

多重2-D Western blotting和内标: Amersham ECL Plex 系统的最新应用

A. Hagner McWhirter and H. Nordvarg
GE Healthcare, Uppsala, Sweden

同一块膜上同时独立检测两个蛋白抗原(多重技术)有很多优势。尤其是,无需剥离和重新杂交就可以用一个蛋白校正另一个蛋白的量。在本项研究中,介绍了Amersham™ ECL Plex™ Western blotting系统在1-D和2-D Western blotting多重检测中的应用。多重技术获得的数据无法用常规的Western blotting技术获得。

引言

Amersham ECL Plex Western blotting系统基于灵敏的CyDye™ 耦联的二抗,最常应用于在1-D SDS-PAGE胶分离的蛋白。使用Amersham ECL Plex进行Western blotting可以进行多重分析,例如,在同一块膜上同时独立检测两个蛋白抗原。其它的特性是高灵敏度和线性范围,动态范围接近四个数量级[1]。

ECL Plex系统也可以应用于双向电泳(2-D),不管是Ettan™ DIGE系统结果的确认,还是为了发现蛋白的异构体[2]。多重技术可以对翻译后修饰的蛋白进行检测和定量,如磷酸化蛋白。

在1-D电泳中,多重技术是一个将特定蛋白的量与持续稳定表达的反映上样量的看家蛋白建立联系的有力工具,可以获得特定蛋白的更可靠的定量结果。

1-D凝胶电泳

人前列腺癌(PC-3U)细胞裂解液[3]应用Novex™ 12% Tris-glycine预制胶(Invitrogen)和miniVE垂直电泳系统进行1-D SDS-PAGE分离,100V运行2.5小时。蛋白转印到Hybond LFP™ (低荧光PVDF)膜。膜用兔多克隆抗磷酸化GSK3b和小鼠单克隆抗GSK3b的一抗进行孵育。为了检测,使用ECL Plex-山羊抗兔 IgG-Cy5和ECL Plex 山羊抗小鼠 IgG-Cy3二抗进行二次孵育。GSK-3的b异构体(GSK3b)被一抗(兔多克隆抗磷酸化GSK3b和小鼠单克隆抗GSK3b)和ECL Plex CyDye耦联的二抗(ECL Plex山羊抗小鼠 IgG-Cy3和ECL Plex-山羊抗兔 IgG-Cy5)所检测。这个方法可以同时多重检测GSK3b非磷酸化和磷酸化的Serine (Ser9)形式(图1)。干燥状态的杂交膜应用Typhoon™ 9410可变模式扫描仪进行成像。

结果表明针对GSK3b(Mr 48,000)的抗体可以非特异的识别该蛋白的a形式(Mr 51,000),只有b形式于Ser9存在磷酸化。

2-D凝胶电泳

相同的样品(PC-3U细胞裂解液)应用CyDye™ DIGE最小量荧光标记法进行预染,第一向采用7厘米pH 7-11 NL Immobiline™ 干胶条和Ettan IPGphor II进行分离,聚焦到11 kVh。第二向采用miniVE垂直电泳系统和Novex 12% Tris-glycine预制胶进行分离。电泳条件为首先每块胶15mA分离15分钟,接着每块胶30mA分离2小时。胶上的蛋白被转印到Hybond LFP膜,接着使用如上所述的一抗和二抗进行杂交。磷酸化的异构体显示出一串斑点,每增加一个磷酸基团就向胶的酸性端进行偏移(图2)。磷酸化GSK3b的至少5个不同的异构体在实验中被检测,磷酸化程度最高的两个异构体Ser9发生了磷酸化。2-D方法比传统的1-D Western blotting给出了磷酸化异构体的附加信息。

特定蛋白的可信定量

只有在使用多重荧光Western blotting时才有可能实现内标的设计,内标的重要性在下面的实验中凸现出来(图3)。野生型(+/+)和酶敲除型(-/-)胚胎鼠成纤维细胞使用不同浓度的成纤维细胞生长因子-2(FGF-2)进行处理。细胞裂解液用1-D SDS-PAGE进行分离,蛋白转印到Hybond LFP膜。膜先用兔源抗MAP激酶(Sigma-Aldrich)一抗和鼠源抗看家蛋白一抗杂交,接着用上述的ECL Plex Cy3耦联的二抗检测GAPDH,ECL Plex Cy5耦联的二抗检测ERK1/2。根据蛋白定量分析估计每个泳道的上样量相似。对于每个泳道计算(ERK1/2)/GAPDH的比值。

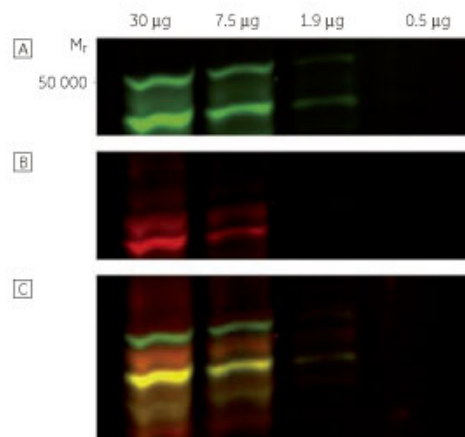


图1.使用Amersham ECL Plex CyDye耦联的二抗,1-D Western blot检测GSK3b蛋白。(A)ECL Plex Cy3耦联的二抗检测GSK3b;(B)ECL Plex Cy5耦联的二抗检测磷酸化的GSK3b;(C)是(A)和(B)的重叠。GSK3b的分子量是48000。

