

分类号:       R73-34      

学号:       2015110674      

**重 庆 医 科 大 学**

**硕 士 学 位 论 文**

**(学术学位)**

论文题目       **Western blotting 步骤优化及肝组织中管家蛋白内参可靠性的初步研究**      

作者姓名       **郑凯文**      

指导教师姓名 (职称、单位名称)       **刘长安 教授**  
**重庆医科大学附属第二医院**      

专业学位类别名称       **临床医学**      

专业学位领域名称       **外科学**      

论文答辩年月       **2018 年 5 月**

## 重庆医科大学

### 研究生学位论文独创性声明

本人申明所提交的论文是我本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得重庆医科大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料，与我同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

申请学位论文与资料若有不实之处，本人承担一切相关责任。

学位论文作者签名：郑凯文

日期：2018.05.04

### 学位论文版权使用授权书

本人完全了解重庆医科大学有关保护知识产权的规定，即：研究生在攻读学位期间论文工作的知识产权单位属重庆医科大学。本人保证毕业离校后，发表论文或使用论文工作成果时署各单位为重庆医科大学。学校有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。学校可以公布学位论文的全部或部分内容（保密内容除外），并编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或其他手段保存论文。保密论文在解密后适用本授权书。

论文作者签名：郑凯文

指导教师签名：刘芸

日期：2018.05.04

## 目 录

英汉缩写名词对照.....	1
Western blotting 步骤优化及肝组织中管家蛋白内参可靠性的初步研究.....	9
前言.....	9
第一部分 Western blotting 步骤的优化: Qualitative optical way.....	11
1. 材料和方法.....	11
2. 结果.....	18
3. 讨论: .....	21
4. 小结: .....	22
参考文献: .....	23
第二部分 肝脏组织 western blotting 内参蛋白的可靠性.....	26
1. 材料与和方法.....	26
2. 结果.....	32
3. 讨论.....	44
4. 小结.....	44
参考文献.....	45
全文总结.....	46
文献综述: .....	47
组织样本 western blot 的研究进展.....	47
参考文献.....	52
致谢.....	56
攻读硕士期间发表的论文: .....	57

## 英汉缩写名词对照

英文缩写	英文全称	中文全称
HCC	hepatocellular carcinoma	肝细胞性肝癌
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	细胞培养基
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
AP	Ammonium persulfate	过硫酸铵
OD	Optical density	光密度
ECL	Electrochemiluminescence	电化学发光
PBS	phosphate saline buffer	磷酸盐缓冲液
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid	乙二胺四乙酸
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride	苯甲基磺酰氟
TBS	Tris Buffered Saline	Tris 缓冲盐
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
PVDF	Polyvinylidene Fluoride	聚偏二氟乙烯
TBST	Tris Buffered Saline with Tween 20	含 20%Tween20TBS 缓冲液
WB	Western blot	免疫蛋白印迹
TEMED	tetramethylethylenediamine	四甲基乙二胺
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	磷酸甘油醛脱氢酶
Nrp1	Neuropilin-1	神经纤毛蛋白-1
SPSS	Statistical Product and Service Solutions	统计产品与服务解决 方案

# Western blotting 步骤优化及肝组织中管家蛋白内参可靠性的初步研究

## 摘要

### 背景

在孵育抗体前检验转膜效率以及蛋白等量上样是 western blot 成功的关键。总蛋白染色法常常用来检验转膜效率和上样标准化，该法在 western blot 中扮演重要角色。常用的总蛋白染色法如立春红染色、考马斯亮蓝染色近年来却被报道有各种各样的缺陷，因此，我们尝试着能否设计出一种经济、简便、快速的检验转膜效率及上样标准的方法。众所周知，当甲醇从 PVDF 膜上挥发，膜上蛋白结合区域仍然保持亲水性，但是膜上非蛋白结合区域却再次变回 PVDF 膜的疏水特性。似乎可以根据 PVDF 膜润湿性的变化规律设计出检测转膜效率和上样标准化的 optical 方法。

另一方面，western blotting 有许多步骤，每一步都会造成误差干扰最后的结果。为了让最后的结果更准确，我们通常需要确保蛋白样本的等量上样。然而，近年来有文献报道管家基因蛋白，例如 GAPDH、 $\beta$ -actin 等，它们在细胞或组织某些条件或疾病状态下其表达量并不总是恒定。那么，在各种疾病状态下的肝脏组织中，管家基因蛋白表达是否保持恒定仍不清楚。

### 目的

1. 本研究旨在设计一个 optical 方法让实验者不用染色即可在几分钟

内观察到转膜后 PVDF 膜上的蛋白泳道。

2. 本研究的另一目的即是探索人肝细胞性肝癌组织中与小鼠脂肪肝组织中管家基因蛋白作为上样内参的可靠性。

## 方法

1. 用 western blot 检验所设计的 optical 方法的可靠性与可重复性。
2. 用等量上样的 western blot 检测人肝细胞性肝癌组织与癌旁组织中 GAPDH,  $\beta$ -actin 和  $\beta$ -tubulin 的表达情况。
3. 用梯度蛋白上样法去检测人肝细胞性肝癌组织与癌旁组织中 GAPDH,  $\beta$ -actin 和  $\beta$ -tubulin 条带灰度值与蛋白上样量的线性关系。
4. 用等量上样的 western blot 检测小鼠脂肪肝组织与小鼠正常肝组织中 GAPDH,  $\beta$ -actin 和  $\beta$ -tubulin 的表达情况。
5. 用梯度上样法检测小鼠脂肪肝组织与小鼠正常肝组织中 GAPDH,  $\beta$ -actin 和  $\beta$ -tubulin 条带灰度值与 western blot 上样量的线性关系。

## 结果

1. 我们可以根据 PVDF 膜蛋白结合区域与非蛋白结合区域不同的润湿性去检测转膜效率及上样的标准化, 并且该 optical 方法不会影响 western blot 的后续实验。
2. 和癌旁组织相比, 人肝细胞性肝癌中  $\beta$ -actin 表达水平显著增高 ( $P < 0.05$ ); 人肝细胞性肝癌中  $\beta$ -tubulin 的表达水平明显高于癌旁组织 ( $P < 0.05$ ); 而 GAPDH 在癌组织与癌旁组织之间表达水平无明显差异 ( $P > 0.05$ )。

3. GAPDH、 $\beta$ -actin 和  $\beta$ -tubulin 与蛋白上样量均有较好的线性关系。
4. 和小鼠正常肝组织相比，小鼠脂肪肝  $\beta$ -actin 表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ )；小鼠脂肪肝中  $\beta$ -tubulin 的表达水平明显高于小鼠正常肝组织 ( $P < 0.05$ )；而 GAPDH 在小鼠脂肪肝与正常肝之间表达水平无明显差异 ( $P > 0.05$ )。
5. 在小鼠正常肝组织和脂肪肝组织中，GAPDH 与上样量的线性关系强于  $\beta$ -actin；而 GAPDH 和  $\beta$ -tubulin 与上样量均具有较好的线性关系。

## 结论

1. 可以根据PVDF膜润湿性的变化原理设计Qualitative optical方法，该法可在孵育一抗前检测western blotting的转膜效率和蛋白上样的标准化。
2. 在人肝细胞性肝癌组织和癌旁组织以及 C57 小鼠肝组织与其脂肪肝组织中，GAPDH 作为 WB 内参比  $\beta$ -tubulin 和  $\beta$ -actin 更可靠。

**关键词：**Western blot；定性 optical 方法；内参；肝细胞性肝癌；脂肪肝

# OPTIMIZE METHOD IN WESTERN BLOTTING AND RELIABILITY OF HOUSEKEEPING PROTEIN CONTROL IN LIVER TISSUES

## Abstract

### Background

The ability to determine that successful transfer and equal loading occur prior to using primary antibodies is important. And total protein staining is commonly used to check transfer efficiency and normalization, which play a crucial role in western blotting. Ponceau S and coomassie blue are commonly used, but, there are disadvantages reported in recent years. Therefore, we are interested in finding another method, which is cheap, easy and fast. As we know, protein binding region of PVDF membrane is still hydrophilic when carbinol volatilizes, however, the non-protein binding region of PVDF membrane became hydrophobic again. And this different wettability between non-protein binding region and protein binding region of Polyvinylidene difluoride membrane may be used to check transfer efficiency and equal loading in western blotting.

On the other hand, western blotting contains many steps and could provide many opportunities to interfere the final results. In order to compare the final results accurately, we need to ensure the equal loading of



gels. However, recent studies indicate that housekeeping proteins, such as glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and  $\beta$ -actin, are not always reliable in certain conditions and diseases, so, whether the expression of housekeeping protein in liver tissues with kinds of diseases changed is not clear now.

### **Objectives**

1. The aim of present study was to design an optical approach where an experimenter can observe that the proteins have been transferred to the membrane without any staining within minutes.

2. Another aim was to explore the reliability of housekeeping protein as loading control in western blotting of human hepatocellular carcinoma and mouse fatty liver tissues.

### **Methods**

1. Reliability and repeatability of optical method were compared with housekeeping protein by equal loaded protein western blotting.

2. The expression of GAPDH,  $\beta$ -actin and  $\beta$ -tubulin between the peritumor and tumor tissues were compared via western blotting.

3. The linear dynamic range of GAPDH,  $\beta$ -actin and  $\beta$ -tubulin were compared by running serial dilutions of human liver samples in western blot.

4. The expression of GAPDH,  $\beta$ -actin and  $\beta$ -tubulin between the mouse

normal liver and mouse fatty liver tissues were compared by western blotting.

5. The linear dynamic range of GAPDH,  $\beta$ -actin and  $\beta$ -tubulin were compared by running serial dilutions of mouse liver samples in western blot.

## **Results**

1. We can use this different wettability between non-protein binding region and protein binding region of PVDF membrane to check transfer efficiency and equal loading in western blotting without staining. And this novel approach does not impair reliability or repeatability of the following experiment of western blotting.

2. Compared with peritumor tissues, the expression of  $\beta$ -actin increased significantly in human hepatocellular carcinoma ( $P < 0.05$ ). The expression of  $\beta$ -tubulin in human hepatocellular carcinoma was higher than that in peritumor ( $P < 0.05$ ). And there were no significant difference of GAPDH expression between human hepatocellular carcinoma and peritumor ( $P > 0.05$ ).

3. there was no significant difference in linear response range between  $\beta$ -actin, GAPDH and  $\beta$ -tubulin in human hepatocellular carcinoma and peritumor tissues.

4. Compared with mouse normal liver, the expression of  $\beta$ -actin decreased significantly in mouse fatty liver ( $P < 0.05$ ). The expression of  $\beta$ -tubulin in

mouse fatty liver was higher than that in mouse normal liver ( $P < 0.05$ ). And there were no significant difference of GAPDH expression between mouse normal liver and mouse fatty liver ( $P > 0.05$ ).

5. In both two sample types, GAPDH had a stronger linear dynamic range than  $\beta$ -actin ( $P < 0.05$ ), and there was no significant difference in linear dynamic range between  $\beta$ -tubulin and GAPDH ( $P > 0.05$ ).

### **Conclusion**

1. The different wettability between non-protein binding region and protein binding region of PVDF membrane can be used to check transfer efficiency and normalization in western blotting.

2. GAPDH was a more reliable loading control than  $\beta$ -tubulin and  $\beta$ -actin in western blotting of human hepatocellular carcinoma and mouse fatty liver tissues.

