

Western Blot 中的新仪器 (Updated)



二十年来, Western blot 的步骤一直都没有什么大的改变, 大家还是沿用分子克隆上的技术和试剂。不过, 幸好有一些新产品不断涌现, 能大大提高我们的实验效率和效果。现在 Western blot 中的趋势是荧光和化学发光检测、准确定量蛋白、自动化操作、自动冷却转印系统和 CCD 成像系统。大家一直以来可能关注试剂比较多, 不过下面提到的这些新仪器, 也可以让 Western blot 更快速、更方便呢。

让转膜不再沉闷

其实 Western blot 的原理看起来非常简单, 但就是过程很漫长, 电泳、转膜、封闭、孵育, 每一步都得花一两个小时。如果只是偶尔为之还好, 但那些 WB 达人, 几乎天天做, 就不知要奉献多少宝贵青春了。如果现在告诉你有一种转膜方法, 只需要 7 分钟, 你是不是会很开心。Invitrogen 的干式转印仪 iBlot 就真的做到了这一点。插一句, Invitrogen 的转印仪叫 iBlot, 核酸纯化仪叫 iPrep, 不知道它们和苹果的 iPhone、iPod 有没有关系。iBlot 是一台干式转印仪, 无需配制任何缓冲液, 只需要 5-7 分钟就能将蛋白转到 NC 膜或 PVDF 膜上。iBlot 能实现如此快的转印, 是因为 iBlot 转印仪和凝胶转印堆积层的配合, 可以产生高电场强度。凝胶转印堆积层 (包括 Top 和 Bottom 两块) 中含有阳极和阴极, 缓冲液和膜 (NC 膜或 PVDF 膜), 你只需放入你的胶 (Tris-Glycine、Tricine 或 NuPAGE 胶都可以), 赶走气泡, 就可以开始转印了, 再也不需要配制大量的缓冲液+等待 2 个小时, 可同时进行两块 mini-gel(8x8cm)或一块 midi-gel (8x13cm) 的转印。效率呢, 和我们常用的湿转相当或更好。如果再配合 Invitrogen 的 NuPAGE 胶和 WB 试剂盒, 只需要半天就能完成整个 WB 了, 效率那可是相当高啊。iBlot

的价格在 2 万元人民币左右, 作为仪器来说不算贵, 不过那个凝胶转印堆积层可是一次性的, 需要反复购买, 价格约是 100 多一块吧。

CCD 成像系统

CCD 表示电荷耦合装置, 它是由一种高感光度的半导体材料制成, 能把光线转变成电荷。随着冷却 CCD 技术的发展, 成像系统成本越来越低, 因而在现在的实验室里这些设备越来越普遍。目前几乎所有 Western blot 的新技术都是针对 CCD 成像系统的, 它代替了传统的胶片成像。胶片成像虽然比自然发光法灵敏度更高, 但也有很多缺点: 耗时, 需要暗房和显影剂, 胶片很贵, 而且是一个消耗品, 需要持续购买。另外, 用胶片上的蛋白条带进行定量几乎是“不可能的任务”, 和目测一块考马斯蓝染的胶没什么区别。冷却型 CCD 照相机与 X 胶片相比具有瞬时影像处理、高灵敏度、高分辨率、动力学范围广等优点, 而且还不需要胶片处理装置及暗室。然而, 这项技术要求底物能产生高强度长持续时间的信号, 以被照相机捕获到。不过这个也不是问题, GE、PIERCE、Bio-Rad、ABI 等公司都开发了信号能持续 24 小时的 Western blot 底物或试剂盒, 而且灵敏度都超高, 达到了飞克级别, 具体请看 [Western Blot 显色篇: 八仙过海, 各“显”神通](#)。

另外,现在的研究者们已经不满足于只是知道蛋白有没有,还想知道蛋白的量有多少,与其他蛋白相比是高还是低,定量的方法是否准确。多色的荧光Western blot可以满足研究者对于多蛋白分析的要求,使我们可以检测到电泳中重叠的蛋白条带,如果我们用传统的化学发光方法,是无法将它们分开的。多色荧光检测还可以增加定量的准确性。例如,你可以用一种荧光探针来标记目的蛋白,用另一种荧光探针作为上样量的标准化。这样,如果在某一泳道中你的目的蛋白量有显著的增加,你就可以判断到底是实验的原因,还是上样不准确造成的。GE的Amersham ECL Plex Western blotting系统,就可以在 1-D和 2-D Western blotting中进行多重检测,详细内容请看[多重 2-D Western blotting](#)和[内标](#)。另外,Invitrogen和PIERCE也提供同时检测两种蛋白的多重荧光Western blot试剂盒。

