

• 基础实验研究 •

Western blot 方法中不同电流强度对较大分子蛋白质转膜效率的影响^{*}谢 岚¹, 艾 华^{2△}

(1. 北京大学第三医院运动医学研究所营养生化研究室 100191;

2. 北京大学肥胖与代谢病研究中心营养运动与肥胖研究室 100191)

摘 要:目的 研究 Western blot 方法中不同电流强度对较大分子蛋白质转膜效率的影响。方法 利用 $(36\sim 250)\times 10^3$ 标志蛋白质,以 8% SDS-PAGE 凝胶分离,然后分别以 100、200、300、400、500 mA 恒流湿法电转 2 h。结果 100、200 mA 恒流 2 h 不能使 250×10^3 较大分子蛋白质全部转膜,凝胶有残留。300 mA 以上则可使大部分或全部转膜,胶上未见残留。结论 电流强度对较大蛋白质转膜有影响。300~400 mA 可作为 250×10^3 左右较大分子蛋白质从 8% SDS-PAGE 凝胶转膜的最佳恒流强度。

关键词:印迹法;蛋白质;大分子蛋白质;电转;电流强度

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.01.018

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)01-0042-03

Effects of different current densities on efficiency of electrotransfer for the
large-molecular-weight protein in Western blot assay^{*}

Xie Lan¹, Ai Hua^{2△}

(1. Nutrition and Biochemistry Section, Institute of Sports Medicine, Third Hospital,

Peking University, Beijing 100191, China; 2. Nutrition and Exercise Section, Obesity and Metabolic Diseases

Research Centre, Peking University, Beijing 100191, China)

Abstract: Objective To study the effects of different current densities on electrotransfer efficiency for the large-molecular-weight protein in Western blot assay. **Methods** $(36-250)\times 10^3$ protein markers were migrated on 8% SDS-PAGE gel and then wetly electrotransferred at constant current density of 100, 200, 300, 400, 500 mA, respectively, for 2 hours. **Results** The 250×10^3 marker was not totally transferred at 100 and 200 mA with visual remains on the gel. However, it was mostly or fully transferred to the membrane at 300—500 mA without any visual remains on the gel. **Conclusion** The efficiency of electroblotting of a large-molecular-weight protein might be affected by the current density and 300—400 mA could be optimal constant current densities for the wet electroblotting of the proteins as large as 250×10^3 from 8% SDS-PAGE gel.

Key words: blot, Western; large-molecular-weight protein; electrotransfer; current density

Western blot 是目前定量分析生物组织蛋白质表达最常用的方法之一,但应用该法测定组织中大蛋白质分子时常常遇到困难,测定不灵敏,结果不稳定,致使人们往往需要花费大量的时间和财力摸索实验条件^[1-3]。根据作者经验,控制好大蛋白质转膜条件是提高测定灵敏性和稳定性的关键步骤之一,其中,电流强度是一个重要因素。但查阅文献,有关详细研究不同电流强度影响的报道几乎没有。本研究将探索不同电流强度对较大分子蛋白质湿法转膜效率的影响,为测定者提供实用、明了的实验数据。

1 材料与方法

1.1 材料 预染彩色标志蛋白质(相对分子质量分别为 36×10^3 、 55×10^3 、 72×10^3 、 95×10^3 、 130×10^3 、 250×10^3 的重组蛋白)购自美国 Fermentas 公司,0.45 μm 硝酸纤维素(NC)膜购自美国 Millipore 公司,考马斯亮蓝 R-250、丙烯酰胺(Acr)、双丙烯酰胺(Bis)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、十二烷基硫酸钠(SDS)、过硫酸胺(AP)、四甲基乙二胺(TEMED)、甘氨酸、异丙醇、冰醋酸等均购自美国 Sigma 公司。

1.2 溶液 泳液:0.025 mol Tris(pH8.3),0.192 mol 甘氨酸,0.1% SDS。电转液:0.025 mol Tris(pH8.3),0.192 mol 甘

氨酸,0.1% SDS,20% 甲醇。5% 浓缩胶:5% Acr-Bis(Acr : Bis = 29 : 1),1.0 mol Tris-HCl(pH6.8),0.1% SDS,0.1% AP,0.12% TEMED。8% 分离胶:8% Acr-Bis(Acr : Bis = 29 : 1),1.5 mol Tris-HCl(pH8.8),0.1% SDS,0.1% AP,0.07% TEMED。0.1% 考马斯亮蓝 R-250 染液:0.1% 考马斯亮蓝 R-250,25% 异丙醇,10% 冰醋酸。