**Key words:** western blotting; qualitative optical method; loading control; hepatocellular carcinoma; fatty liver

# Western blotting 步骤优化及肝组织中管家蛋白内参可靠性的初步研究

## 前言

在人类肝癌发生发展分子机制的研究中,为了探索肝癌的特异性蛋白质和药物靶点,常用 western blotting 检测癌组织和癌旁组织目的蛋白质表达水平的差异。在检测不同组织中目的蛋白质差异表达时,需要用内参来控制 western blotting 蛋白质上样的等量化,这样不同组织间才有可比性。Western blotting 实验中常用的内参有: GAPDH,  $\beta$ -actin,  $\beta$ -tubulin, 然而,目前许多文献开始质疑上述三种蛋白内参的可靠性,认为这些内参蛋白质会随组织的变化而发生蛋白质表达水平的变化。那么,在肝脏组织中哪一种蛋白内参较为可靠仍然存在争议。

Western blotting, 又称之为 immunoblotting, 现已广泛用于生命科学研究和生物化学研究中[1,2]。Western blotting 包括蛋白质电泳,转膜,蛋白质的免疫检测[3]。其具体操作步骤繁多,并且每一步都可以独立地、明显地影响着最后的结果[4]。因此,每次 Western blotting 实验都要检查其转膜效率与蛋白上样的标准化。通常地,在孵育一抗之前,有蛋白印记的膜需要立春红染色,或者用考马斯亮蓝染 SDS-聚丙烯酰胺凝胶,来判断 western blotting 转膜效率和蛋白质是否等量上样。尽管总蛋白染色法很常用,然而,最近有文献报道该方法有不少缺陷如染色剂的毒性,操作的困难性[5]。此外,近来报道的 stain-free 技术优势突出,有文献报道该技术比  $\beta$ -actin 作内参更可靠[6],并且也能检测转膜效率和控制蛋白上样的标准化。然而,该技术尚未普及,需要购买特殊的 cooled-CCD 成像器和商业化的凝胶[7]。那么,能否设计一个简单的方法,不需要染色,仅需几分钟即可在 western blotting 实验过程中用肉眼观察到转膜效率并检测蛋白上样是否等量。

PVDF(Polyvinylidene difluoride)膜,是一种含氟聚合物,具有很高的机械强度和疏水性,正被广泛应用于生物医学的研究中,例如 Western blotting[8,9,10]。由于 PVDF 膜的疏水性,在转膜前常将其浸入甲醇 30 秒使之

变得亲水性。转膜时，PVDF 膜能网住蛋白质，而让液体快速通过网孔[11]。PVDF 膜的润湿性取决于两个因素：表面的组成和表面的粗糙程度[12]，因此，膜上的甲醇挥发后，PVDF 膜上的蛋白质结合区域仍然保持着亲水性，而 PVDF 膜上的非蛋白质结合区域再次变回疏水性。

那么，能否应用上述 PVDF 膜润湿性的变化规律来检测 western blotting 的转膜效率和蛋白上样的标准化？如果可以，这种方法能否用来检测肝脏组织 western blotting 蛋白内参的可靠性？这些问题需要进一步研究。因此，在本研究中，我们根据 PVDF 膜润湿性的变化来设计一个简便的检测转膜效率和判断上样等量化的方法，然后运用这个简便的方法去验证 GAPDH,  $\beta$ -actin,  $\beta$ -tubulin 作为肝脏组织 western blotting 蛋白内参的可靠性，为后续的肝脏组织 western blotting 实验奠定基础。

## 第一部分 Western blotting 步骤的优化: Qualitative optical way

通常地, 在孵育一抗之前, 有蛋白印记的膜需要立春红染色, 或者用考马斯亮蓝染 SDS-聚丙烯酰胺凝胶, 来判断 western blotting 转膜效率和蛋白质是否等量上样。尽管总蛋白染色法很常用, 然而, 最近有文献报道该方法有不少缺陷如染色剂的毒性, 操作的困难性[5]。此外, 近来报道的 satin-free 技术优势突出, 有文献报道该技术比  $\beta$ -actin 作内参更可靠[6], 并且也能检测转膜效率和控制蛋白上样的标准化。然而, 该技术尚未普及, 需要购买特殊的 cooled-CCD 成像器和商业化的凝胶[7]。

PVDF (Polyvinylidene difluoride) 膜, 是一种含氟聚合物, 具有很高的机械强度和疏水性, 正被广泛应用于生物医学的研究中, 例如 Western blotting[8, 9, 10]。由于 PVDF 膜的疏水性, 在转膜前常将其浸入甲醇 30 秒使之变得亲水性。转膜时, PVDF 膜能网住蛋白质, 而让液体快速通过网孔[11]。PVDF 膜的润湿性取决于两个因素: 表面的组成和表面的粗糙程度[12], 因此, 膜上的甲醇挥发后, PVDF 膜上的蛋白质结合区域仍然保持着亲水性, 而 PVDF 膜上的非蛋白质结合区域再次变回疏水性。

### 1. 材料和方法

#### 1.1 实验材料

##### 1.1.1 细胞株

HepG2、SMCC-7721 两株细胞均购买于中国上海生命科学院的细胞库, 冻存的细胞株保存于重庆医科大学附属第二医院病毒性肝炎研究所。

##### 1.1.2 临床标本

于重庆医科大学附属第二医院肝胆外科建立的肿瘤组织标本库中采集, (2015 年 5 月~2016 年 3 月间, 癌组织和癌旁组织。) 择入标准: 术前未行放化疗等治

疗，病理检查结果为原发性肝细胞性肝癌。组织取出后，迅速用 PBS 冲洗表面的血液，然后迅速转移至重庆医科大学附属第二医院病毒性肝炎研究所的液氮罐中保存。

### 1.1.3 动物标本

C57 小鼠正常肝脏组织由重庆医科大学生命科学院的袁方超博士馈赠，共 6 例，组织用 PBS 冲洗表面的血液后，迅速用液氮转移至重庆医科大学附属第二医院病毒性肝炎研究所的液氮罐中保存。

### 1.1.4 主要试剂

胎牛血清	美国 Hyclone 公司，USA
DMEM 高糖培养基	美国 Hyclone 公司，USA
PBS	博士德生物制品有限公司，广州
DMSO	美国 sigma 公司，USA
胰蛋白酶	美国 Hyclone 公司，USA
BCA 蛋白浓度测定试剂盒	碧云天生物技术有限公司，上海
总蛋白提取试剂盒	贝博生物技术有限公司，上海
RIPA 裂解液	碧云天生物技术有限公司，上海
P/S 双抗	碧云天生物技术有限公司，上海
PMSF	碧云天生物技术有限公司，上海
异丙醇、甲醇、乙醇	化学试剂公司，成都
PIC	德国 Roche 公司，Germany
PVDF 膜	美国 Millipore 公司，USA
过滤滤纸	美国 3M 公司，USA
蛋白上样 marker	美国 Thermo 公司，USA
5×loading 缓冲液	碧云天生物技术有限公司，上海
PH6.8 Tris	碧云天生物技术有限公司，上海
PH8.8 Tris	碧云天生物技术有限公司，上海
30%Acr-Bis (29: 1)	碧云天生物技术有限公司，上海
TEMED	碧云天生物技术有限公司，上海

AP	碧云天生物技术有限公司, 上海
SDS	碧云天生物技术有限公司, 上海
$\beta$ -actin 兔多克隆抗体 (B1033)	博奥龙免疫技术有限公司, 北京
GAPDH 鼠单克隆抗体 (ARG10112)	Arigo 生物技术有限公司, 台湾
羊抗兔二抗 (BA1054)	博士德生物制品有限公司, 广州
羊抗鼠二抗 (BA1050)	博士德生物制品有限公司, 广州
甘氨酸	北京 Solarbio 科技有限公司, 北京
Tris-Base	北京 Solarbio 科技有限公司, 北京
氯化钠	上海生物工程股份有限公司, 上海
高钙脱脂奶粉	美国 sigma 公司, USA
TBS	碧云天生物技术有限公司, 上海
Tween-20	美国 Sigma 公司, USA
ECL Plus 显影液	碧云天生物技术有限公司, 上海

### 1.1.5 主要实验仪器

加样枪	Eppendorf 公司, 德国
-80℃冰箱	海尔公司, 中国
离心机	Eppendorf 公司, 德国
超净台	Thermo 公司, 美国
水浴箱	海门市试验仪器厂, 江苏
细胞孵箱	Thermo 公司, 美国
低温离心机	Eppendorf 公司, 德国
电泳槽、电泳仪	Bio-Rad 公司, 美国
分光光度计	Thermo 公司, 美国
振荡器	Thermo 公司, 美国

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 细胞复苏

1) 从液氮罐中取出细胞株, 放置于 37℃水浴箱中融化, 动作轻柔, 避免被水箱中



的水污染。

- 2) 将完全融化后的冻存液用巴氏吸管吸出移至含有全培的离心管中。
- 3) 900rpm/4min, 37℃条件下离心, 离心完成时可见离心管底端有少量细胞沉淀。
- 4) 用巴氏管吸出上清液, 弃之, 补充完全培养基 4ml, 巴氏管轻轻吹打, 使细胞重悬。
- 5) 将重悬了的细胞悬液至于事先已加入了完全培养基 (6ml) 的 10cm 细胞培养皿中。
- 6) “井”字形轻轻晃匀, 置于显微镜下观察是否吹打均匀。
- 7) 最后将 10cm 细胞培养皿放置于 5%CO<sub>2</sub>, 37℃的细胞孵箱中培养。

### 1.2.2 细胞培养

- 1) 从孵箱取出细胞培养皿, 置于显微镜下观察细胞形态和生长密度, 判断其生长状态, 是否污染, 确定是否需要传代。
- 2) 用 75%酒精消毒后, 将完全培养基和胰蛋白酶放入孵箱中预热至 37℃, PBS 置于常温。
- 3) 用 75%医用酒精擦拭生物安全柜, 放入所需实验器材后, 紫外常规照射 30min。
- 4) 用巴氏管吸出细胞培养皿中的旧培养液 (黄色), 弃之, 用巴氏管吸取 3mlPBS 轻轻吹打细胞表面, 洗净后弃掉 PBS, 洗 2 次。
- 5) 加入 2ml 胰蛋白酶消化细胞, 并将细胞培养皿置于 37℃孵箱中, 维持蛋白酶的最适温度。
- 6) 用巴氏管吸出胰蛋白酶, 加入 3ml 完全培养基, 用巴氏管吹打细胞培养皿, 使细胞离开培养皿表面。
- 7) 将细胞悬液至于离心管中, 900rpm/4min, 37℃条件下离心, 离心完成时可见离心管底端有少量细胞沉淀。
- 8) 用巴氏管吸出离心管中上清液, 弃之, 加入 4ml 完全培养基重悬细胞。
- 9) 用巴氏管将细胞悬液均分 (2ml) 各自加入两个细胞培养皿中 (事先加入全培 8ml/皿)。
- 10) “井”字形轻轻晃匀, 置于显微镜下观察是否吹打均匀。
- 11) 最后将 10cm 细胞培养皿放置于 5%CO<sub>2</sub>, 37℃的细胞孵箱中培养。

### 1.2.3 细胞蛋白质提取

根据贝博总蛋白提取试剂盒说明书操作，具体如下：

- 1) 蛋白提取液制备：每 1ml 冷的总蛋白提取液中加入 4  $\mu$ l 磷酸酶抑制剂和 4  $\mu$ l 蛋白酶抑制剂，用 1ml 加样枪吹打混匀，置于冰上备用。
- 2) 用 1ml 加样枪吸取细胞培养皿表面的培养基，弃之。
- 3) 用 PBS 洗涤细胞培养皿 2 次，每次洗涤后用 1ml 加样枪尽量吸尽 PBS。
- 4) 加入适量冷的总蛋白提取液，震荡 5 分钟，并与细胞刮刀挂下，并用加样枪吸入移至另一干净 2ml 的 EP 管中。
- 5) 在 13300rpm、4 $^{\circ}$ C 条件下，离心 20min。
- 6) 将上清吸入另一干净的 1.5ml 的 EP 管中，即得到总蛋白。
- 7) 将上述细胞蛋白原液用 BCA 蛋白定量试剂盒定量后分装于-80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用。

### 1.2.4 组织蛋白质提取

根据贝博总蛋白提取试剂盒说明书操作，具体如下：

- 1) 蛋白提取液制备：每 1ml 冷的总蛋白提取液中加入 4  $\mu$ l 磷酸酶抑制剂和 4  $\mu$ l 蛋白酶抑制剂，用 1ml 加样枪吹打混匀，置于冰上备用。
- 2) 取 0.08g（用电子称）组织样本入 2ml 的 EP 管中，用眼科剪剪碎，加入预冷的 1ml 总蛋白提取液，并用组织匀浆器匀浆至无明显肉眼可见固体。
- 3) 在 13300rpm、4 $^{\circ}$ C 条件下，离心 20min。
- 4) 将上清吸入另一干净的 1.5ml 的 EP 管中，即得到总蛋白。
- 5) 将上述组织蛋白原液用 BCA 蛋白定量试剂盒定量后分装于-80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用。

### 1.2.5 蛋白质定量

根据碧云天 BCA 蛋白浓度定量试剂盒说明书进行操作，具体步骤如下：

- 1) 取适量 25mg/ml 蛋白标准品，用 PBS 稀释至最终浓度 0.5mg/ml。
- 2) 根据样品数量，将 BCA 试剂 A 与 BCA 试剂 B 按 50:1 的比例，配置适量 BCA 工作液，充分混匀后置于冰上备用。
- 3) 将标准品按 0、1、2、4、8、12、16、20  $\mu$ l 加到 96 孔板中，再加 PBS 补足到

20  $\mu$  l。

4) 加 2  $\mu$  l 体积待测样品至 96 孔板中, 加 PBS18  $\mu$  l 补足。

5) 每个孔均加 200  $\mu$  l BCA 工作液, 37 $^{\circ}$ C 孵箱中放置 30min。

6) 用酶标仪测定波长=562nm 时各孔的吸光度。

7) 根据标准曲线和使用待测样品的体积计算出待测样品的蛋白浓度。

### 1.2.6 蛋白质印迹试验

配置电泳凝胶:

1) 分离胶 (两块):

ddH <sub>2</sub> O	8.0ml
PH8.8Tris	5.0ml
30% Acr-Bis (29: 1)	6.6ml
10%SDS	200 $\mu$ l
10%AP	200 $\mu$ l
TEMED	8 $\mu$ l