说到成像,连续三年获得生命科学产业成像分析系统大奖的 Bio-Rad 公司在这方面当然是技高一筹。它的 Molecular Imager VersaDoc 成像系统采用 Peltier 冷却的高分辨率数字 CCD 技术,并结合了独特的宽波长紫外激发光源及高效的光学设计,能提供卓越的灵敏度、均一性、灵活性及动态范围,在性能表现上可与更昂贵的以激光为基础的技术相媲美。VersaDoc 系统可用于分析广泛的样品,如凝胶、印迹膜、微孔板、TLC 板及放射自显影图像等。它们拥有 8 个发射滤光片位置,可有效地多通道检测标准品及未知样品。VersaDoc 系统有 2 种型号: 4000 型和 5000 型。4000 型提供最好的分辨率,5000 型提供最高的灵敏度。所有 2 种型号均包含 Quantity One 软件,以进行快速图像采集和定量分析。它能对各种染色或标记的核酸进行检测和定量,包括 EB、荧光素、Radiant 红、

SYBR Green、SYBR Gold 和德克萨斯红。也能对各种染色或标记的蛋白进行检测和定量,包括考马斯亮蓝、铜染色剂、SYPRO Ruby 及锌染色剂等。还能检测和定量其它荧光分子,包括 Cy2、Cy3、GFP 及罗丹明。并能应用于化学发光、化学荧光、比色和荧光等的印迹杂交中,包括所有辣根过氧化物酶 (HRP) 和碱性磷酸酶 (AP) 的底物。

同时,美国 Alpha Innotech 公司也推出了一种新型的 CCD 成像系统,使用荧光检测试剂对 Western blot 进行定量和分析。FluorChem Q 结合了化学发光的优势,能在一台定量 Western 成像仪器上对多种荧光染料(如 Cy 系列、Alexa Fluor 系列和 Qdot 等)进行成像。其他的荧光 Western blot 系统多是应用昂贵的激光检测系统,而 Fluorchem Q 是用多功能的 CCD 照相机,也具有同样的品质。它还是一个多用途的成像系统,不仅可以用来对传统和荧光 Western 进行拍照,还可以拍 EB 染色的 DNA 胶、考马斯蓝染色的蛋白胶,甚至是菌落平板,基本上实验室的所有的成像应用都可以使用。分析软件 AlphaView Q 可用于分析印迹膜或胶,而且可以储存分析步骤,迅速标准化上样对照,并能自动计算背景水平。

老牌的成像系统制造商 Syngene 则更是贴心,他们的口号是“不要再用胶片了,让我们来省钱吧”。而他们也确实做到了从客户的需求出发,帮客户省钱。它的化学发光和荧光成像系统 G:BOX 就提出了一个全新的理念,完全根据客户的要求来定制。这种创新使我们可以根据自己的用途和预算,自由选择几乎所有的成像系统组件,可谓看菜吃饭,量体裁衣啊。这样,我们就再也不用为不需要的部件掏钱了。

基本的G:BOX包括暗室、照相机/镜头座箱,你可以选择你想要的Syngene照相机、镜头和光源配件放置其中,以及GeneTools图像分析软件。暗室的设计已经考虑到更换部件的便利性,使你以后可以轻松地升级。那么可选的部件有哪些呢?如果你只是需要凝胶成像,就可以选择一个普通的照相机;如果用于Western Blot,那么该选择一个高级的冷却型照相机;如果是分析2D胶,那当然要选一个超级照相机了。因为G:BOX是完全电脑控制的,镜头的选择就有电动的、固定的和手动控制的。另外,你还可以选择不同的滤光片和光源。在实验中你可能会用到很多种不同的染料,那么你就可以登录www.syngene.com/html/excitation_long.php,几秒钟就能得到最适合的滤光片和光源。听上去是不是感觉很棒呢。专门为你定制的G:BOX,不单能满足今天的需求,明年的升级也能轻松做到。

Western blot 的终极目标

Western blot 完全是个体力活,需要无数次的加样和洗涤,也就有可能会产生加样的错

误,而且有些样品是来源于传染病人的,对研究人员的安全有一定威胁。Tecan 公司的ProfiBlot 仪器家族就是为了改善 Western blot 及 Southern blot 的安全性和可靠性而设计的,它符合欧盟的体外诊断 98/79/EC 指令。ProfiBlot 48 能同时处理 48 个胶条,而且整个过程是在安全的封闭式环境中进行的,能减少我们与有传染性的样品的接触时间。它能够自动准确地进行繁琐的手工操作步骤,如试剂的加样,孵育以及洗涤。另外,你还可以选择在 ProfiBlot™ 48 上安装一个 CCD 照相机,通过存储相关图像来轻松记录胶条的处理过程,再也不用一个一个地将处理后的胶条贴在实验记录本上了。你所做的工作仅仅是上样而已,是不是看上去很美呢?

这么多年来,Western blot 一直是我们研究蛋白的基本工具。借助于不断涌现的新技术,Western blot 已经从定性发展到定量,从自然发光发展到化学发光到荧光。期待更多杰出技术的出现,让 Western blot 更高、更快、更强!

(生物通 余亮)