

采用 Ettan DIGE Imager 检测荧光蛋白印迹系统的多重荧光信号

J. Goscinski and I. Gottschalk
GE Healthcare, Uppsala, Sweden

Ettan™ DIGE Imager 和 ECL Plex™ 系统完全兼容，在灵敏度、线性和动态范围上和 Typhoon™ 扫描仪达到了相同水平。在多重荧光应用上这两种扫描仪也有相似的结果，同一次蛋白印迹实验中检测两种蛋白时，抗体或者染料间的交叉反应降到最低。

引言

ECL Plex 多重荧光蛋白印迹系统基于 CyDye™ 偶联抗体的灵敏度，能够高线性地在皮克 (10^{-12} 克) 范围进行检测，动态范围几乎达到 4 个量级 (1, 2)。多重荧光检测是 ECL Plex 系统另一个重要特点，能够同时检测两种蛋白质。

在 ECL Plex 试验中，数据的质量不仅仅取决于印迹，还要看所用的成像系统。现在，一种新的扫描 CCD 成像系统，Ettan DIGE Image 问世了。这是一款专门为双向荧光差异凝胶电泳 (2-D DIGE) 和 ECL Plex 系统而开发的成像系统，能够生成 Cy™2-，Cy3-，和 Cy5 标记的凝胶和蛋白印迹的多通道图像。

本研究比较了两种检测 ECL Plex 系统的扫描仪 Typhoon 和新的 Ettan DIGE Imager。在多重荧光分析中，分别用 Hybond™ ECL (硝酸纤维素) 和新的低荧光 Hybond-LFP (PVDF) 膜检测两种 CyDye 偶联物。两种扫描仪的印迹扫描结果相似，检测都很灵敏且动态范围宽。应用 ECL Plex 系统检测 TGF- 活化的细胞，也可见两种扫描仪都能给出定量的数据。

方法

多重荧光模式系统

把人类转铁蛋白 (Calbiochem) 和牛心肌肌动蛋白 (Sigma-Aldrich) 的蛋白质混合物上样到 Novex™ 12% Tris-glycine 凝胶 (Invitrogen)，转铁蛋白四倍稀释上样量从 5 ng 到 1.2 pg，肌动蛋白两倍稀释上样量从 150 ng 到 2.34 ng。用 miniVE 垂直电泳系统，100 V，电泳 2.5 小时。

电泳分离完毕后，采用 TE 22 Mini 小型全湿转印系统在 25 V 电压下用 2.5 小时将蛋白转印到 Hybond ECL (低荧光硝酸纤维素) 或者 Hybond-LFP (低荧光 PVDF) 膜上，然后，用 PBS + 0.1% Tween™ 20 (PBST) 的封闭液 4 °C 过夜孵育。

封闭后，把蛋白膜用“兔抗人”转铁蛋白 (Dako Cytomation) 和“鼠抗牛”肌动蛋白 (Sigma-Aldrich) 一抗混合物 (用 PBST 稀释到 1:750) 室温孵育 1.5 小时。用 PBST 洗涤后，把蛋白膜放在 ECL Plex Cy5 偶联的羊抗兔 IgG 和 ECL Plex Cy3 偶联的羊抗鼠 IgG (都用 PBST 稀释到 1:2500) 二抗混合物中，在侧摆摇床上室温避光孵育 1 小时。

然后把蛋白膜在 Ettan DIGE Imager 和 Typhoon 多功能扫描仪上扫描，使用 Cy3 和 Cy5 适合的波长和滤光器用 Typhoon 一次扫描。分析两种 CyDye 偶联抗体的检测极限和交叉反应。

多重荧光应用

TGF- 是一种有效的生长因子，可以刺激多种细胞效应，如生长抑制、细胞分化和凋亡。这里用 TGF- 活化人类 T293 肾上皮细胞，并在不同时间点收获细胞。准备这些细胞的裂解液，凝胶电泳分离，转印到 Hybond ECL 和 Hybond-LFP 膜上，然后按照前述步骤进行抗体杂交，靶蛋白是 p38 的磷酸化构型 (pp38)，它是一个介导 TGF- 活化功能的低丰度蛋白。一抗是抗肌动蛋白的单克隆抗体 (Sigma-Aldrich) 和磷酸化-p38 MAP 激酶抗体 (Cell Signalling)，对应的二抗分别为 ECL Plex Cy3 偶联的羊抗鼠 IgG 和 ECL Plex Cy5 偶联的羊抗兔 IgG。

结果和讨论

模式系统

用 ECL Plex Cy3 偶联的羊抗鼠 IgG 和 ECL Plex Cy5 偶联的羊抗兔 IgG 荧光抗体混合物在同一次蛋白印迹中同时检测肌动蛋白和转铁蛋白。分别在两种膜 (Hybond ECL 和 Hybond-LFP) 上进行杂交，每种膜都分别在 Ettan DIGE Imager 和 Typhoon 扫描仪上扫描。图 1 显示了来自 Cy3 (绿) 和 Cy5 (红) 两个通道的叠加图。Ettan DIGE Imager 和 Typhoon 扫描仪的检测极限相同，证明了 Ettan DIGE Imager 的性能很高。