2) 浓缩胶 (两块):

ddH <sub>2</sub> O	6.8ml
PH6.8Tris	1.26ml
30% Acr-Bis (29: 1)	1.66ml
10%SDS	100 $\mu$ l
10%AP	100 $\mu$ l
TEMED	10 $\mu$ l

电泳:

1) 将已定量的蛋白样品 (每孔 40  $\mu$  g) 与 5 $\times$ loading 缓冲液以 4:1 的比例混合, 98.5 $^{\circ}$ C 持续 5min 后放置于室温冷却。

2) 蛋白预染 marker 不加热, 放置于冰上待用。

3) 取出两块已事先配置好的电泳凝胶, 放入电泳卡槽中, 夹紧。倒入事先配置好

的电泳液。

- 4) 将混有 loading buffer 的上样液震荡，瞬时离心，上样，开启电源，跑电泳。
- 5) 电泳条件：恒压 90V，90min，37℃，若溴酚蓝没有跑到胶的尽头，可以适当增加时间。

转膜（湿法转膜）：

- 1) 配制 1×电转液（10×电转液:ddH<sub>2</sub>O:甲醇=1:7:2），放置于 4℃冰箱中预冷。
- 2) 在操作盘中倒入电转液，放入带孔夹板，白色滤纸，黑色海绵。
- 3) 弃掉浑浊的电泳液，用 Bio-rad 塑料薄片撬开胶板，根据转膜时的需要切胶。
- 4) 剪切下合适大小的 0.45PVDF 膜，用甲醇浸泡 30 秒。
- 5) 制作“三明治”：黑色-黑孔板-黑色海绵-白色滤纸-凝胶-PVDF 膜-白色滤纸-黑色海绵-透明孔板-红色。
- 6) 放入电转盒中，电转盒埋入冰盒中，开启电源，转膜。
- 7) 转膜条件：恒压 90V，60min，4℃，电源为 Bio-rad Universal。

抗体孵育：

- 1) 配制封闭液，5%牛奶，2g 奶粉+40ml TBST。
- 2) 用配好的封闭液封闭 PVDF 膜，37℃，摇床（轻摇或静置），1 小时。
- 3) 配制一抗，抗体:TBST=1:1000。
- 4) 将一抗、PVDF 膜置于抗体孵育盒中，4℃，摇床（轻摇或静置），过夜。
- 5) 配制二抗，抗体:5%牛奶=1:5000。
- 6) 回收一抗，用 TBST 洗涤 PVDF 膜，摇床轻摇，洗 3 次，每次 10min。
- 7) 将二抗、PVDF 膜置于抗体孵育盒中，37℃，摇床（轻摇或静置），1 小时。
- 8) 弃去二抗，用 TBST 洗涤 PVDF 膜，摇床轻摇，洗 3 次，每次 10min。

ECL 显影：

- 1) 将碧云天 ECL 试剂盒中的 A 液和 B 液等体积混合（0.85ml+0.85ml）。
- 2) 用镊子夹出 PVDF 膜，放置于培养皿盖子上，加入事先配好的 ECL 工作液，约 1min 后，放置于凝胶成像仪上，照像并将所得的结果保存。

## 1.2.7 统计学分析

Western blotting 实验结果用 软件 Image Pro Plus 进行处理, 并计算条带的灰度值。所有检测指标均用均数±标准差 ( $X \pm SD$ ) 来表示, 所有统计数据均运用统计软件 SPSS 19.0 进行处理, 多组间的差异均使用单因素方差分析, 两组间的比较均使用  $t$  检验。  $P < 0.05$  认为差异具有统计学意义。

## 2. 结果

### 2.1 设计 Qualitative optical way 的操作步骤

根据 PVDF 膜润湿性的变化规律, 设计出检测转膜效率和观察蛋白上样是否标准化的具体方法, qualitative optical way, 如图 1, 在 western blotting 转膜完成后, 打开“三明治”, 用镊子夹出 PVDF 膜, 晾干片刻使甲醇挥发。然后将 PVDF 膜放置于浸润了电转液 (含甲醇) 的白色滤纸上, 根据反光即可用肉眼观察到 PVDF 膜上的泳道以及条带。

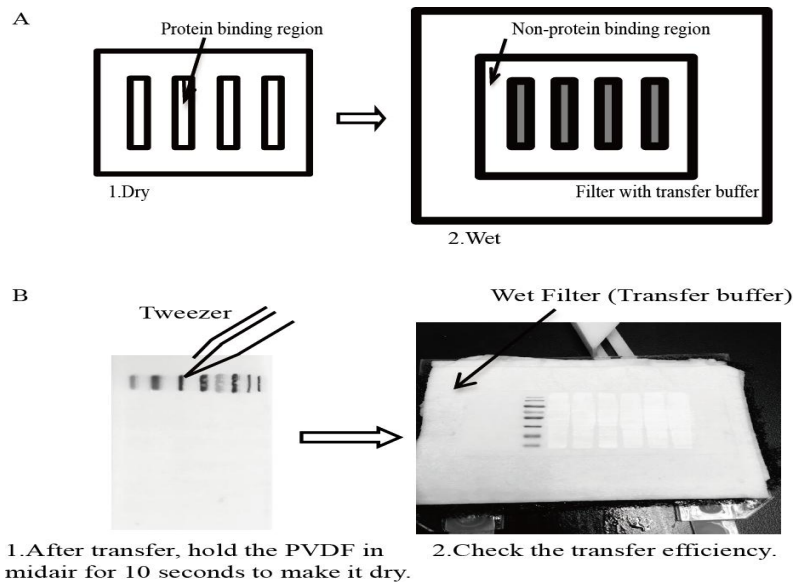


图 1: 图示 qualitative optical way 可能的工作原理 (A) 以及具体实施的操作步骤 (B)

Figure1: A diagram showing how this method probably work (A) and practical steps to check transfer efficiency and equal loading in western blotting with naked eye (B).

## 2.2 验证 Qualitative optical way 的可靠性与可重复性

验证 qualitative optical way 的可靠性与重复性, 可通过和等量上样的蛋白内参 (GAPDH or  $\beta$ -actin) 进行比较。结果如图 2, 在小鼠正常肝组织 (M, n=6), 人类肝细胞肝癌组织 (癌旁 P, n=3; 癌 T, n=3) 和肝癌细胞 (HepG2: G, n=3; SMMC-7721: C, n=3) 3 组中, 都可以在 PVDF 膜封闭前用 qualitative optical way 清楚地观察到白色泳道, 甚至在细胞样本组观察到了白色的条带, 并且可以观察到等量上样的泳道之间有着近似一致的泳道宽度和反光强度, 这和最后显影的内参蛋白条带相对应。因此, qualitative optical way 不会影响 western blotting 后续的免疫显影。

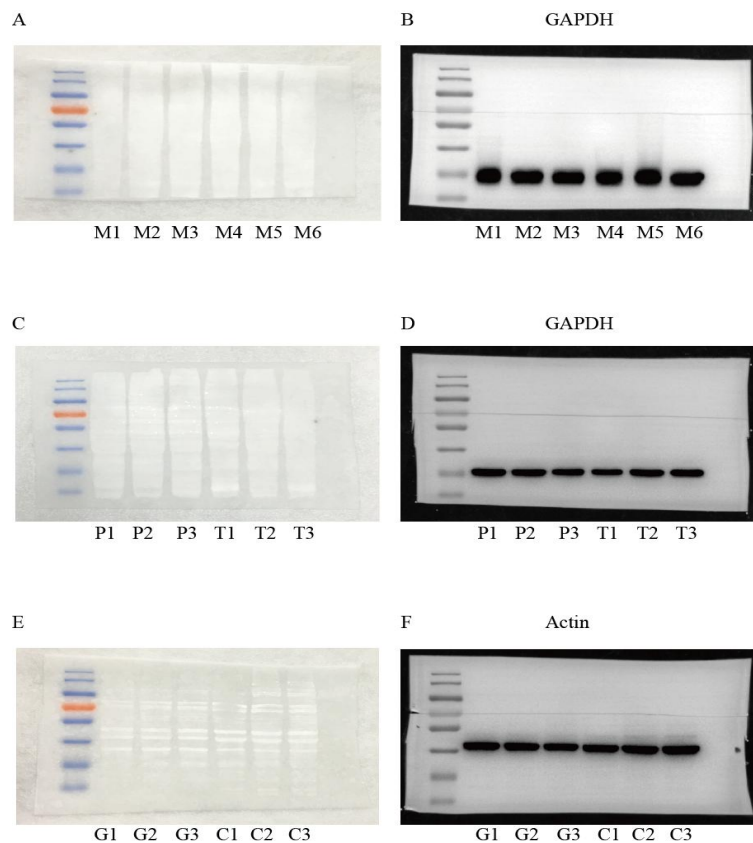


图 2: 通过和等量上样的蛋白内参比较验证 qualitative optical way 的可靠性与重复性

Figure2: Reliability and repeatability of this approach were compared with housekeeping protein by equal loaded protein western blotting. In mouse liver (A, B), human hepatocellular carcinoma tissue samples (C, D) and human hepatocellular carcinoma cell lines (HepG2, SMMC-7721, E, F), M for mouse, P for peritumor, T for tumor, G for HepG2, C for SMMC-7721. Photos (A, C, E) were captured by normal camera.

## 2.3 比较 qualitative optical way 和内参蛋白 GAPDH 的线性关系

分别对癌旁组织和癌组织两组进行梯度上样，上样梯度为：5，10，20，30，40，50  $\mu\text{g}$ 。通过 qualitative optical way 可以观察到，随着梯度上样，PVDF 膜上的白色泳道逐渐变宽，反光逐渐变强，说明 qualitative optical way 与上样量有较好的线性关系。另外，上样量与 GAPDH 灰度值的线性关系良好，说明 qualitative optical way 方法不会影响上样量与 GAPDH 灰度值的线性关系。实验中发现癌旁组织 40  $\mu\text{g}$  泳道上方有反光减弱区域（黑色箭头），随后用 Nrp1 一抗（Neuropilin-1，大分子蛋白）免疫显影，发现该处蛋白条带灰度明显减弱。因此，qualitative optical way 与上样量具有良好线性关系并能在抗体孵育前检验转膜效率。

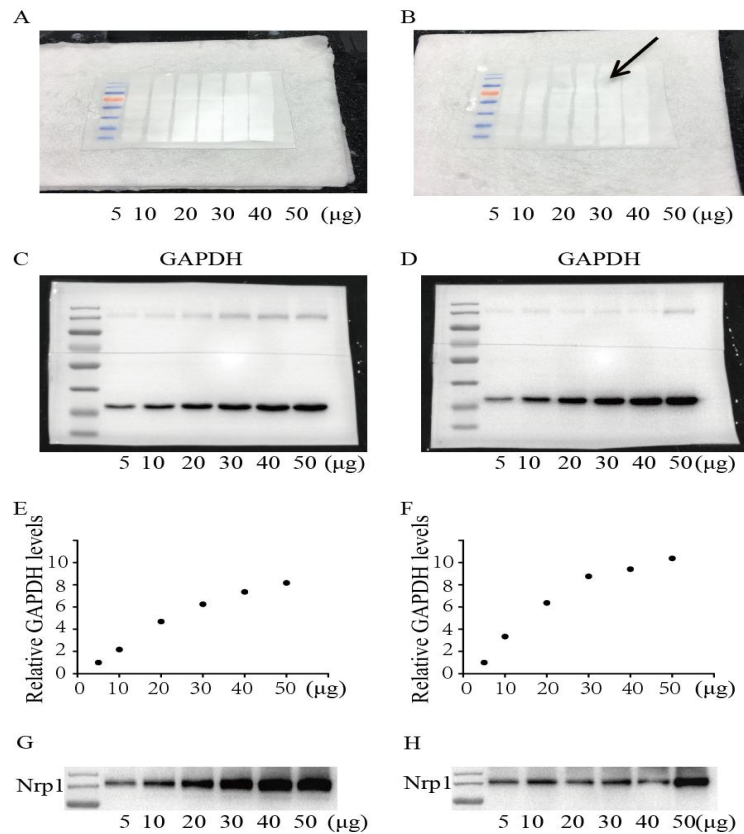


图 3: 运用梯度上样 (5-50  $\mu\text{g}$ ) 比较 qualitative optical way 和内参蛋白 GAPDH 的线性范围

Figure3: The linear dynamic range of this method and GAPDH were compared. A dilution series (5-50  $\mu\text{g}$ ) of tissue lysate from human hepatocellular carcinoma was loaded onto

the gel, after transfer, relative low reflected light intensity of protein binding region of PVDF (black arrow) was observed (A, tumor; B, peritumor, Photos were captured by normal camera), membranes were detected by anti-GAPDH antibody (C, D). The graph shows the relative intensity of GAPDH, and the relative intensity of GAPDH is nearly linear with the amounts (5-50  $\mu$ g) of loaded protein (E, F). Comparing A and G, B and H, we found that low reflected light intensity of lane (black arrow, B) reveals that protein with PVDF bind not well (H).