1.3 仪器 电泳-电转仪(BAYGENE 公司, BG-POWER 600),电泳-电转装置(北京六一仪器厂, DYC2-40D),制胶器(北京六一仪器厂, 24DN)。

1.4 方法

1.4.1 制胶 常规方法制作 5% 浓缩胶加 8% 分离胶,胶厚 0.15 cm。

1.4.2 电泳 预染标志蛋白质上样体积 5 L。电泳装置于冰水中进行分级恒压电泳,全程记录电流值,数值为 6 次记录(10 s 1 次)的平均数,见表 1。电泳完毕,凝胶拍照。

1.4.3 转膜 分离胶(面积 20 cm²)、NC 膜(面积 36 cm²) 在电转液中平衡 5 min,常规制作三明治叠层,分别以 100、200、300、400、500 mA 恒流电转 2 h。单位膜面积电流强度分别为 5、10、15、20、25 mA/cm²。电转装置放于冰水中进行转膜。转

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30270636,30671015)。

△ 通讯作者, E-mail: huaai@bjmu.edu.cn。

膜后对 NC 膜和凝胶拍照。

1.4.4 染胶 对凝胶进行考马斯亮蓝染色,以使蛋白条带较为清晰。染色 30~60 min,蒸馏水漂洗 3~5 次过夜。染色前后对胶拍照。

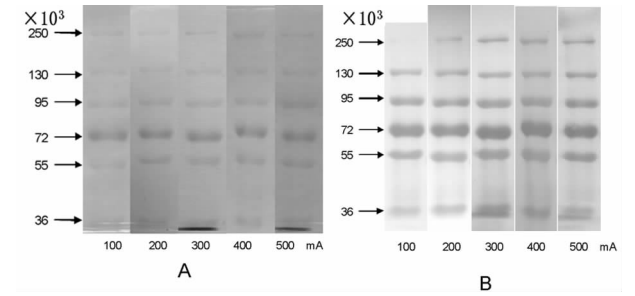
表 1 分级恒压电泳时间及电流变化

电压(V)	标志蛋白质的电泳位置	时间(min)	电流(mA)
50	准备进入浓缩胶	0	15
		5	14
		12	13
		20	11
		21	21
75	已进入浓缩胶	26	20
		32	19
		40	19
		41	42
150	已进入分离胶	70	35
		100	29
		130	22

1.5 实验条件控制 为利于结果比较,作者严格控制实验条件,确保前后实验条件一致,主要措施有:不同电流强度电转均重复 3~4 次;均使用同一电泳、电转装置;电泳液、电转液均为一次性使用,以避免溶液离子强度改变造成的影响;均在冰水中进行电泳和电转,以避免室温改变带来的影响等。

2 结 果

2.1 不同电流强度对 $(36\sim250)\times10^3$ 标志蛋白质转膜的影响,见图 1。



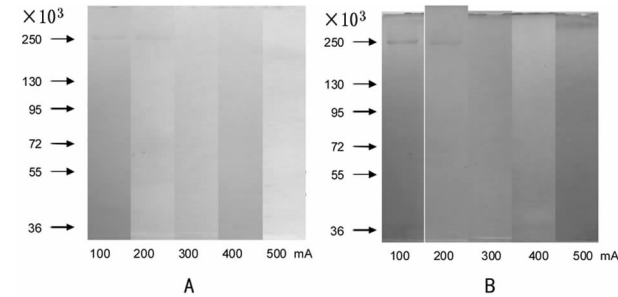
A:标志蛋白质电泳后在凝胶上的影像;B:按不同电流强度从对应凝胶电转后 NC 膜上标志蛋白质条带的影像。

图 1 不同电流强度对 $(36\sim250)\times10^3$ 标志蛋白质转膜的影响

2.2 不同电流强度转膜后 $(36\sim250)\times10^3$ 标志蛋白质在凝胶上的残留状况,见图 2。

图 1A 显示,相对分子质量为 $(36\sim250)\times10^3$ 的蛋白质能够在 8%SDS-PAGE 胶上得到很好分离,还显示各次电泳的结果基本一致。图 1B 显示,100、200 mA 恒流 2 h, 250×10^3 较大分子蛋白质不能全部从 8%SDS-PAGE 凝胶上转移到 NC 膜上,凝胶上有残留(图 2)。而且,100 mA 恒流转膜率明显低于 200 mA。300 mA 以上恒流则可使全部或大部分转膜,胶上未见残留。图 1B、图 2 结果显示,对于 $(36\sim130)\times10^3$ 较小相对分子质量的蛋白质,100~500 mA 恒流似乎均可使其全