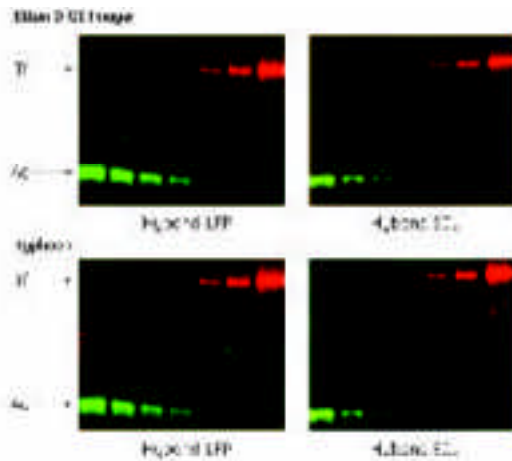


图 1. ECL Plex 多重荧光模式系统, 将转铁蛋白 (Tf) 和肌动蛋白 (Ac) 转印到 Hybond-LFP 和 Hybond ECL 膜上。同时用 ECL Plex Cy3 偶联的羊抗鼠 IgG 和 ECL Plex Cy5 偶联的羊抗兔 IgG 检测。蛋白膜用 Etnan DIGE Imager (上) 和 Typhoon 9410 (下) 进行扫描。再将 Cy3 和 Cy5 通道的图像叠加。

应用

除了多重荧光模式系统外, 我们还检测了两种扫描仪的多重荧光应用。图 2 显示的是 ECL Plex 系统应用于 TGF- β 介导的磷酸化的检测结果。一株 TGF- β 活化的细胞系用肌动蛋白和 pp38 的抗体探测, 指示 p38 的磷酸化程度。对活化量也进行了检测, 结果可见 TGF- β 刺激的时间越长 pp38 越多。比较 Etnan DIGE Imager 和 Typhoon 扫描仪的结果可知, 二者都能给出定量数据 (图 2)。这些结果清晰地表明 ECL Plex 系统和 Etnan DIGE Imager 相结合具有强大的定量检测功能。

结论

Etnan DIGE Imager 的良好性能已得到充分的证实。Etnan DIGE Imager 和 ECL Plex 系统完全兼容。Etnan DIGE Imager 拥有和 Typhoon 扫描仪相似或者说是相同水平的检测极限。在多重荧光应用中, Etnan DIGE Imager 的性能可以和 Typhoon 扫描仪媲美。

参考文献

1. Application note: Multiplex protein detection using the ECL Plex fluorescent Western blotting system, 28-4015-40, Edition AA (2005).
2. Application note: Multiplex protein detection with the ECL Plex fluorescent Western blotting system using the Etnan DIGE Imager, 28-4041-97, Edition AA (2005).

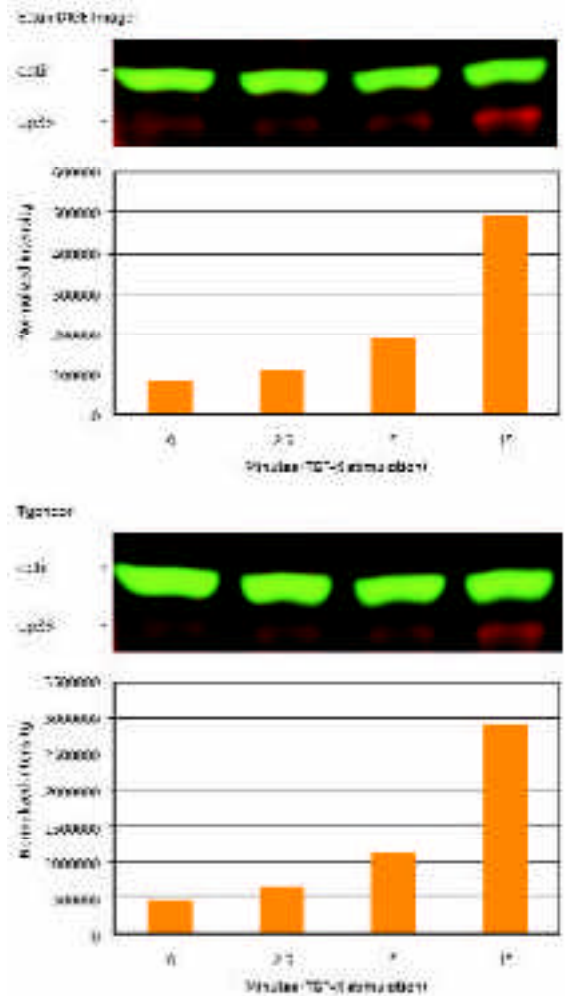


图 2. 用 TGF- β 刺激 T293 细胞 0, 2.5, 5 或者 15 分钟。在 Hybond-LFP 膜上, 用牛肌动蛋白单克隆抗体和磷酸化 p38 MAP 激酶抗体, 分别检测总蛋白 (肌动蛋白) 和磷酸化的 p38, 再用相应的 ECL Plex 的二抗进行杂交。Etnan DIGE Imager (上) 和 Typhoon 扫描仪 (下) 显示 Cy3 (绿) 和 Cy5 (红) 叠加图。下面的图表是每个泳道分别用肌动蛋白总量归一化后, pp38 相对强度。

订购信息

产品	货号
ECL Plex Cy3 偶联的羊抗鼠 IgG, 150 μ g	PA43009
ECL Plex Cy5 偶联的羊抗兔 IgG, 150 μ g	PA45011
Hybond ECL, 20 cm \times 3 m	RPN203D
Hybond-LFP, 20 \times 20 cm, 10 张	RPN2020LFP
miniVE 垂直电泳系统	80-6418-77
EPS 301 电泳仪	18-1130-01
TE 22 小型全湿蛋白印迹系统	80-6204-26
Etnan DIGE Imager, 包括安装工具	63-0056-42
Etnan DIGE Imager Cassette, 带低荧光玻璃, 用于裸胶	11-0027-33
Typhoon 9410 (包括 ImageQuant TM TL 软件)	9410-PC