### 3. 讨论:

Western blotting 为确保实验的可靠性与重复性, 常常需要检测转膜效率和蛋白上样的等量化。随着该技术的不断发展, 目前报道了许多各种各样的方法, 包括: 预染蛋白 Marker、总蛋白染色、stain-free 技术等[13, 14]。其中, 预染蛋白 Marker 常常用来判断膜上分子质量大小[15], 也可侧面反映蛋白样品从凝胶转移到了膜上的强弱, 但是用它来检测转膜效率的可靠性不强。另一种方式, 就是用同一批蛋白, 跑同样地两块凝胶, 并同时转膜, 一张膜可以用 India ink, Gold 或者 SYPRO Ruby 染色, 即可检验 western blotting 的转膜效率, 另一张膜继续后续的免疫显影实验[16]。但是, 许多文献报道不建议这样操作, 认为不同凝胶上样会增加更多误差。

总蛋白染色法是很常用的方法, 例如立春红染色, 考马斯亮蓝染色。立春红染色是很常用的染色方法, 经济且可逆, 染色后可以褪色继续 western blotting 后续实验, 但是其敏感性稍差。考马斯亮蓝染色比立春红染色更可靠, 转膜后的凝胶可以用考马斯亮蓝染色, 可以判断转膜后有多少蛋白遗留在 SDS-凝胶上, 但是, 这不能确保离开凝胶的蛋白都转移到了膜上。转膜后的膜也可以用考马斯亮蓝染色, 而且敏感、经济, 然而这种方法也有不少局限性, 如毒性、不可逆性, 操作时间长等[5]。

Stain-free 技术, 用特制的带有自然成分的免染胶上样, 电泳时与常规 western blotting 电泳步骤相同, 但是电泳结束后, 所得凝胶即可在紫外下活化,



即可用特殊的成像设备观察到凝胶上的条带。高效，并且电泳后的凝胶也可以继续后续的实验，全程监控转印，且对最后的免疫显影无影响。目前有文献报道称 stain-free 技术胜过立春红染色，并且比内参蛋白更可靠 [14, 19]。然而，stain-free 技术目前尚未普及，需要购买昂贵的成像仪和商业化的免染凝胶。

在本研究中，我们根据转膜后 PVDF 膜的润湿性变化设计出了 qualitative optical way，并可以通过这个方法在一抗孵育前检测转膜效率并大致判断上样质量是否一直。这个方法比林春红染色和考马斯亮蓝染色更方便，比预染蛋白 Marker 更可靠，并且还有以下优点：第一，这个方法不需要额外的设备，即可在一抗孵育前检测转膜效率并大致判断各泳道蛋白上样是否一致。如果发现转膜不完全或者各孔蛋白上样明显不等量，我们可以随时终止后续的免疫显影，节约一抗。第二，当我们需要做大量的 western blotting 实验，需要孵育许多一抗时，运用这个方法可以很轻松地裁剪 PVDF 膜，并用抗体孵育盒各自孵育（可同时各自孵育目的蛋白、内参蛋白）。总之，qualitative optical way 非常经济，简便，快速。

此外，本研究还存在三点不足。首先，qualitative optical way 只是一个定性的方法，缺乏定量数据，比如测量泳道的宽度或者检测白色泳道反光强度。但是，本研究的目的是为了设计一个简单、快捷的方法，在孵育一抗之前检测 western blotting 的转膜效率以及大致判断蛋白上样是否等量化，定性方法即可。当然，如果能够获取定量数据可使 qualitative optical way 更可靠。其次，本研究的样本量相对较小，若增加样本量可能会更加支持这个方法。最后，这仅仅是 qualitative optical way 的初步探索，其影响因素和具体影响细节仍不清楚，我们会在以后的研究中继续探讨。

#### 4. 小结：

我们根据 western blotting 湿法转膜后 PVDF 膜润湿性的变化原理设计出了 Qualitative optical way，该法可在孵育一抗前检测 western blotting 的转膜效率和蛋白上样的标准化。

## 参考文献:

- [1] Wiśniewski, J. R., Mann, M., A Proteomics Approach to the Protein Normalization Problem: Selection of Unvarying Proteins for MS-Based Proteomics and Western Blotting[J]. *J. Proteome. Res.* 2016, 15(7):2321-2326.
- [2] Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979, 76(9) :4350-4354.
- [3] Hnasko, T. S., Hnasko, R. M., The Western Blot[J]. *Methods. Mol. Biol.* 2015, 1318:87-96.
- [4] Goasdoue, K., Awabdy, D., Bjorkman, S. T., Miller, S., Standard loading controls are not reliable for Western blot quantification across brain development or in pathological conditions[J]. *Electrophoresis* 2016, 37(4) :630-634.
- [5] Colella, A. D., Chegenii, N., Tea, M. N., Gibbins, I. L., Williams, K. A., Chataway, T. K., Comparison of Stain-Free gels with traditional immunoblot loading control methodology[J]. *Anal. Biochem.* 2012, 430(2) :108-110.
- [6] Gilda, J. E., Gomes, A. V., Stain-Free total protein staining is a superior loading control to  $\beta$ -actin for Western blots[J]. *Anal. Biochem.* 2013, 440(2) :186-188.
- [7] Taylor, S. C., Posch, A., The design of a quantitative western blot experiment[J]. *Biomed. Res. Int.* 2014, 2014:361590.
- [8] Nourbakhsh, H., Alemi, A., Emam-Djomeh, Z., Mirsaeedghazi, H., Effect of processing parameters on fouling resistances during microfiltration of red plum and watermelon juices: a comparative study[J]. *J. Food. Sci. Technol.* 2014, 51(1) :168-172.
- [9] Zillohu, A. U., Abdelaziz, R., Homaeigohar, S., Krasnov, I., Müller, M., Strunskus, T., Elbahri, M., Biomimetic transferable surface for a real time control over wettability and photoerasable writing with water drop lens[J]. *Sci. Rep.* 2014, 4:7407.

- [10] Okuji, S., Kitazawa, H., Takeda, Y., Time of flight-secondary ion mass spectrometry analysis of protein adsorption on a polyvinylidene difluoride surface modified by ion irradiation[J]. *Colloids. Surf. B. Biointerfaces*. 2016, 148:249-254.
- [11] Berger, S. T., Ahmed, S., Muntel, J., Cuevas, Polo, N., Bachur, R., Kentsis, A., Steen, J., Steen, H., MStern Blotting-High Throughput Polyvinylidene Fluoride (PVDF) Membrane-Based Proteomic Sample Preparation for 96-Well Plates[J]. *Mol. Cell. Proteomics*. 2015, 14(10) :2814-2823.
- [12] Aqeel, S. M., Wang, Z., Than, L., Sreenivasulu, G., Zeng, X., Poly (vinylidene fluoride) / Poly (acrylonitrile)-based Superior Hydrophobic Piezoelectric Solid Derived by Aligned Carbon Nanotube in Electrospinning: Fabrication, the Phase Conversion and Surface Energy[J]. *RSC. Adv*. 2015, 5(93) :76383-76391.
- [13] Thacker, J. S., Yeung, D. H., Staines, W. R., Mielke, J. G., Total protein or high-abundance protein: Which offers the best loading control for Western blotting[J]? *Anal. Biochem*. 2016, 496:76-78.
- [14] Rivero-Gutiérrez, B., Anzola, A., Martínez-Augustin, O., de Medina, F. S., Stain-free detection as loading control alternative to Ponceau and housekeeping protein immunodetection in Western blotting[J]. *Anal. Biochem*. 2014, 467:1-3.
- [15] Schüchner, S., Andorfer, P., Mudrak, I., Ogris, E., Anti-RAINBOW dye-specific antibodies as universal tools for the visualization of prestained protein molecular weight markers in Western blot analysis[J]. *Sci. Rep*. 2016, 6:31363.
- [16] Sasse, J., Gallagher, S. R., Detection of proteins on blot transfer membranes[J]. *Curr. Protoc. Mol. Biol*. 2003, Chapter 10, Unit10.7.
- [17] Gilda, J. E., Gomes, A. V., Western blotting using in-gel protein labeling as a normalization control: stain-free technology[J]. *Methods. Mol. Biol*. 2015, 1295:381-391.
- [18] Gürtler, A., Kunz, N., Gomolka, M., Hornhardt, S., Friedl, A. A., McDonald, K., Kohn, J. E., Posch, A., Stain-Free technology as a normalization tool in Western blot analysis[J]. *Anal. Biochem*. 2013, 433(2) :105-111.
- [19] Vigelsø, A., Dybboe, R., Hansen, C. N., Dela, F., Helge, J. W., Guadalupe, G. A., GAPDH and

$\beta$ -actin protein decreases with aging, making Stain-Free technology a superior loading control in Western blotting of human skeletal muscle[J]. J. Appl. Physiol. 2015, 118(3) :386-394.

## 第二部分 肝脏组织western blotting内参蛋白的可靠性

1979年, Towbin介绍了western blotting[1], 常用于检测生物样本中目的蛋白的表达水平。在人类肝细胞肝癌的研究中, 为了探索新的生物靶点或者生物标志物, 常常检测癌组织和癌旁组织中目的蛋白的表达情况。然而, western blotting是个复杂的实验, 步骤繁多, 每一步都会产生误差干扰最后的实验结果[2, 3]。为了确保实验结果有价值, 常常需首先确保蛋白上样的等量化。目前, 检验蛋白上样等量化的方法主要包括两大类: 第一类: 管家基因蛋白标准化, 例如:  $\beta$ -tubulin,  $\beta$ -actin and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH); 第二类: 总蛋白标准化, 例如: 立春红染色, 考马斯亮蓝染色, stain-free 免染技术。以上方法在检验western blotting蛋白上样等量化中扮演着重要的角色。

立春红染色和考马斯亮蓝染色是很常用的检验蛋白上样标准化的方法, 但是近来文献报道其存在不少的缺陷, 如染色耗时长, 染色剂毒性等[4]。另一个新方法即是stain-free免染技术, 高效、简便, 但是需要购买昂贵的成像设备和商业化凝胶[5]。考虑到上述因素, 内参蛋白标准化才成为检验蛋白是否等量上样的方法。但是, 近来有文献指出, 管家基因蛋白, 例如GAPDH和 $\beta$ -actin在一些疾病状态下作为内参并不可靠。因此, 实验者必须谨慎考虑具体情况, 选择合适可靠的内参蛋白[6]。

本研究旨在探索管家基因蛋白作为肝组织western blotting内参的可靠性。此外, 我们还将探索之前设计的qualitative optical way[7]能否帮助实验人员选择合适的内参蛋白。

## 1. 材料和方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 临床标本

于重庆医科大学附属第二医院肝胆外科建立的肿瘤组织标本库中采集，（2015年5月~2016年3月间，癌组织和癌旁组织。）择入标准：术前未行放化疗等治疗，病理检查结果为肝细胞性肝癌。组织取出后，迅速用PBS冲洗表面的血液，然后迅速转移至重庆医科大学附属第二医院病毒性肝炎研究所的液氮罐中保存。

#### 1.1.2 动物标本

C57小鼠正常肝脏组织与脂肪肝组织由重庆医科大学生命科学院的朱韦硕士馈赠，共6例，组织用PBS冲洗表面的血液后，迅速用液氮转移至重庆医科大学附属第二医院病毒性肝炎研究所的液氮罐中保存。

#### 1.1.3 主要试剂

胎牛血清	美国 Hyclone 公司, USA
DMEM 高糖培养基	美国 Hyclone 公司, USA
PBS	博士德生物制品有限公司, 广州
DMSO	美国 sigma 公司, USA
胰蛋白酶	美国 Hyclone 公司, USA
BCA 蛋白浓度测定试剂盒	碧云天生物技术有限公司, 上海
总蛋白提取试剂盒	贝博生物技术有限公司, 上海
RIPA 裂解液	碧云天生物技术有限公司, 上海
P/S 双抗	碧云天生物技术有限公司, 上海
PMSF	碧云天生物技术有限公司, 上海
异丙醇、甲醇、乙醇	化学试剂公司, 成都
PIC	德国 Roche 公司, Germany
PVDF 膜	美国 Millipore 公司, USA

过滤滤纸	美国 3M 公司, USA
蛋白上样 marker	美国 Thermo 公司, USA
5×loading 缓冲液	碧云天生物技术有限公司, 上海
PH6.8 Tris	碧云天生物技术有限公司, 上海
PH8.8 Tris	碧云天生物技术有限公司, 上海
30%Acr-Bis (29: 1)	碧云天生物技术有限公司, 上海
TEMED	碧云天生物技术有限公司, 上海
AP	碧云天生物技术有限公司, 上海
SDS	碧云天生物技术有限公司, 上海
β-actin 兔多克隆抗体 (B1033)	博奥龙免疫技术有限公司, 北京
GAPDH 鼠单克隆抗体 (ARG10112)	Arigo 生物技术有限公司, 台湾
羊抗兔二抗 (BA1054)	博士德生物制品有限公司, 广州
羊抗鼠二抗 (BA1050)	博士德生物制品有限公司, 广州
甘氨酸	北京 Solarbio 科技有限公司, 北京
Tris-Base	北京 Solarbio 科技有限公司, 北京
氯化钠	上海生物工程股份有限公司, 上海
高钙脱脂奶粉	美国 sigma 公司, USA
TBS	碧云天生物技术有限公司, 上海
Tween-20	美国 Sigma 公司, USA
ECL Plus 显影液	碧云天生物技术有限公司, 上海