部转膜,胶上无残留。



A: $(36\sim250)\times10^3$ 标志蛋白质转膜后在凝胶上(未染胶)的影像; B: $(36\sim250)\times10^3$ 标志蛋白质转膜后经考马斯亮蓝染色后的影像。

图 2 不同电流强度转膜后 $(36\sim250)\times10^3$ 标志蛋白质在凝胶上的残留状况

2.3 不同恒流(100~500 mA)电转时电压的变化,见图 3。图 3 显示,转膜电流越高,电压越大。100 和 200 mA 恒流转膜时,随着时间延长,电压略有升高且显示稳定;300、400 和 500 mA 电转时,电泳仪显示电压数值一直有所波动,并随着时间的延长,电压逐渐降低。

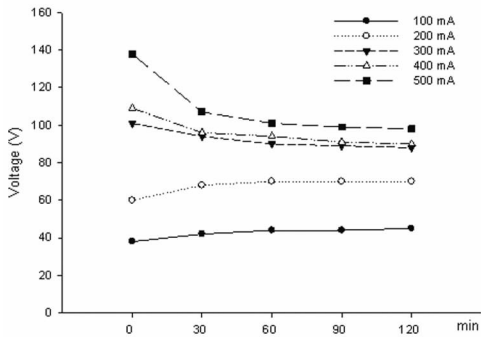


图 3 不同恒流(100~500 mA)电转时电压的变化

3 讨 论

实验表明,100、200 mA 恒流电转 2 h 不足以使 250×10^3 较大相对分子质量的蛋白质从 8%SDS-PAGE 胶上全部转膜,导致凝胶上有残余,这将影响随后的定量分析灵敏度。结果还显示,100~300 mA 恒流转膜, 250×10^3 左右的蛋白质的转移量与电流强度呈正比,即电流越大,转移量越大。300~500 mA 恒流转膜 2 h, 250×10^3 蛋白质似乎全部可转移出胶,凝胶上不见残留。但超过 400 mA,转膜量似乎也下降,这可能与蛋白质透膜有关。电流强度、电转时间、蛋白质相对分子质量都是影响透膜的因素,电流强度越大,电转时间越长,蛋白质相对分子质量越小,透膜越多^[4]。考虑到电流过大,产热较多,从而有可能影响蛋白质标本和转膜以及透膜丢失的问题,对于 250×10^3 的蛋白质,可选择 300~400 mA 恒流范围。如果同时兼顾小分子蛋白质一起转膜,以 43×10^3 相对分子质量的蛋白质 β -actin 作为内参时,300 mA 则为最佳选择转膜电流。

对于 $(36\sim130)\times10^3$ 的较小相对分子质量蛋白质,100~500 mA 恒流 2 h 可以全部转移,凝胶上没有残留。为了使转膜过程中电压稳定产热少,对于 $(36\sim130)\times10^3$ 相对分子质量的蛋白质,可选择 100~200 mA 恒流转膜。

本次实验中作者把转膜时间固定为 2 h,实际操作中有人习惯使用较长的转膜时间,甚至过夜。转膜时间过长有可能发

生透膜现象,尤其当蛋白质含量少时更易发生^[4]。Western blot 方法步骤多、时间长,缩短转膜时间有利于缩短实验时间和便于安排作息。有文献报道,慢转(4℃过夜)的效果好于快转(冰水中 2 h)^[5]。本实验结果说明,较大相对分子质量蛋白质 2 h 转膜时可通过增加电流强度来提高转膜效率。应注意,当增加转膜电流强度时,转膜最好在冰水中进行,以避免电流产热较多。

本次实验作者使用 0.45 μm 孔径的 NC 膜。NC 膜是蛋白印迹最广泛使用的转移介质,有蛋白结合能力强、背景低、信噪比高、使用简便、价格便宜等优点。通常 20×10³ 以上的蛋白质用 0.45 μm 孔径的 NC 膜,小于 20×10³ 可用 0.2 μm 膜,小于 7×10³ 用 0.1 μm 膜。除了 NC 膜,根据情况还可选择聚偏二氟乙烯(PVDF)膜、尼龙膜等,PVDF 膜优点较 NC 膜多,但价格较贵^[6]。

研究提示,对于相对分子质量大于 500×10³ 的超大蛋白质,用 SDS-PAGE 分离十分困难,可采用 SDS-琼脂糖凝胶电泳系统^[7]。结果提示,可用涵盖目标蛋白质相对分子质量的预染彩色标志蛋白质进行预实验,摸索转膜最佳条件,可在凝胶和膜上直接观察转膜效率,方法简便有效。

较大分子蛋白质(250×10³ 左右)湿法转膜,采取 300~400 mA 恒流电转 2 h(冰水中),转膜效率较高。

参考文献

[1] Kurien BT, Scofield RH. Ultrarapid electrophoretic transfer of

high and low molecular weight proteins using heat[J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 536: 181-190.