GAPDH信号强度在不同泳道间不同, 说明不同泳道间上样量不同(图3A)。与图3C得到的校正的(ERK1/2)/GAPDH比值比较, 图3B中的直接的未校正的ERK1/2信号给出不同的结果。当ERK1/2信号用GAPDH水平校正后, 结果显示与野生型相比, 随着2或4 ng/ml FGF-2处理, ERK1/2水平在敲除的细胞中增加。在用0.4 ng/ml FGF-2处理与否时, 得到了相反的结果, 与野生型相比, ERK1/2水平在敲除的细胞中降低。

没有GAPDH作为内标时, 这个信息是无法获得的。如果不和看家蛋白去比, 实验误差(例如吸样误差或者蛋白定量错误)都可以导致错误的生物学结论。传统的通过剥离和再杂交, 顺序检测感兴趣蛋白和看家蛋白的方法, 由于蛋白丢失的不均衡性可以引起不可信的结果。

结论

1-D Western blotting实验表明, 使用ECL Plex CyDye耦联的二抗, 在PC-3U细胞, 磷酸化和非磷酸化的GSK3b形式可以被检测。2-D方法给出了GSK3b每个磷酸化形式的附加信息, 检测到至少5个不同的蛋白异构体。

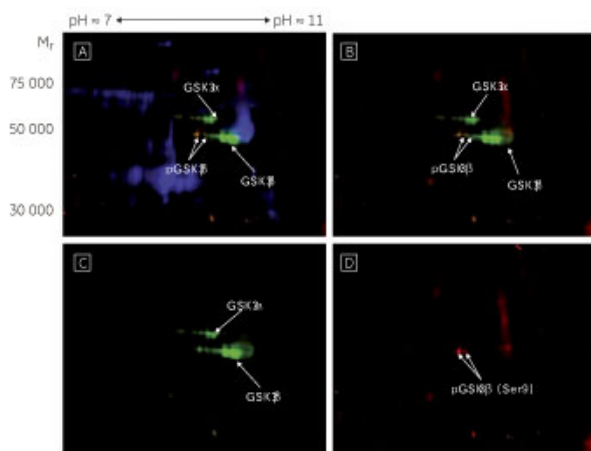


图2.使用Amersham ECL Plex Western blotting系统, 2-D Western blot检测磷酸化和非磷酸化的GSK3b蛋白。(A)Cy2, Cy3和Cy5图像的重叠; (B)Cy3和Cy5图像的重叠; (C)Cy3的图像; (D)Cy5的图像。全蛋白(Cy2, 蓝色), ECL Plex Cy3耦联的二抗检测GSK3b蛋白(绿色), (pGSK3b)ECL Plex Cy5耦联的二抗检测磷酸化GSK3b蛋白(红色)。分子量和pH范围显示在(A)。GSK3b(Mr 48,000), GSK3a(Mr 51,000)和GSK3b Ser9-磷酸化蛋白斑点被指示出来。

而且, 野生型和敲除型胚胎鼠成纤维细胞ERK1/2水平, 在FGF-2处理浓度增加时的反应, 可以通过多重检测ERK1/2和看家蛋白GAPDH得到。

订购信息

产品	货号
ECL Plex goat- α -mouse IgG-Cy3(150 μ g)	PA43009
ECL Plex goat- α -rabbit IgG-Cy5(150 μ g)	PA45011
CyDye DIGE Fluor, Cy2 minimal dye(10 nmol)	25-8008-60
Hybond-LEP(20 X 20cm, 10 sheets)	RPN2020LFP
Ettan IPGphor 3 IEF System (replaces Ettan IPGphor II IEF System)	11-0033-64
miniVE Vertical Electrophoresis System	80-6418-77
Typhoon 9410 (include ImageQuant™ TL software)	63-0055-80
Immobiline DryStrip 7-11 NL, 7cm(12 gels)	17-6003-68
TE 22 Mini Tank Transfer Unit	80-6204-26

这篇文章中使用的操作程序细节可以查询应用手册28-9042-34。欲知关于Amersham ECL Plex的更多信息, 请登录www.gelifsciences.com/ec1

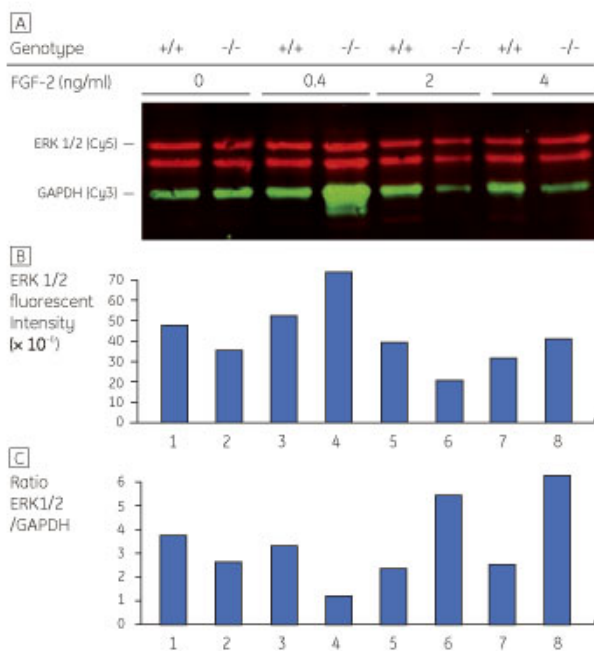


图3. 野生型(+/+)和敲除型(-/-)胚胎鼠成纤维细胞使用不同浓度的成纤维细胞生长因子-2(FGF-2)进行处理的1-D Western blot。(A)ECL Plex Cy5耦联的二抗检测ERK1/2(红色), ECL Plex Cy3耦联的二抗检测GAPDH(绿色); (B)ERK1/2直接的未校正的信号; (C)ERK1/2相对于GAPDH表达的信号。