DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.10.051
第23卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 10
1242 2001年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2001

技术方法

文章编号:1000-5404(2001)10-1242-02

Western-blot检测蛋白表达的方法改进及初步应用

Modified western-blot method to detect protein expression and its primary application

张莉萍[1],蒋纪恺[2],Joe Tam[3] (重庆医科大学:[1]第二临床学院检验科,重庆 400010;[2]临床生物化学教研室,重庆 400016;[3]香港大学医学院生物化学系)

提 要:目的 探讨Western-blotting-增强化学发光法(ECL)在分析细胞周期调控蛋白表达中的应用。方法 采用K562细胞,制备细胞核,对电泳、封闭、结合、检测等关键步骤进行了实验条件的摸索和改进,并对我室研究苦参碱诱导K562细胞分化机制的细胞周期蛋白的表达进行了分析。结果 30μg核蛋白质即可检测到K562细胞中,均有不同程度的CyclinE、Cdk2、CyclinD1、Cdk5表达。结论 Western-blotting-ECL法特异性强、灵敏度高,是分析蛋白质表达较为理想的方法。

Western印迹技术是当前分析细胞蛋白质表达的常用分子生物学技术,但鉴于其底物显色的检测系统不可能完全排除背景颜色且灵敏度相对较低,我们在总结国外有关报道的前提下,对Western-blotting某些重要步骤进行了摸索和改进,建立了分析蛋白质表达的Western-blotting-增强化学发光法(Enhanced chemiluminescence, ECL),并分析了我室研究苦参碱诱导K562细胞分化机制的细胞周期蛋白的表达。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 K562细胞株 由香港大学医学院生物化学系提供,在实验室常规传代培养。

1.1.2 苦参碱 本实验室自备。

1.1.3 CyclinD1(R1-124),CyclinE(HE12),Cdk5(J-3),Cdk2(D-12),Western-blotting第二抗体(Santa Cruz Biotechnology),Western-blotting检测试剂ECL(Amersham LIFE SCIENCE),高敏感光胶片(Hyperfilm, Amersham International plc Amersham place)均由香港大学医学院生物化学系提供。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 K562细胞在0.05%FBS的培养液中培养1~3 d,苦参碱处理组加入苦参碱(0.1 mg/ml)后作用1~3 d。

1.2.2 细胞核制备 NP-40裂解法,参考文献[1]略有改进。将收集的K562细胞(2×10^7)用PBS洗涤1次,加入冰预冷的RIPA裂解液(1×PBS,1%NP-40,0.5%脱氧胆酸钠,0.1% SDS,10 mg/ml PMSF临用前加入)冰浴30 min,然后混匀细胞,再加入10μl 10 mg/ml PMSF,冰浴30 min,15 000× g,4 ℃,20 min。上清液即为细胞核提取液,并作蛋白质定量检测,-70 ℃存放备用。

1.2.3 取30μg核蛋白质10% PAGE-SDS,6% PAGE-SDS,80 V,2.5 h,然后电转印于硝酸纤维素膜上。

1.2.4 封闭 用BlottoA(1×TBS,5% Milk,0.05% Tween-20)4 ℃封闭4 h。洗膜数次。

1.2.5 用抗靶蛋白的第一抗体(0.1~1.0μg/ml)与硝纤膜室温下孵育2 h,洗膜数次(TBS,0.05% Tween-20)。

1.2.6 加入标记有HRP的二抗(1∶500-1∶5 000)孵育30 min,洗膜数次。

1.2.7 同时采用酶促底物显色法和ECL(等量加入化学发光信号和增强试剂1~20 min)法检测印迹膜。ECL即增强化学发光[2],采用HRP标记的抗体耦联发光反应进行检测,然后用高敏感光胶片曝光,自显影而确定抗原-抗体-抗体在硝纤膜上的位置。