#### 1.1.4 主要实验仪器

加样枪	Eppendorf 公司, 德国
-80℃冰箱	海尔公司, 中国
离心机	Eppendorf 公司, 德国
超净台	Thermo 公司, 美国
水浴箱	海门市试验仪器厂, 江苏
细胞孵箱	Thermo 公司, 美国
低温离心机	Eppendorf 公司, 德国

电泳槽、电泳仪	Bio-Rad 公司, 美国
分光光度计	Thermo 公司, 美国
振荡器	Thermo 公司, 美国
加样枪	Eppendorf 公司, 德国
-80℃冰箱	海尔公司, 中国
离心机	Eppendorf 公司, 德国

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 组织蛋白质提取

根据贝博总蛋白提取试剂盒说明书操作, 具体如下:

- 1) 蛋白提取液制备: 每 1ml 冷的总蛋白提取液中加入 4  $\mu$ l 磷酸酶抑制剂和 4  $\mu$ l 蛋白酶抑制剂, 用 1ml 加样枪吹打混匀, 置于冰上备用。
- 2) 取 0.08g (用电子称) 组织样本入 2ml 的 EP 管中, 用眼科剪剪碎, 加入预冷的 1ml 总蛋白提取液, 并用组织匀浆器匀浆至无明显肉眼可见固体。
- 3) 在 13300rpm、4℃条件下, 离心 20min。
- 4) 将上清吸入另一干净的 1.5ml 的 EP 管中, 即得到总蛋白。
- 5) 将上述组织蛋白原液用 BCA 蛋白定量试剂盒定量后分装于-80℃冰箱中保存备用。

### 1.2.2 蛋白质定量

根据碧云天 BCA 蛋白浓度定量试剂盒说明书进行操作, 具体步骤如下:

- 1) 取适量 25mg/ml 蛋白标准品, 用 PBS 稀释至最终浓度 0.5mg/ml。
- 2) 根据样品数量, 将 BCA 试剂 A 与 BCA 试剂 B 按 50:1 的比例, 配置适量 BCA 工作液, 充分混匀后置于冰上备用。
- 3) 将标准品按 0、1、2、4、8、12、16、20  $\mu$ l 加到 96 孔板中, 再加 PBS 补足到 20  $\mu$ l。
- 4) 加 2  $\mu$ l 体积待测样品至 96 孔板中, 加 PBS 18  $\mu$ l 补足。
- 5) 每个孔均加 200  $\mu$ l BCA 工作液, 37℃孵箱中放置 30min。



- 6) 用酶标仪测定波长=562nm 时各孔的吸光度。
- 7) 根据标准曲线和使用待测样品的体积计算出待测样品的蛋白浓度。

### 1.2.3 蛋白质印迹试验

配置电泳凝胶:

1) 分离胶 (两块):

ddH <sub>2</sub> O	8.0ml
PH8.8Tris	5.0ml
30% Acr-Bis (29: 1)	6.6ml
10%SDS	200 μ l
10%AP	200 μ l
TEMED	8 μ l

2) 浓缩胶 (两块):

ddH <sub>2</sub> O	6.8ml
PH6.8Tris	1.26ml
30% Acr-Bis (29: 1)	1.66ml
10%SDS	100 μ l
10%AP	100 μ l
TEMED	10 μ l

电泳:

- 1) 将已定量的蛋白样品 (每孔 40 μ g) 与 5×loading 缓冲液以 4:1 的比例混合, 98.5℃持续 5min 后放置于室温冷却。
- 2) 蛋白预染 marker 不加热, 放置于冰上待用。
- 3) 取出两块已事先配置好的电泳凝胶, 放入电泳卡槽中, 夹紧。倒入事先配置好的电泳液。
- 4) 将混有 loading buffer 的上样液震荡, 瞬时离心, 上样, 开启电源, 跑电泳。
- 5) 电泳条件: 恒压 90V, 90min, 37℃, 若溴酚蓝没有跑到胶的尽头, 可以适当增

加时间。

转膜（湿法转膜）：

- 1) 配制 1×电转液（10×电转液:ddH<sub>2</sub>O:甲醇=1:7:2），放置于 4℃冰箱中预冷。
- 2) 在操作盘中倒入电转液，放入带孔夹板，白色滤纸，黑色海绵。
- 3) 弃掉浑浊的电泳液，用 Bio-rad 塑料薄片撬开胶板，根据转膜时的需要切胶。
- 4) 剪切下合适大小的 0.45PVDF 膜，用甲醇浸泡 30 秒。
- 5) 制作“三明治”：黑色-黑孔板-黑色海绵-白色滤纸-凝胶-PVDF 膜-白色滤纸-黑色海绵-透明孔板-红色。
- 6) 放入电转盒中，电转盒埋入冰盒中，开启电源，转膜。
- 7) 转膜条件：恒压 90V, 60min, 4℃，电源为 Bio-rad Universal。

抗体孵育：

- 1) 配制封闭液，5%牛奶，2g 奶粉+40ml TBST。
- 2) 用配好的封闭液封闭 PVDF 膜，37℃，摇床（轻摇或静置），1 小时。
- 3) 配制一抗，抗体:TBST=1:1000。
- 4) 将一抗、PVDF 膜置于抗体孵育盒中，4℃，摇床（轻摇或静置），过夜。
- 5) 配制二抗，抗体:5%牛奶=1:5000。
- 6) 回收一抗，用 TBST 洗涤 PVDF 膜，摇床轻摇，洗 3 次，每次 10min。
- 7) 将二抗、PVDF 膜置于抗体孵育盒中，37℃，摇床（轻摇或静置），1 小时。
- 8) 弃去二抗，用 TBST 洗涤 PVDF 膜，摇床轻摇，洗 3 次，每次 10min。

ECL 显影：

- 1) 将碧云天 ECL 试剂盒中的 A 液和 B 液等体积混合（0.85ml+0.85ml）。
- 2) 用镊子夹出 PVDF 膜，放置于培养皿盖子上，加入事先配好的 ECL 工作液，约 1min 后，放置于凝胶成像仪上，照像并将所得的结果保存。

## 1.2.4 统计学分析

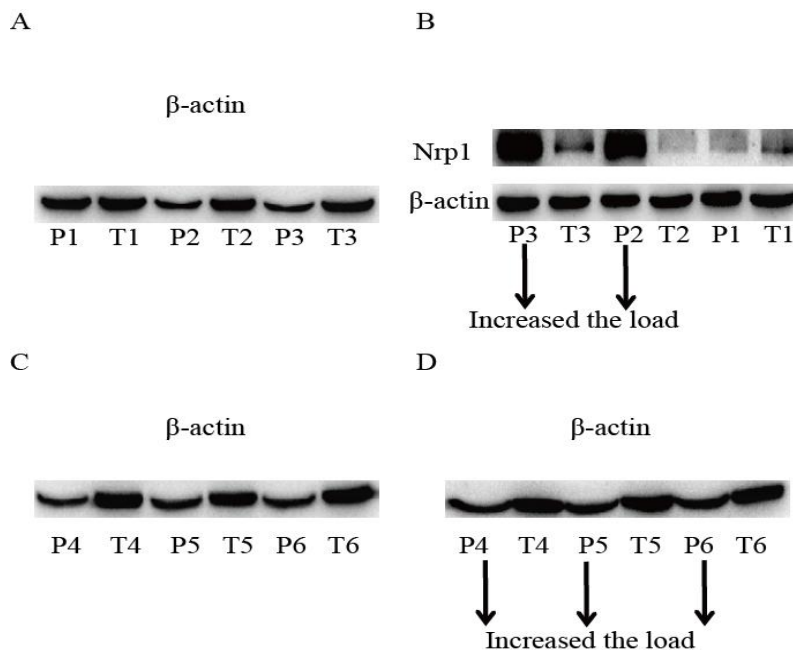
Western blotting 实验结果用 软件 Image Pro Plus 进行处理，并计算条带的灰度值。所有检测指标均用均数±标准差(X±SD)来表示，所有统计数据均运用

统计软件 SPSS 19.0 进行处理，多组间的差异均使用单因素方差分析，两组间的比较均使用 t 检验。P<0.05 认为差异具有统计学意义。

## 2. 结果

### 2.1 增加上样量无法调整 $\beta$ -actin 内参的齐性

在探索“Neuropilin-1”在肝细胞肝癌癌旁与癌组织蛋白表达水平的实验中，我们常规地运用  $\beta$ -actin 作为 western blotting 内参。第一组蛋白样品中 (n=3, 癌旁 P, 癌 T)，统一的组织重量，统一的裂解液体积，再根据 BCA 蛋白测定浓度，并计算上样量（最终上样体积一样），但结果示内参明显不齐（图 1A），增加癌旁 P3 和 P2 的上样量（上样体积增加一倍），结果示“内参齐”（图 1B）。第二组用同样的方法实施 western blotting 实验，再次出现  $\beta$ -actin 内参不齐，癌旁组织  $\beta$ -actin 表达明显较癌组织少（图 1C）。同样地，增加癌旁组织 P4, P5 和 P6 的上样量（上样体积增加一倍），结果为条带粘连，提示癌旁上样蛋白量很大，但是  $\beta$ -actin 内参仍旧不齐（图 1D）。



图一：增加上样量无法调整  $\beta$ -actin 内参的齐性

Figure1:  $\beta$ -actin was not reliable in western blotting of liver cancer tissues.

Although we loaded the same amount of these samples (via BCA protein assay kit), there was significant difference in the signal intensities between peritumor samples and tumor samples (A). As the protein load increased, final results approximately showed “equal loading of gels” (B). However, in other samples, we could not reach the goal of “equal loading of gels” (C and D). P for peritumor and T for tumor, Nrp1 for Neuropilin-1 (interest protein).

## 2.2 $\beta$ -tubulin, $\beta$ -actin 和 GAPDH 在人肝细胞肝癌组织和肝细胞肝癌癌旁组织中的表达

由实验 2.1 的结果可知,  $\beta$ -actin 可能在肝细胞性肝癌组织和癌旁组织中存在表达差异, 那么  $\beta$ -tubulin 和 GAPDH 的表达情况如何呢? 为了解决该问题, 我们收集 3 对, 6 例肝细胞性肝癌组织和癌旁组织, 进行 WB 实验。结果如下图, 运用 qualitative optical way, 我们可以清晰地观察到 PVDF 膜上的泳道, 各泳道有着近乎相一致的宽度和反光强度, 提示蛋白上样的等量性(图 2.1A, B)。肝细胞性肝癌癌旁组织  $\beta$ -actin 和  $\beta$ -tubulin 的蛋白水平显著低于肝细胞性肝癌组织(图 2.1C, D)。而 GAPDH 在肝癌组织和癌旁组织中蛋白表达水平无明显差异(图 2.1E, F)。

接着, 我们用软件 Image-Pro Plus 分析所得 WB 图, 测算条带相对灰度值 (AU, arbitrary units), 并用软件 SPSS 19 进行分析, 结果如图 2.2, 在  $\beta$ -actin 组(图 2.2A), 癌旁 P4 相对灰度值视为 1.0, 癌 T4,  $1.9438 \pm 0.04641$ ; 癌旁 P5,  $0.3950 \pm 0.0445$ ; 癌 T5,  $1.7651 \pm 0.20062$ ; 癌旁 P6,  $0.3543 \pm 0.00969$ ; 癌 T6,  $1.6073 \pm 0.08614$ 。其中, P4 与 T4, P5 与 T5, P6 与 T6 灰度值有明显差异,  $p < 0.05$ 。在  $\beta$ -tubulin 组(图 2.2B), 癌旁 P5 相对灰度值视为 1.0, 癌旁 P4,  $0.1101 \pm 0.01873$ ; 癌 T4,  $0.7418 \pm 0.08955$ ; 癌 T5,  $2.0346 \pm 0.16644$ ; 癌旁 P6,  $0.9133 \pm 0.10101$ ; 癌 T6,  $1.1186 \pm 0.13095$ 。其中, P4 与 T4, P5 与 T5, 灰度值有明显差异,  $p < 0.05$ 。P6 与 T6, 虽  $p > 0.05$ , 无统计学差异, 但是, T6 相对灰度值小可能是由 WB 转膜时的边缘效应造成的。以上结果说明,  $\beta$ -tubulin, 与  $\beta$ -actin 在人肝细胞性肝癌组织和人肝细胞性肝癌癌旁组织中存在表达水平的差异, 不适合作为这两种组织 WB

