置于一抗溶液中, 孵育, 室温下1小时或在2-8°C下过夜孵育。确保抗体溶液的体积足以完全覆盖膜。
4. 用含有0.05% Tween 20的洗涤缓冲液洗涤膜3次, 每次10分钟。如果使用荧光偶联的一抗, 则转到步骤7。

表2.iBright FL1500成像系统可检测到的多重检测荧光基团组合的示例。

荧光基团组合示例				
靶标数量	荧光基团1	荧光基团2	荧光基团3	荧光基团4
1	Alexa Fluor Plus 647			
2	Alexa Fluor Plus 647	Alexa Fluor 546		
3	Alexa Fluor Plus 647	Alexa Fluor 546	Alexa Fluor Plus 488	
4	Alexa Fluor Plus 647	Alexa Fluor 546	Alexa Fluor Plus 488	Alexa Fluor 790



提示: 过量使用的二抗可导致高背景或信号淬灭。

5. 在洗涤缓冲液中将所有浓度已优化的二抗混合在一起。需要进行优化以获得每种二抗的最佳信噪比, 但无论是哪一种荧光偶联物, iBright FL1500系统上成像的典型推荐范围都为0.4至0.1µg/mL (1:5000至1:20000)。适

6. 将膜的蛋白质面朝上, 置于二抗溶液中, 在室温下孵育1小时。确保抗体溶液的体积足以完全覆盖膜, 避光以防止荧光染料的光漂白。
7. 在洗涤缓冲液中洗涤膜6次, 每次5分钟, 以去除任何未结合的二抗。务必彻底洗涤膜。
8. 可在印迹膜仍然湿润时立即对其进行成像, 或在其变干后进行成像。在成像前将印迹膜放入文件保护袋中或放在清洁表面上以防止污染。
9. 在iBright FL1500系统上使用适当的检测通道和Smart Exposure功能, 或使用同品种成像仪进行成像。

故障排除

问题	可能原因	解决方案
信号弱或无信号	一抗数量不足	<ul style="list-style-type: none"> 增加一抗浓度 确保一抗具有良好的滴度, 并且具有待测蛋白质/表位特异性 将孵育时间延长至4°C
	抗体活性丧失	<ul style="list-style-type: none"> 确保抗体得到妥善保存 检查抗体的有效期 避免多次使用预稀释的抗体
	曝光时间过短	<ul style="list-style-type: none"> 增加曝光时间 使用iBright FL1500系统上的Smart Exposure功能, 或其他仪器上的类似自动曝光功能
	仪器设置错误	<ul style="list-style-type: none"> 确保为目标荧光基团选择正确的激发和发射范围
	使用去污剂	<ul style="list-style-type: none"> 去污剂过量, 或去污剂的性质会导致洗掉信号——减少或不使用去污剂
	封闭缓冲液封闭表位	<ul style="list-style-type: none"> 一些封闭溶液可能遮盖印迹并降低抗体表位的可用性, 特别是如果封闭步骤>1h时 在洗涤缓冲液中稀释一抗 使用其他封闭缓冲液
	电泳时的上样量	<ul style="list-style-type: none"> 裂解液过少导致目标蛋白量不足 对裂解液或样品进行连续稀释, 以确定蛋白质的最佳上样量
	蛋白质转印不良或转印后蛋白质丢失	<ul style="list-style-type: none"> 检查转印条件以确认蛋白质转印 在检测新蛋白质时可能需要重新优化
非特异性条带	目标靶标的抗体特异性差	<ul style="list-style-type: none"> 使用其他一抗; 如需查看技巧请登录thermofisher.com/antibodyvalidation
	样品完整性差	<ul style="list-style-type: none"> 由于过热或蛋白酶活性导致样品降解, 造成靶标分解并且抗体对靶标的识别能力降低
	多重检测中的抗体交叉反应性	<ul style="list-style-type: none"> 选择来源于远亲物种宿主的一抗 使用高度交叉吸附的二抗偶联物 在不影响性能的情况下减少二抗的使用量
	多重检测时出现另一个通道的荧光渗透(出现意外条带)	<ul style="list-style-type: none"> 使用荧光光谱查看器等工具可视化荧光基团光谱, 避免使用光谱接近的荧光基团, 特别是当信号非常强时 确保成像仪能够清晰地检测到荧光染料 使用仪器上的自动曝光功能确定每个通道的最佳曝光时间
背景问题(高、不均匀或有斑点)	膜污染导致背景高	<ul style="list-style-type: none"> 使用干净的盘子、托盘和圆头镊子小心处理转印膜 为您的应用选择最佳的封闭缓冲液——一抗在不同的封闭缓冲液中会有不同的反应; 诸如正常动物血清或脱脂牛奶的封闭溶液可能导致交叉反应
	过度上样蛋白质标记物或marker造成伪迹	<ul style="list-style-type: none"> 减少凝胶上蛋白marker的上样量
	洗涤液或稀释液不当	<ul style="list-style-type: none"> 使用含0.1-0.2% Tween 20的洗涤缓冲液 使用0.05% Tween 20制备二抗稀释液 增加洗涤步骤的次数或持续时间
	过量二抗导致高背景	<ul style="list-style-type: none"> 遵循供应商建议的稀释度并相应调整, 根据所用染料优化二级抗体稀释液
	由于膜干燥而导致背景有斑点或不均匀	<ul style="list-style-type: none"> 在所有孵育步骤中确保整个印迹完整覆盖 确保在每个孵育步骤中持续覆盖和混匀
	所选膜不正确	<ul style="list-style-type: none"> 膜类型会影响背景; 例如, 标准PVDF膜可以自发荧光并导致高背景, 因此需使用低荧光PVDF膜
	膜上有斑点和指纹	<ul style="list-style-type: none"> 使用干净的圆头镊处理膜, 避免直接接触膜; 来自不干净工具的微粒和污染物会发出荧光 使用干净的孵育盘和培养皿——用甲醇清洗后再用清水冲洗, 有助于溶解先前使用时残留的已变干染料 如果使用湿转法, 请清洁转印器械和易积尘的耗材(例如衬垫), 因为它们可能引起斑点 在放置成像印迹之前, 用乙醇清洁成像仪表面以去除灰尘、棉绒和残留物

有关iBright FL1500系统的更多信息请访问 thermofisher.com/ibright



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

Thermo Fisher
SCIENTIFIC