2 结果

2.1 电泳条件的选择

2.1.1 蛋白质用量 在实验中蛋白质用量分别选择10、30、50、100μg进行电泳,结果发现30μg核蛋白质即可有肉眼可见的、清晰的电泳带出现。

2.1.2 凝胶浓度的选择 本实验选择10% PAGE-SDS和6% PAGE-SDS的堆积胶(Stack gel),80 V, 2.5 h,可以达到最佳分离效果。

2.2 封闭液和封闭时间的选择

封闭液中分别选用是否含Tween-20,25 ℃,30 min;4 ℃,2、4、24 h封闭,发现4 ℃,4 h的条件下,封闭效果最好,即背景色浅。

2.3 Western印迹膜的检测

同时采用酶促底物显色法和增强化学发光法检测,发现酶促底物显色法呈色浅且非常缓慢,最多长达4 h,日照会褪色;而等量加入化学发光信号和增强试剂,在1~20 min内,压片,自显影,则可清晰地显示K562细胞中CyclinD1, CyclinE, Cdk2, Cdk5的不同表达,见图1。

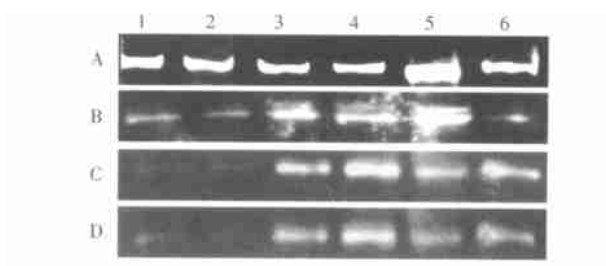


图1 Western-blotting-ECL检测K562细胞

A:CyclinE的表达;B:Cdk2的表达;C:CyclinD1的表达;D:Cdk5的表达;1,3,5:未经苦参碱作用的K562细胞分别培养24、48、72 h;2,4,6:苦参碱作用的K562细胞分别培养24、48、72 h

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39670881);重庆市科研基金资助项目(99-33)

作者简介:张莉萍(1966-),女,重庆市人,博士研究生,副教授,主要从事肿瘤分子生物学诊断方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68707796

收稿日期:2000-03-30;修回日期:2001-01-15

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3 讨论

Western-blotting 技术是检测细胞内蛋白质表达的专用分析技术，但由于其检测系统通常采用酶促底物显色法，因其灵敏度较低、且显色缓慢而使其应用受到一定限制。本研究使用的 Luminol-H_2O_2-HRP 系统建立的 Western 印迹-增强化学发光法(ECL)，它将 Western-blotting 的特异性和增强化学发光法的灵敏度结合起来，提高了 Western-blotting 技术的灵敏度，且发光信号可稳定在 20 min 无影响[3]。

电泳条件的选择是 Western-blotting 技术的关键环节之一。国外绝大多数学者均采用 10%PAGE-SDS 单一浓度胶检测细胞周期蛋白的表达[4]，本实验证实采用 10% PAGE-SDS 和 6% PAGE-SDS 的堆积胶(Stack gel)[5]，80 V，2.5 h，可以将分子量大小不同的蛋白质在很短的时间内，调节在同一起点上，分离效果优于单一浓度胶。

封闭可能结合非相关蛋白的位点也直接影响 Western 印迹法的检测效果[6]。因此在实验中我们对封闭条件作了改进，选择的封闭液中含有 0.05% Tween-20，4 ℃，4 h，这样既不影响抗体与靶抗原的特异性结合，又可有效降低非特异性结合背景。

Western 印迹膜同时采用酶促底物显色和 ECL 试剂检测，结果显示前者呈色浅，且非常缓慢，日光照射 4 h 后即褪去；而 ECL 试剂可以快速(反应 1 min)、清晰地显示出所测靶蛋白的表达，大大提高了检测反应的灵敏度，且所发的光可以持续稳定较长的时间(20 min)。结果显示，在未经作用的 K562 细胞中，CyclinE 和 Cdk2 的表达增强；而在苦参碱作用后分化的 K562 细胞中，CyclinD1 和 cdk5 的表达增强。提示 Cyclin 和 Cdk 的表达与细胞增殖和分化密切相关。

