

应用 ScanLater 免疫印迹蛋白质梯估计蛋白质的分子量

优点:

- 简单的一套的标准品就可以满足凝胶可视、膜定位和时间分辨荧光检测
- 蛋白质都已经被生物素标记
- 可以检测待测物的分子量
- 无需混匀和加热

简介:

ScanLater 免疫印迹蛋白质梯是 ScanLater 免疫印迹蛋白质检测系统必不可少的一项组成。蛋白质梯最初是应用于蛋白质分子定量，凝胶电泳的可视化，已经评估转膜的过程。

ScanLater免疫印迹蛋白质梯由7个生物素标记的重组蛋白，以及3个预染的蛋白质marker组成。实验通过在二抗阶段加入铈标记的链霉亲和素，从而实现生物素标记蛋白的检测。标记好的膜可以通过安装在SpectraMax i3x 或SpectraMax Paradigm多功能酶标仪上的ScanLater免疫印迹蛋白质检测卡盒进行读取。

ScanLater 免疫印迹蛋白质梯:

ScanLater免疫印迹蛋白质梯包含7个生物素标记的重组蛋白，分子量分别为10、20、40、50、80、100和140KD。它们的检测是通过将膜与铈标记的链霉亲和素一起孵育，并在ScanLater免疫印迹蛋白质检测系统上以亮颜色条带显示（图表1，左边）。另外，这里还包括三个可见的预染好的marker，分别是18、31和70KD（图表1，右边）。这些蓝色的条带在电泳的胶条上、在转膜后都清晰可见。它们在ScanLater免疫印迹蛋白质检测系统上也会呈现暗色的条带。我们通过图表2上所示的实验比较了一组参照标准曲线，以此来确定生物素标记阶梯蛋白的分子量与它们在胶条上的迁移距离的线性关系。

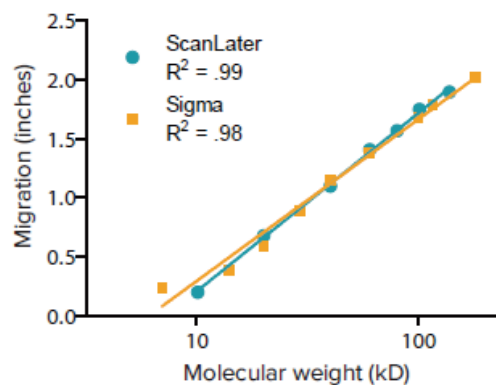
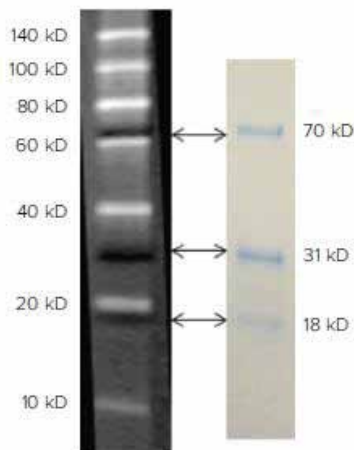


图1: ScanLater免疫印迹蛋白质梯。白色的条带表示用于检测膜上蛋白分子量的生物素标记的蛋白。在和铈标记的链霉亲和素孵育后，便可用ScanLater免疫印迹蛋白质检测系统进行读取。暗色的条带是预染蛋白，用以监测蛋白质电泳、杂交定位和转膜效率。在这些过程中，这些蓝色的条带都是肉眼可见的。

图2: 迁移vs分子量。将7个蛋白在ScanLater免疫印迹蛋白质梯上的迁移距离绘制及拟合为各自的分子量的函数。其线性关系与购置于Sigma公司的参照蛋白（货号.#B2787）结果相类似。

ScanLater免疫印迹蛋白质检测方法:

ScanLater免疫印迹蛋白质检测的流程在进行二抗孵育以前，都参照标准的跑胶和转膜方法。然后随着目标蛋白样本，在胶条的一列加入4ul ScanLater免疫印迹蛋白质梯。不需要额外的加热或其他准备步骤。在与一抗孵育后，进行封闭和洗膜，然后都以1:5000孵育铈标记的链霉亲和素和铈标记的二抗。铈标记的链霉亲和素结合在蛋白阶梯上，然后铈标记的二抗特异性的结合在连接目的蛋白的一抗上。标记好的膜可以通过安装在SpectraMax i3x或SpectraMax Paradigm多功能酶标仪上的ScanLater免疫印迹蛋白质检测卡盒进行读取，这种卡盒是利用了时间分辨荧光技术（TRF）检测铈元素。时间分辨荧光检测可以显著降低自发荧光、或者其他半衰期较短的发射光的背景噪音。同时也有效避免了化学发光和传统荧光检测中常出现的过曝情况；因此这个体系可以提供高信噪比的尖锐条带。由于这个方法不涉及酶反应，消除了蛋白定量中的固有变异性。另外，因为铈元素有抗光漂白作用，所以膜上的信号可以保持数周到一个月，并可以反复进行读取。ScanLater免疫印迹蛋白质检测系统，包括ScanLater免疫印迹蛋白质梯，作为一种简单、灵敏和稳定的检测平台，给多功能酶标仪提供了出色的蛋白质分析能力。

