

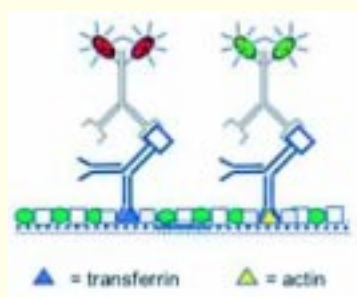
采用 ECL Plex 荧光蛋白质印迹方法检测并定量低丰度蛋白

ECL Plex 蛋白质印迹检测系统能检测 pg 级的蛋白质, 并具有 3.6 个数量级的宽线性范围。可同时检测两个不同数量级的低丰度蛋白抗原, 如细胞溶液中的磷酸化蛋白。

介绍

ECL Plex 蛋白质印迹检测系统是基于 CyDye 标记的抗体偶联物的直接荧光检测技术而开发的新技术。使用不同的荧光染料——Cy3 和 Cy5, 可同时在杂交膜上检测多个抗原 (图 1)。这样会减少在探针剥离过程中蛋白的损失从而提供更精确的数据。结合高端的成像系统使用 (如 Typhoon 扫描仪或 Ettan DIGE 成像仪), 其结果具有更宽的线性和动态范围从而可以检测并定量低丰度蛋白。

转铁蛋白, 肌动蛋白



二级检测偶联物 (CyDye)
二级抗体
初级抗体
膜上的抗原

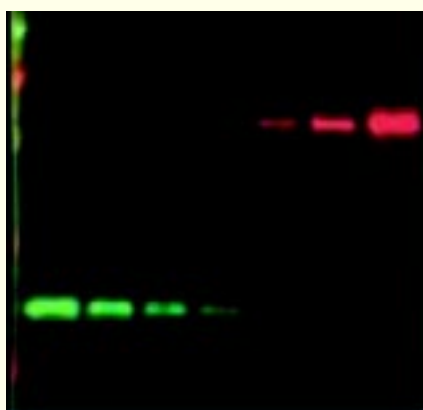


图 1 两个目的蛋白的蛋白质印迹检测转铁蛋白 (Cy5) 和肌动蛋白 (Cy3)。两个蛋白样品连续稀释后再电泳分离。兔抗转铁蛋白和小鼠抗肌动蛋白作为初级抗体, ECL Plex 羊- α -兔 IgG-Cy5 和 ECL Plex 羊- α -小鼠 IgG-Cy3 二级抗体检测。

方法

纯蛋白样品或细胞抽提物在 12% 的 Tris-glycine 胶上分离。电泳结束后, 在 Hybond ECL 或 Hybond-LFP 膜上转印胶样品, 并根据实验手册说明进行初级抗体和偶联了 CyDye 染料的二级抗体杂交。请参考应用文献 Multiplex protein detec-

tion using the ECL plex fluorescent western blotting system (28-4015-40)(1), 该文献可在 www.amershambiosciences.com 上检索。

结果和讨论

灵敏度和动态范围

采用标准系统, 两倍梯度稀释人转铁蛋白和肌动蛋白优化系统性能。最低可检测到 1.2 pg 的蛋白量, 其线性范围可达 3.6 个数量级。

该结果也依赖于荧光基团在合适的波长范围内应用于低荧光背景的膜。硝酸纤维膜 (Hybond ECL) 和新开发的 PVDF 膜 (Hybond-LFP) 就完全可以达到这样的结果。

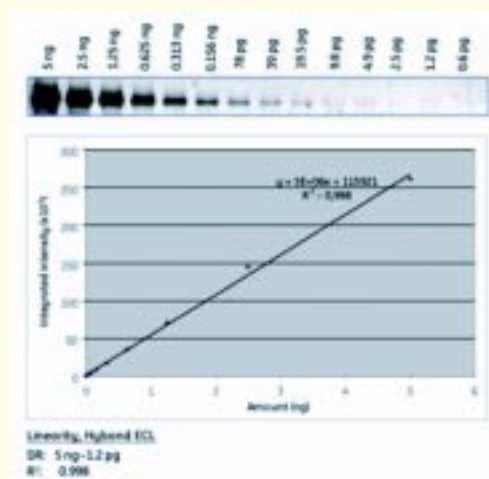


图 2: 单个蛋白的检测。人转铁蛋白 5 ng-0.6 pg (两倍梯度稀释)。膜: Hybond ECL, 初级抗体: 兔多克隆抗人转铁蛋白, 二级抗体: ECL Plex 羊- α -兔 IgG-Cy5。动态范围 (DR), 线性 (R²)

检测和定量磷酸化蛋白

多重检测蛋白常常遭受到抗体或染料的交叉反应信号的影响。而这一切现在已被 ECL Plex 系统优化过的组分和实验方法所克服。(图三)

TGF- β 是一种生长因子蛋白质, 可刺激大量的包内反应包括生长抑制, 细胞分化, 和凋亡。TGF- β 介导的 P38 磷酸化反应, 在人 T293 肾上皮细胞株上检测, 相对肌动蛋白定量比较显示成比例增长。(图 4)

(下转第 11 页)