目前，国外有关 Western-blotting 检测细胞周期蛋白表达的报道很多。大多数学者采用的蛋白质用量为 50~100 μg，选择 10%PAGE-SDS 单一浓度胶，封闭条件为 25 ℃，30 min，而本实验采用 NP-40 裂解法制备细胞核、Stack 胶分离蛋白质、增强化学发光法检测，蛋白质用量降低为 30 μg，从而使该方法能更广泛地应用于难得标本的分析，扩大了 Western 印迹技术的应用范围。

(致谢：本课题在香港大学医学院生物化学系完成，得到该系各位导师的指导和支持，特此致谢！)

关键词：Western 印迹；增强化学发光；细胞周期调控
中图法分类号：R329-33 文献标识码：B

参考文献：

[1] Marzluff W F, Murphg E C, Huang R C C. Transcription of rhouncleic acid in isolated mouse myeloma nuclei[J]. Biochemistry, 1973, 12(6): 3 440—3 446.
[2] 陈文勇. 化学发光在核酸探针诊断中的应用及其进展[J]. 国外医学：临床生物化学与检验学分册，1993，14(2)：51—53.
[3] 张莉萍，蒋纪恺，Joe Tam，等. 苦参碱诱导 K562 细胞分化的作用机制研究[J]. 中华血液学杂志，1999，20(6)：315—316.
[4] Whicehead T P, Thorpe G H G, Carter T J N. Enhanced luminescence procedure for sensitive determination of peroxidase-labelled conjugates in immunoassay[J]. Nature, 1983, 305(3): 158.
[5] Zhan R L, Hromchak R, Bloch A. Differential expression of proteins regulating cell cycle progression in growth *vs* differentiation[J]. Biochimica Biophysica Acta, 1997, 1356(3): 149—159.
[6] J. 萨姆布鲁克，E. F. 弗里奇，T. 曼尼蒂斯. 分子克隆实验指南[M]：第 2 版. 北京：科学出版社，1996. 888—902.

(编辑 潘式文)

文章编号：1000-5404(2001)10-1243-02

技术方法

超氧化离子水的体外杀菌试验

Experimental study of antimicrobial effect of super-oxidizad water

陈 萍，刘 丁，张志诚，邓光贵 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所感染监控中心，重庆 400042)

提 要：目的 研究超氧化离子水对细菌、病毒的杀灭效果。方法 通过定量杀菌试验、乙型肝炎表面抗原破坏试验、金属腐蚀性试验进行比较杀菌性能。结果 在无有机物存在的条件下 15 s 可杀灭细菌繁殖体，作用 30 s 可破坏乙型肝炎表面抗原，作用 10 s 可杀灭枯草杆菌的芽孢，对金属腐蚀性小。结论 超氧化离子水对微生物有较强杀灭作用，可作为医院消毒使用。

超氧化离子水(Super-oxidized water)是将加入少量氯化钠的自来水，通过离子隔膜电解，在阳极产生具有 1 100 mV 以上的氧化还原电位(Oxidation reduction potential，ORP)和 pH 2.7 以下的特殊离子水。由于该水的强氧化能力和低的 pH 值，对细菌微生物具有一定的抗菌活性[1]，为了进一步评价超氧化离子水的消毒效果，我们对其进行了有关实验的研究，现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 消毒剂的制备

超氧化离子水是在自来水中加入氯化钠，配制成氯化钠浓度为 10%的水溶液，将氯化钠充分溶解后，通过连续式电解水

作者简介：陈 萍(1962—)，四川省宜宾市人，副主任技师，主要从事医院感染与消毒方面的研究，发表论文 17 篇，电话：(023)68757992
收稿日期：2000-12-29；修回日期：2001-05-23

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net