的内参蛋白。

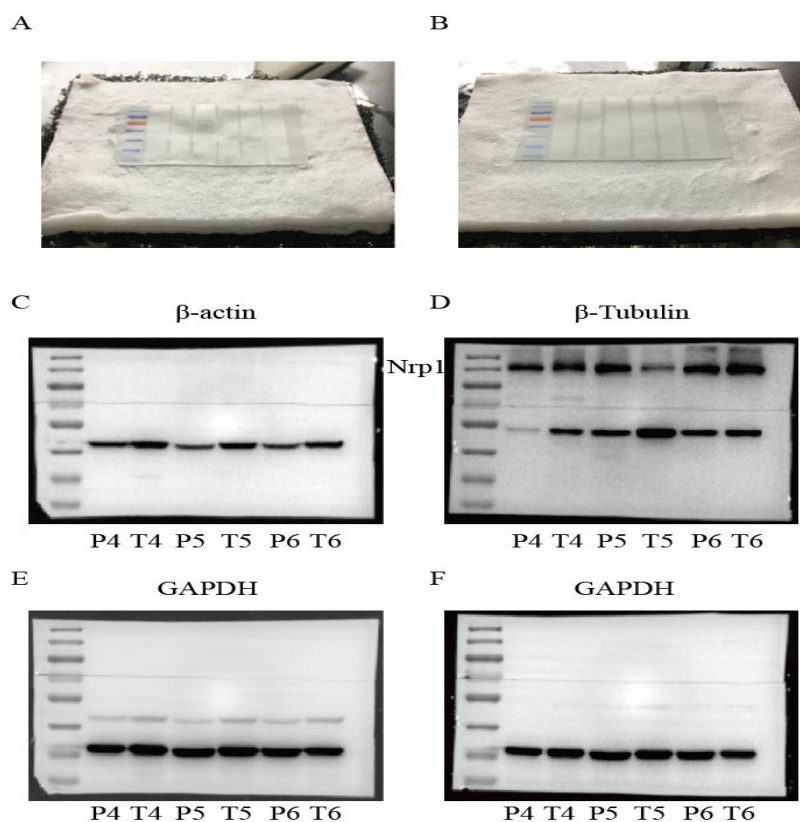


图 2.1  $\beta$ -tubulin,  $\beta$ -actin 和 GAPDH 在肝细胞肝癌组织和肝细胞肝癌旁组织中的表达

Figure2.1: Western blotting of housekeeping proteins in human liver cancer tissues. We could observe the lanes (Photos were captured by normal camera) with nearly uniform width via the qualitative optical method (A and B). Peritumor had lower expression levels of  $\beta$ -actin and  $\beta$ -tubulin than tumor tissues (C and D). In both peritumor and tumor tissues, GAPDH was expressed at equal levels (E and F). Nrp1 for Neuropilin-1 (interest protein), P for peritumor, T for tumor.

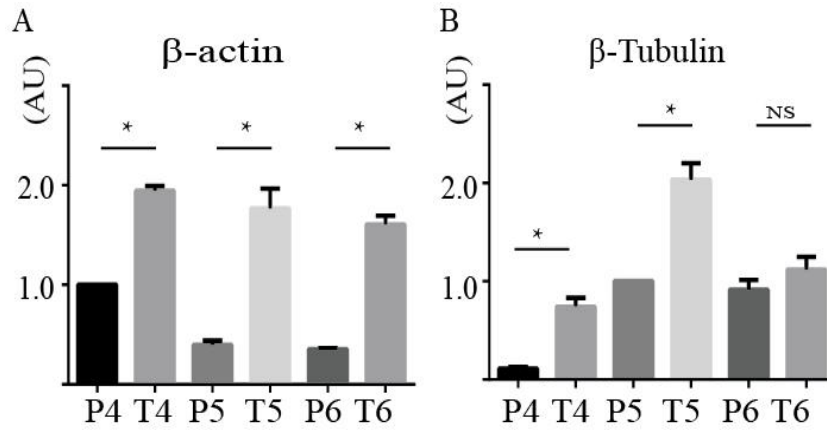


图 2.2  $\beta$ -tubulin 与  $\beta$ -actin WB 条带灰度值分析

Figure 2.2: Signal intensities were obtained by Image-Pro Plus. AU for arbitrary units. Data presented as mean $\pm$ SD. Analysis was conducted in triplicate. (\*,  $p < 0.05$ ; NS,  $p > 0.05$ )

### 2.3 在人肝癌组织中 $\beta$ -tubulin, $\beta$ -actin 和 GAPDH 与上样量的线性关系

分别对癌旁组织和癌组织两组进行梯度上样，上样梯度为：5, 10, 20, 30, 40, 50  $\mu$ g, 结果如图 3.1, 并通过相对灰度值, 计算各组  $R^2$ , 结果如图 3.2。在癌旁组织中,  $\beta$ -actin ( $R^2=0.93$ ), GAPDH ( $R^2=0.92$ ),  $\beta$ -tubulin ( $R^2=0.97$ ); 在肿瘤组织中  $\beta$ -actin ( $R^2=0.96$ ), GAPDH ( $R^2=0.95$ ),  $\beta$ -tubulin ( $R^2=0.92$ )。提示上样量与  $\beta$ -tubulin,  $\beta$ -actin, GAPDH 灰度值的线性关系良好, 说明内参蛋白灰度值可以准确反映蛋白的上样量, 同时也间接提示之前 (结果 2.2)  $\beta$ -tubulin 与  $\beta$ -actin 内参不齐是由于肝细胞性肝癌癌组织与癌旁组织间存在表达水平差异。

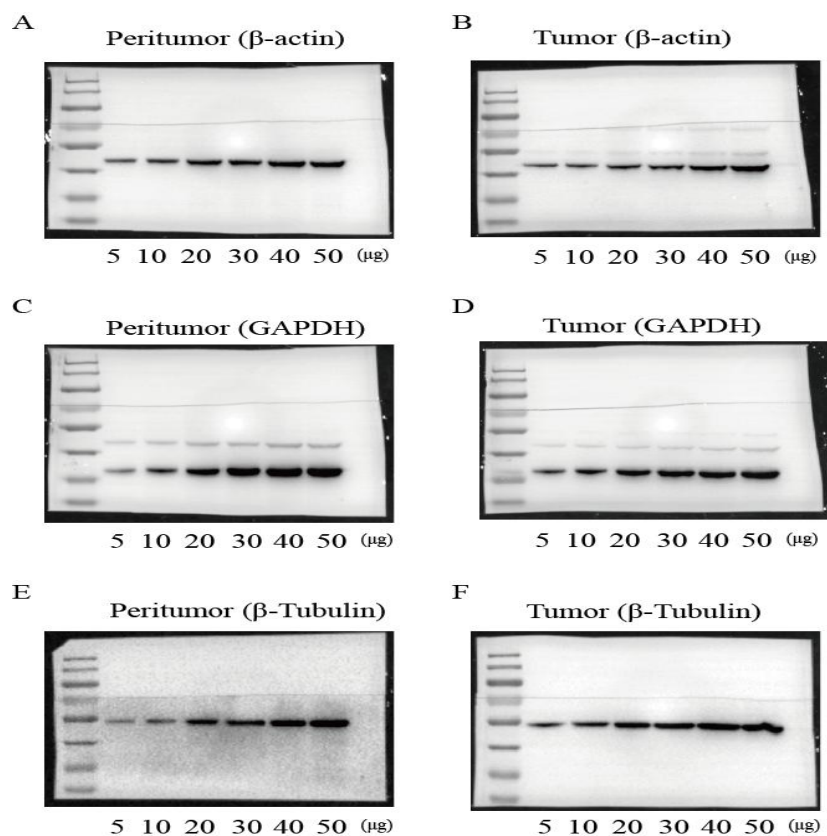


图 3.1 在肝癌组织中  $\beta$ -tubulin,  $\beta$ -actin 和 GAPDH 与上样量的线性关系

Figure3.1: Linear response range evaluation of housekeeping proteins in liver cancer tissues. The signal intensities of all these proteins (5-50  $\mu$ g) in both two sample types gradually increased.

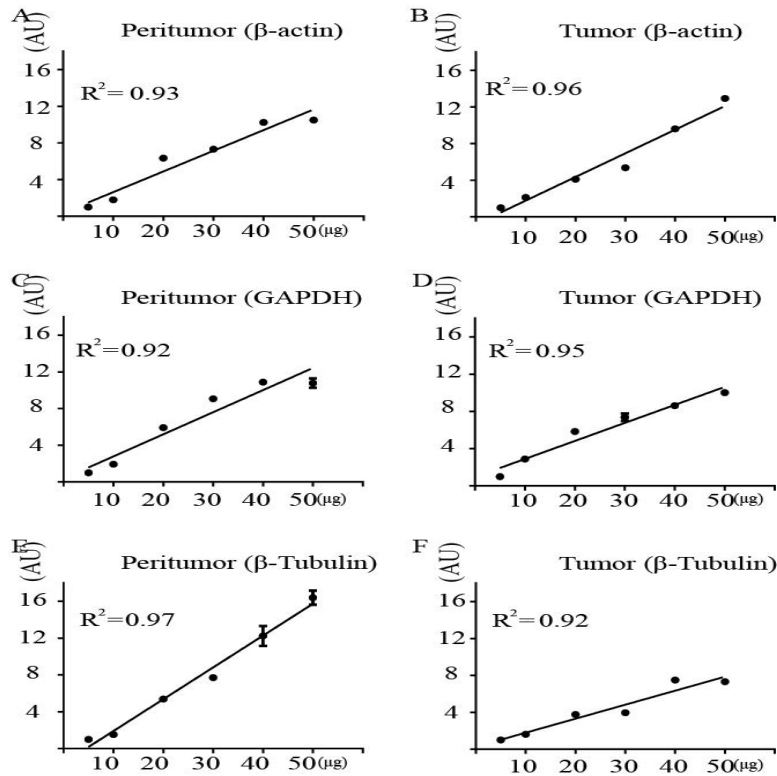


图 3.2 计算  $\beta$ -tubulin,  $\beta$ -actin 和 GAPDH 的  $R^2$

Figure3.2: In both peritumor and tumor, there was no significant difference in linear response range between  $\beta$ -actin, GAPDH and  $\beta$ -tubulin. AU for arbitrary units. Data were represented as densitometry signal/ $\mu$ g of proteins.

## 2.4 $\beta$ -tubulin, $\beta$ -actin 和 GAPDH 在 C57 小鼠正常肝组织和脂肪肝组织中的表达

$\beta$ -actin 的产品说明书上提到, (Biodragon, China, B1033) “expression of  $\beta$ -actin in adipose tissue is very low and therefore  $\beta$ -actin is not a reliable loading control for these tissues.” 此外, 肝癌癌旁组织匀浆后有时有大量的脂质, 提示癌旁组织有脂肪变, 那么  $\beta$ -tubulin,  $\beta$ -actin 的表达变化会不会是由于肝脏癌旁组织脂肪变而引起的呢? 它们在肝脏脂肪变时表达会有变化吗? 于是, 我们收集 C5 小鼠肝脏组织 (3 对, 共 6 例, C57 小鼠正常肝组织与脂肪肝组织, 人源正常肝脏组织较难获得), 采用统一上样量的 western blotting, 结果如图 4.1。运用 qualitative optical way, 在孵育抗体前检验 WB 转膜效率,



转膜效率高，无气泡，各个泳道间宽度、反光强度近乎一致，说明蛋白上样量较一致(图 4. 1A, B)。免疫显影后， $\beta$ -actin 在小鼠脂肪肝组织中蛋白表达水平低于正常肝组织(图 4. 1C)； $\beta$ -tubulin 在小鼠脂肪肝组织中蛋白表达水平高于正常组织(图 4. 1D)；GAPDH 在小鼠脂肪肝组织与正常肝组织中蛋白表达水平无明显差异，提示 GAPDH 作为 western blotting 蛋白内参时有较好的可靠性(图 4. 1E, F)。

接着通过软件 Image-Pro Plus 处理所得 WB 图像，并通过 SPSS 19 计算各条带相对灰度值，结果如图 4. 2。在  $\beta$ -actin 与 GAPDH 组中，脂肪肝组织  $\beta$ -actin 相对灰度值  $1.5586 \pm 0.49207$ ，正常肝组织  $\beta$ -actin 相对灰度值  $2.6771 \pm 0.22418$ ； $p < 0.05$ ，差异有统计学意义；脂肪肝组织 GAPDH， $1.0683 \pm 0.07039$ ，正常肝组织 GAPDH， $1.0888 \pm 0.17617$ ， $p > 0.05$ ，无统计学差异。在  $\beta$ -tubulin 与 GAPDH 组中，脂肪肝组织  $\beta$ -tubulin 相对灰度值  $1.4343 \pm 0.37843$ ，正常肝组织  $\beta$ -tubulin 相对灰度值  $0.2981 \pm 0.18160$ ， $p < 0.05$ ，差异有统计学意义；脂肪肝组织 GAPDH， $0.9724 \pm 0.10829$ ，正常肝组织 GAPDH， $0.9588 \pm 0.05935$ ， $p > 0.05$ ，无统计学差异。以上结果说明， $\beta$ -tubulin 与  $\beta$ -actin 在 C57 小鼠脂肪肝组织和 C57 小鼠正常肝组织中存在表达水平的差异，不适合作为这两种组织 WB 的内参蛋白。