未知蛋白的可视化检测:

以下两种分别检测白介素-17和热休克蛋白的实验，都为ScanLater免疫印迹蛋白质梯如何进行蛋白质分子量评估提供了很好的依据。

白介素 17

将白介素-17（IL-17）上样在4-20%梯度凝胶的1X缓冲液中跑30分钟。将ScanLater免疫印迹蛋白质梯也放于相同的胶上。蛋白质将会转移到荧光膜上，并与抗大鼠的IL-17过夜孵育，然后孵育1:5000的ScanLater铈标记抗大鼠IgG和1:5000的ScanLater铈标记抗链霉亲和素抗体。如图3a所示，当膜被清洗、晾干后，就可以通过安装在SpectraMax i3x多功能酶标仪上的ScanLater免疫印迹蛋白质检测卡盒进行读取了。通过ScanLater免疫印迹蛋白质梯确定IL-17的分子量为14KD，与实际发表的分子量15KD近似。

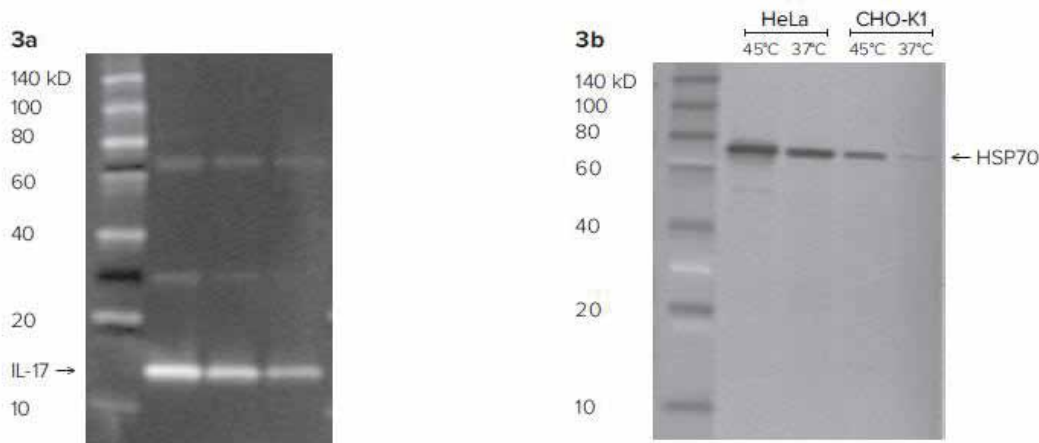
热休克蛋白

热休克蛋白(HSP70)是当细胞暴露在高于正常孵育温度下诱导产生的。在这项研究中，我们将CHO-K1细胞和HeLa细胞暴露在45摄氏度45-90分钟，然后等6个小时后收集细胞提取物。最后将5ul提取物上样在4-20%梯度凝胶中进行电泳，4ulScanLater免疫印迹蛋白质梯也放于相同的胶上。转膜后，对膜进行封闭、清洗，并与抗小鼠的HSP70过夜孵育，然后孵育铈标记抗小鼠IgG1小时。在这个实验中，蛋白阶梯与抗铈标记抗链霉亲和素分开孵育。如图3 b中的反向图所示，预染的标准品显示灰白色条带，因为染色淬灭了时间分辨荧光信号。

两个细胞系显示HSP70随着温度的增加而增加。根据ScanLater免疫印迹蛋白质梯估计, 相比之下表明蛋白HSP70分子量大约是70 KD。

总结

ScanLater免疫印迹蛋白质梯可以实现用亮条带评估分子大小(图表1), 同时可以为凝胶电泳、转膜和转膜后提供可见的指标。这个系统允许用户使用为了他们的应用而优化过的电泳和免疫印迹流程。孵育时建议使用铈标记抗链霉亲和素和铈标记的二抗的蛋白酶抑制剂, 这样当使用SpectraMax i3x 多功能酶标仪进行读取时, 可以有效降低蛋白阶梯和目的条带的时间分辨荧光检测背景。图像都利用SoftMax Pro软件进行采集, 并且软件可以集成导出到一个自定义的Excel中进行定量分析。随着ScanLater免疫印迹蛋白质梯的引入, ScanLater免疫印迹蛋白质检测系统为多功能酶标仪提供了更加出色的灵敏度和蛋白质分析能力。



图表3: (3a) IL-17分子量评估。使用ScanLater免疫印迹蛋白质梯评估IL-17的分子量。(3b) 免疫印迹显示HSP70的增加。免疫印迹显示当细胞暴露在高于正常孵育温度下时HSP70呈增加趋势。评估的分子量大约是70 KD左右。



扫一扫关注我们的官方微信