[2] Hahn T, Münchow G, Hardt S. Electrophoretic transport of biomolecules across liquid-liquid interfaces[J]. *J Phys Condens Matter*, 2011, 23(18): 184107.

[3] 蒋滢,张波,府伟灵. 蛋白质组学技术发展及应用研究进展[J]. *国际检验医学杂志*, 2009, 30(3): 252-254.

[4] 董燕,张枫,梅柱中,等. 电转移中蛋白质的透膜现象及其对蛋白质印迹结果的影响[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2002, 29(3): 449-452.

[5] 孔令泉,蒲莹晖,马仕坤,等. 快慢转法及不同滤膜和显色检测法在 Western blotting 中的应用分析[J]. *南方医科大学学报*, 2008, 28(1): 26-29.

[6] Kurien BT, Scofield RH. A brief review of other notable protein blotting methods[J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 536: 367-384.

[7] Greaser ML, Warren CM. Efficient electroblotting of very large proteins using a vertical agarose electrophoresis system[J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 536: 221-227.

(收稿日期:2011-09-11)

(上接第 41 页)

病变次之。本研究显示,HCY 在病例组中均显著高于健康对照组,且脑梗死组显著高于动脉闭塞症组,这可能与之前的报道在大小血管中的表达程度不同有关。

总之,HCY、Lp(a)、LDL、UA、HS-CRP 等相关危险因素对于心脑血管病变有重要意义,对动脉粥样硬化类疾病的预测有重要价值,研究其在相关类型疾病中的表达以及进行针对性早期检出及治疗有着积极的意义。

参考文献

[1] Ishizaka N, Ishizaka Y, Yamakado M, et al. Association between metabolic syndrome and carotid atherosclerosis in individuals[J]. *Atherosclerosis*, 2009, 2004(2): 619-623.

[2] 刘清阁,李飞,潘志信,等. 急性缺血性脑血管病患者代谢综合征与颈动脉粥样硬化的相关性研究[J]. *中华神经医学杂志*, 2010, 9(7): 662-665.

[3] 吴英,陈崇基. 超敏 C-反应蛋白与冠心病、心肌梗死的相关性探讨[J]. *国际检验医学杂志*, 2009, 30(1): 36-38.

[4] 宋玉莲,韩波. 同型半胱氨酸、超敏 C-反应蛋白、脂蛋白(a)的检测在急性冠脉综合征中的临床应用[J]. *国际检验医学杂志*, 2010, 31(3): 290-292.

[5] Packard RR, Libby P. Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction[J]. *Clin Chem*, 2008, 4(1): 24-38.

[6] 张锦,来春林,刘晓红,等. 血清 hs-CRP、SAA 水平与冠状动脉粥

样硬化斑块稳定性的关系探讨[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2009, 7(4): 394-396.

[7] 李岩,赵冬,刘静,等. 高尿酸血症与新发颈动脉粥样硬化斑块的关系[J]. *中华内科杂志*, 2008, 47(11): 906-909.

[8] Tsimikas S, Brilakis ES, Miller ER, et al. Oxidized phospholipids, Lp(a) lipoprotein and coronary artery disease[J]. *N Engl J Med*, 2005, 353(1): 46-57.

[9] 卢舟,王瑜,王厦. 动脉硬化性闭塞症患者脂蛋白(a)和血液流变学检测分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2009, 30(11): 1112-1113.

[10] 余海峰,施慧旌,周剑宇,等. 血浆同型半胱氨酸与动脉粥样硬化相关分析[J]. *中国医师杂志*, 2006, 8(5): 51.

[11] Faraci FM, Lentz R. Hyperhomocysteinemia, oxidative stress, and cerebral vascular dysfunction[J]. *Stroke*, 2004, 35(2): 345.

[12] Gerdes VE, Hovinga HA, Tencate H, et al. Homocysteine and markers of coagulation and endothelial cell activation[J]. *Thromb Haemost*, 2004, 2(3): 445.

[13] 马勇,王磊. 血清同型半胱氨酸和脂蛋白(a)与缺血性脑梗死相关分析[J]. *检验医学与临床*, 2010, 7(11): 1030-1031.

[14] Eikelboom JW, Hankey GJ, Anand SS, et al. Association between high homocysteine and ischemic stroke due to large and small artery disease but not other etiologic subtypes of ischemic stroke[J]. *Stroke*, 2000, 31(5): 1069.

(收稿日期:2011-09-01)