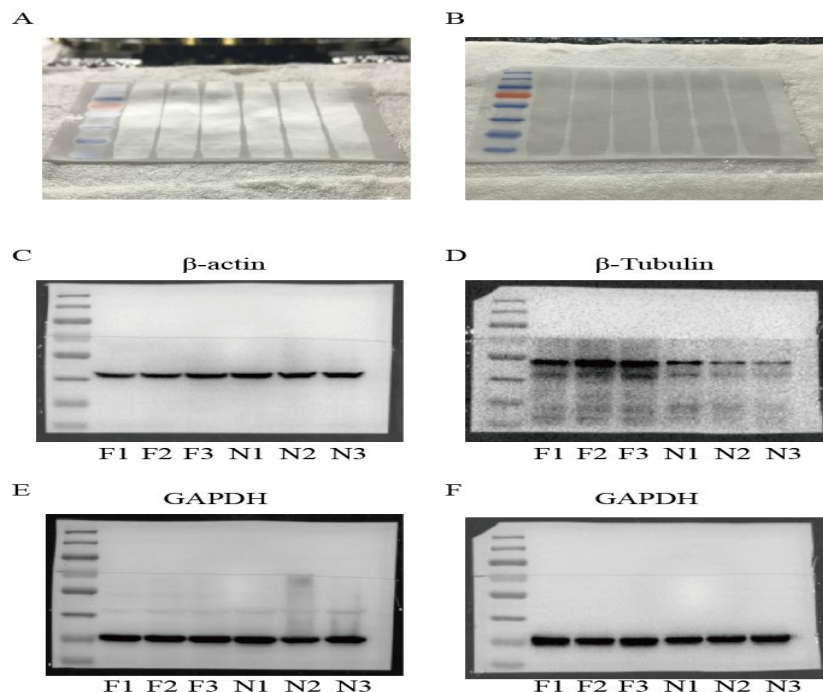


图 4.1  $\beta$ -tubulin， $\beta$ -actin 和 GAPDH 在 C57 小鼠正常肝组织和脂肪肝组织中的表达

Figure4.1: Expression levels of housekeeping proteins in mouse liver tissues. We

checked the transfer efficiency and approximate equal loading of gels, Photos were captured by normal camera (A and B). Fatty liver samples of mice had lower expression levels of  $\beta$ -actin (C) and higher expression levels of  $\beta$ -tubulin (D) than the normal liver samples. And GAPDH was expressed at equal expression levels in both fatty and normal liver samples (E, F). F for fatty liver of mice, N for normal liver of mice.

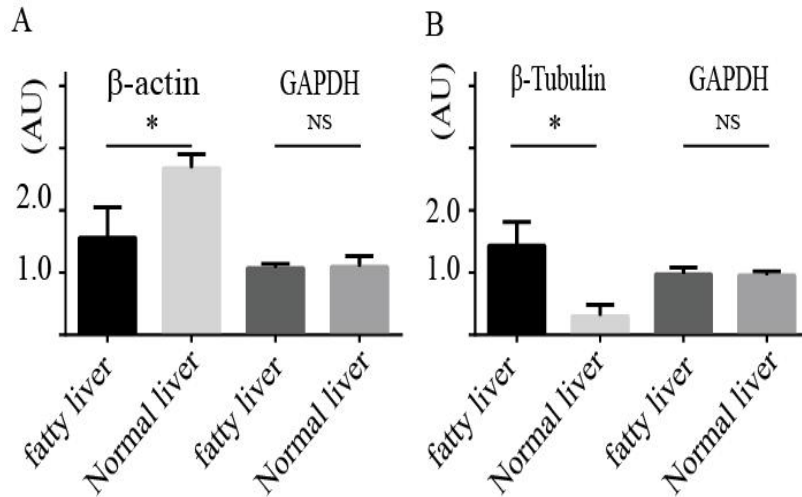


图 4.2  $\beta$ -tubulin,  $\beta$ -actin 和 GAPDH 条带相对灰度值分析

**Figure4.2:** Signal intensities were obtained by Image-Pro Plus. Graph was made by GraphPad Prism 6, AU for arbitrary units. Data presented as mean $\pm$ SD. Analysis was conducted in triplicate(\*,  $p < 0.05$ ; NS,  $p > 0.05$ ).

## 2.5 在 C57 小鼠正常肝脏组织与脂肪肝组织中 $\beta$ -actin 和 GAPDH 与上样量的线性关系

为了明确 C57 小鼠正常肝脏组织与脂肪肝组织中  $\beta$ -actin 和 GAPDH 与上样量的线性关系, 分别对 C57 小鼠脂肪肝组织和 C57 小鼠正常肝组织两组进行梯度上样, 上样梯度为: 5, 10, 20, 30, 40, 50  $\mu$ g, WB 结果如图 5.1, 并计算相对灰度值和各组  $R^2$ , 结果如图 5.2。在 C57 小鼠正常肝组织中,  $\beta$ -actin ( $R^2=0.69$ ), GAPDH ( $R^2=0.96$ ); 在 C57 小鼠脂肪肝组织中  $\beta$ -actin ( $R^2=0.88$ ), GAPDH ( $R^2=0.93$ )。结果提示上样量与 GAPDH 灰度值的线性关系比  $\beta$ -actin 灰度值与上样量的线性关系好, 说明 GAPDH 比  $\beta$ -actin 更能准确反应 WB 蛋白的上样量。

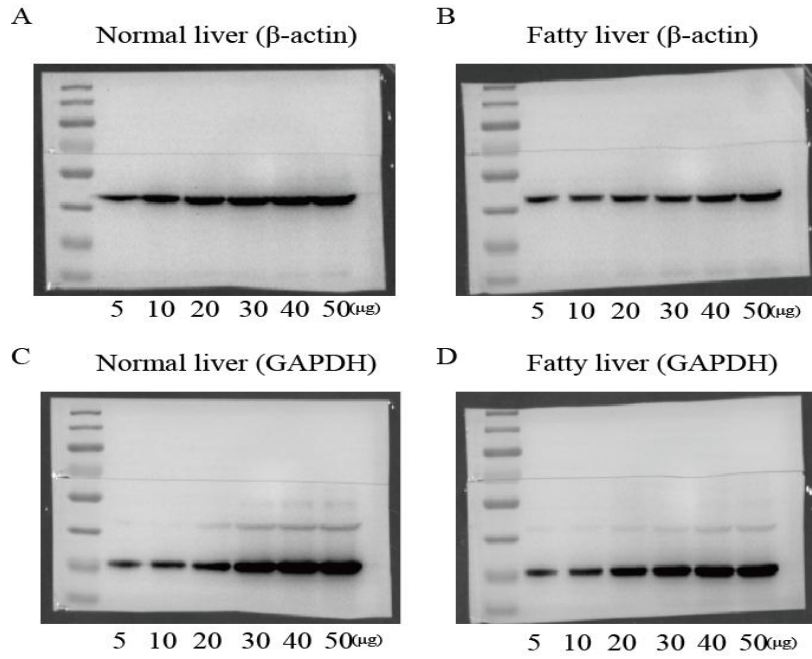


图 5.1 C57 小鼠肝脏组织中  $\beta$ -actin 和 GAPDH 与上样量的线性关系

Figure5.1: Linear dynamic range of  $\beta$ -actin and GAPDH. Signal intensities of  $\beta$ -actin (5-50  $\mu$ g) did not gradually increase well in both two sample types (A and B). However, GAPDH had a strong linear dynamic range in both two samples (C and D).

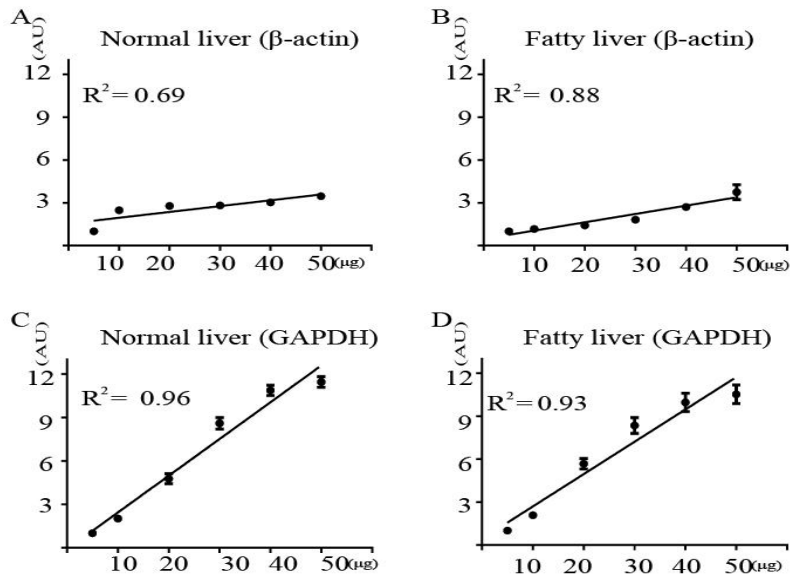


图 5.2 计算  $\beta$ -actin 和 GAPDH 的  $R^2$

Figure5.2: Signal intensities were obtained by Image Pro Plus, AU for arbitrary units.

Data were represented as densitometry signal/ $\mu\text{g}$  of proteins.

## 2.6 在 C57 小鼠正常肝脏组织与脂肪肝组织中 $\beta$ -tubulin 和 GAPDH 与上样量的线性关系

分别对 C57 小鼠脂肪肝组织和 C57 小鼠正常肝组织两组进行梯度上样, 上样梯度为: 5, 10, 20, 30, 40, 50  $\mu\text{g}$ , WB 结果如图 6.1, 并根据条带的相对灰度值计算各组  $R^2$ , 结果如图 6.2。在 C57 小鼠正常肝组织中,  $\beta$ -tubulin ( $R^2=0.92$ ), GAPDH ( $R^2=0.96$ ); 在 C57 小鼠脂肪肝组织中  $\beta$ -tubulin ( $R^2=0.95$ ), GAPDH ( $R^2=0.97$ )。结果提示上样量与  $\beta$ -tubulin 和 GAPDH 灰度值的线性关系良好, 说明其灰度值可以准确反映蛋白的上样量。

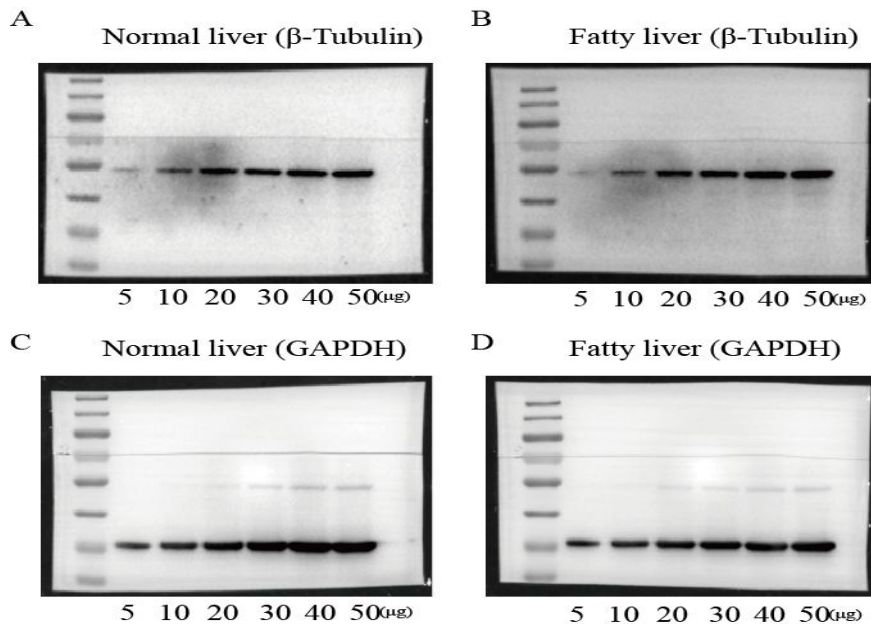


图 6.1 在 C57 小鼠肝脏组织  $\beta$ -tubulin 和 GAPDH 与上样量的线性关系

Figure. 6: Linear response range of  $\beta$ -tubulin and GAPDH. In both two sample types, there was no significant difference in linear dynamic range between  $\beta$ -tubulin and GAPDH (A, B, C and D).

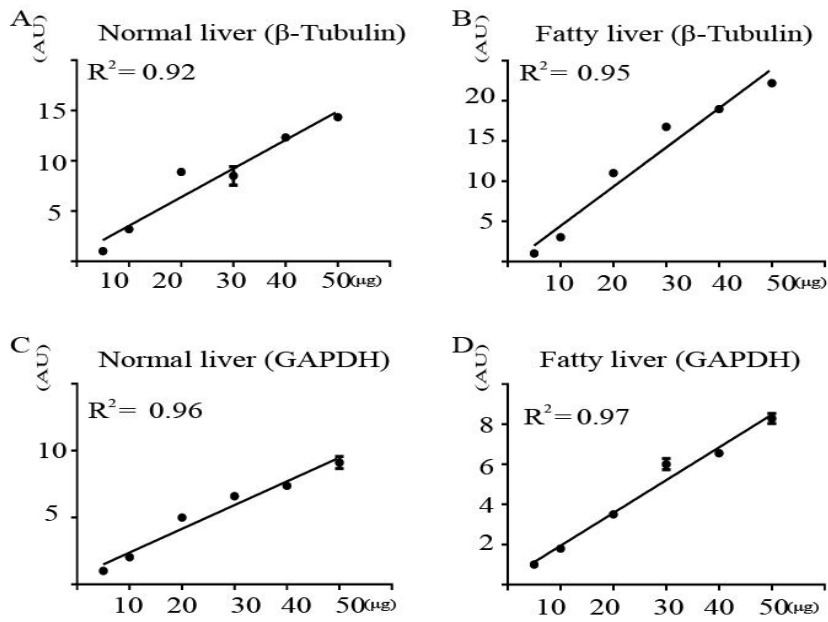


图 6.2 根据相对灰度值计算  $\beta$ -actin 和 GAPDH 的  $R^2$

Figure6.2: Signal intensities were obtained by Image Pro Plus, the graph was made by GraphPad Prism 6, AU for arbitrary units. Data were represented as densitometry signal/ $\mu\text{g}$  of proteins.

### 3. 讨论

近年来,人们常用 western blotting(WB)的方法来比较不同组织间目的蛋白的表达水平[8]。在这个实验中,保证 WB 蛋白上样的等量化才会使得组织间蛋白表达的比较有意义。目前,我们常使用管家基因蛋白, $\beta$ -tubulin、 $\beta$ -actin 和 GAPDH 作为 WB 的内参照以此验证各泳道蛋白等量上样[9]。然而,近年有文献报道,这些管家基因蛋白的表达并不总是恒定的,因此,严格地说,在 WB 实验前都应该验证这些内参蛋白的可靠性,以确保 WB 的结果有意义。

许多文献报道了管家基因蛋白在不同状态的细胞、组织中表达可能存在变化[6,9],例如, $\beta$ -actin 在脂肪组织中表达很低,故不适合在这组织 WB 里作内参照( $\beta$ -actin 一抗说明书, Biodragon, China, B1033)。在本研究中,我们发现  $\beta$ -actin 在人肝细胞性肝癌旁组织中蛋白表达低于其癌组织,在 C57 小鼠脂肪肝组织中蛋白表达低于 C57 小鼠正常肝组织。Tubulin, 包括  $\alpha/\beta$ -tubulin, 在细胞周期过程中起着重要作用[10], 有文献报道其可作为一些患者的肿瘤特异性抗原[11]。在本研究中,结果提示  $\beta$ -tubulin 在人肝细胞性肝癌组织中蛋白表达

高于其癌旁组织，在 C57 小鼠脂肪肝组织中蛋白表达高于 C57 小鼠正常肝组织。综上所述，在人肝细胞性肝癌组织和小鼠肝组织中， $\beta$ -tubulin 与  $\beta$ -actin 不适合作为 WB 的内参蛋白。

另一个常作为 WB 内参的管家基因蛋白是 GAPDH[12]。有文献报道，GAPDH 会随着细胞老化而表达降低[13]，在骨骼肌组织中，其作为内参的可靠性远低于立春红染色[14]。而今，越来越多的文献报道认为总蛋白染色如立春红染色、考马斯亮蓝染色、Epicocconone 染色[15]和 stain-free 免染技术[16]可靠性优于内参蛋白标准化。而在本研究中，我们的结果提示，在 GAPDH 在人肝细胞性肝癌组织中蛋白表达与其癌旁组织的表达无明显差异，在 C57 小鼠脂肪肝组织中蛋白表达与 C57 小鼠正常肝组织的表达无明显差异。说明在人肝细胞性肝癌组织和小鼠肝组织中，GAPDH 适合作为 WB 的内参蛋白。此外，我们设计的 qualitative optical way[7]可以间接监控内参蛋白的可靠性。

随着 western blotting 技术的不断发展，其操作时间因各种优化而缩短，实验结果可靠性也不断提升(如 stain-free 免染技术)。那么， $\beta$ -actin 与  $\beta$ -tubulin 的表达差异能否用于临床呢？我们研究结果提示  $\beta$ -actin 在人肝细胞性肝癌组织和癌旁组织中以及 C57 小鼠脂肪肝组织和正常肝组织中存在表达差异，那么其癌旁组织条带灰度值比( $\beta$ -actin/GAPDH)可能与肝脏脂肪变性程度有关，也许可以用来推测患者预后。而  $\beta$ -tubulin 在人肝细胞性肝癌组织和 C57 小鼠脂肪肝组织中高表达，那么其癌组织条带灰度值比( $\beta$ -tubulin/GAPDH)也许可以用来推算肿瘤组织的恶性程度。

此外，需要注意的是，本研究存在着两点不足。第一，本研究的样本量相对较小，扩大样本量也许会更支持本研究的结论。第二，本研究仅仅考虑了肝脏肿瘤组织和脂肪肝组织的情况，而  $\beta$ -tubulin、 $\beta$ -actin 和 GAPDH 在肝脏其他疾病状态下的表达是否变化仍不清楚，需要后续的深入研究。

#### 4. 小结

在人肝细胞性肝癌组织和 C57 小鼠肝组织中，GAPDH 作为 WB 的内参比  $\beta$ -tubulin 和  $\beta$ -actin 更可靠。

## 参考文献:

- [1] Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979, 76(9):4350-4354.
- [2] Gürtler, A., Kunz, N., Gomolka, M., Hornhardt, S., Friedl, A. A., McDonald, K., Kohn, J. E., Posch, A., Stain-Free technology as a normalization tool in Western blot analysis. *Anal. Biochem.* 2013, 433(2):105-111.
- [3] Goasdoue, K., Awabdy, D., Bjorkman, S. T., Miller, S., Standard loading controls are not reliable for Western blot quantification across brain development or in pathological conditions. *Electrophoresis* 2016, 37(4):630-634.
- [4] Colella, A. D., Chegenii, N., Tea, M. N., Gibbins, I. L., Williams, K. A., Chataway, T. K., Comparison of Stain-Free gels with traditional immunoblot loading control methodology. *Anal. Biochem.* 2012, 430(2):108-110.
- [5] Taylor, S. C., Posch, A., The design of a quantitative western blot experiment. *Biomed. Res. Int.* 2014, 2014:361590.
- [6] Ferguson, R. E., Carroll, H. P., Harris, A., Maher, E. R., Selby, P. J., Banks, R. E., Housekeeping proteins: a preliminary study illustrating some limitations as useful references in protein expression studies. *Proteomics.* 2005, 5(2):566-571.
- [7] Gong, J. H., Gong, J. P., Zheng, K. W., Checking transfer efficiency and equal loading via qualitative optical way in western blotting. *Electrophoresis* 2017, 38(21):2786-2790.
- [8] O'Sullivan, J., McMahon, H. E. M., Development of a heat-mediated protein blotting method. *Anal. Biochem.* 2016, 499:66-70.
- [9] Yu, H. R., Kuo, H. C., Huang, H. C., Huang, L. T., Tain, Y. L., Chen, C. C., Liang, C. D., Sheen, J. M., Lin, I. C., Wu, C. C., Ou, C. Y., Yang, K. D., Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a reliable internal control in Western blot analysis of leukocyte subpopulations from children. *Anal. Biochem.* 2011, 413(1):24-29.

- [10] Nogales, E., Structural insights into microtubule function. *Ann. Rev. Biochem.* 2000, 69:277-302.
- [11] Bouras, G., Nakanishi, T., Fujita, Y., Tsunemi, S., Takubo, T., Tanigawa, N., Identification of  $\beta$ -tubulin as a common immunogen in gastrointestinal malignancy by mass spectrometry of colorectal cancer proteome: implications for early disease detection. *Anal. Bioanal. Chem.* 2012, 403(7):1801-1809.
- [12] Wu, Y., Wu, M., He, G., Zhang, X., Li, W., Gao, Y., Li, Z., Wang, Z., Zhang, C., Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: a universal internal control for Western blots in prokaryotic and eukaryotic cells. *Anal. Biochem.* 2012, 423(1):15-22.
- [13] Vigelsø, A., Dybboe, R., Hansen, C. N., Dela, F., Helge, J. W., Guadalupe Grau, A., GAPDH and  $\beta$ -actin protein decreases with aging, making Stain-Free technology a superior loading control in Western blotting of human skeletal muscle. *J. Appl. Physiol. (1985).* 2015, 118(3):386-394.
- [14] Fortes, M. A., Marzuca-Nassr, G. N., Vitzel, K. F., da Justa Pinheiro, C. H., Newsholme, P., Curi, R., Housekeeping proteins: How useful are they in skeletal muscle diabetes studies and muscle hypertrophy models? *Anal. Biochem.* 2016, 504:38-40.
- [15] Moritz, C. P., Marz, S. X., Reiss, R., Schulenburg, T., Friauf, E., Epicocconone staining: a powerful loading control for Western blots. *Proteomics.* 2014, 14(2-3):162-168.
- [16] Rivero-Gutiérrez, B., Anzola, A., Martínez-Augustín, O., de Medina, F. S., Stain-free detection as loading control alternative to Ponceau and housekeeping protein immunodetection in Western blotting. *Anal. Biochem.* 2014, 467:1-3.



## 全文总结

1. 可以根据PVDF膜润湿性的变化原理设计Qualitative optical way, 该法可在孵育一抗前检测western blotting的转膜效率和蛋白上样的标准化。

2. 在人肝细胞性肝癌组织和癌旁组织以及C57小鼠肝组织与其脂肪肝组织中, GAPDH作为western blot内参比 $\beta$ -tubulin和 $\beta$ -actin更可靠。

## 文献综述:

# 组织样本 western blot 的研究进展

## 摘要

Western blotting 是一种免疫印迹, 可以半定量地分析生物样本中的蛋白表达情况。尤其是在肿瘤发生发展的研究中, 常用其来比较目的蛋白在癌旁组织和在癌组织中的蛋白表达差异, 以此来探索可能的生物标致或者药物靶点。然而, western blotting 有许多繁琐的步骤, 每一步都会产生误差。本综述通过查阅新近文献, 初步讨论组织样本 western blotting 在组织准备、内参选择方面的现状, 并初步探讨目前 western blotting 技术的新进展。

**关键词: western blot, loading control, stain-free technique**

Western blotting 是一种免疫印迹, 常用在蛋白水平的研究中, 可以半定量地分析生物样本中的蛋白表达情况。尤其是在肿瘤发生发展的研究中, 常用其来比较目的蛋白在癌旁组织和在癌组织中的蛋白表达差异, 以此来探索可能的生物标致或者药物靶点。然而, western blotting 有许多繁琐的步骤, 每一步都会产生误差, 干扰结果的可靠性。特别地, 组织样本比细胞样本的均一性差, 在样本准备过程时必须选择合理的蛋白提取方法。此外, 为了使癌旁组织和癌组织目的蛋白表达差异有意义, 还必须控制各个泳道等量上样, 因此, 每次 western blotting 都必须设置内参。目前, 常用的内参包括管家基因蛋白内参和总蛋白染色法。特别地, 癌旁组织和癌组织间有明显的结构、成分差异, 因此, 实验时应综合考虑, 选择合理的内参。本综述通过查阅新近文献, 初步讨论组织样本 western blotting 在组织准备、内参选择方面的现状, 并初步探讨目前 western blotting 技术的新进展。

## 1. 组织样本准备

总的来说,组织蛋白的提前是 western blotting 实验成功的关键。组织严谨称重,统一体积 RIPA 裂解液,仔细匀浆,每一步虽繁琐,却会使最后的 western blotting 实验进展顺利。然而,目前有许多文献表明,RIPA 裂解液虽然有很长的应用历史,但是它似乎不适合 western blotting 的下游实验,例如:RIPA 裂解液提取蛋白时会额外增加激酶活性 [1],激活 caspase-7 和 caspase-3 [2]。此外,有文献报道,尤其在组织样本中,RIPA 裂解后会有许多不溶解的物质,而这些组分里含有许多各种各样的蛋白质 [3],说明这种蛋白提取方法有明显的蛋白丢失 [4]。而另一些文献表面,虽然总蛋白提取时会因弃置不溶解物而丢失蛋白质 [5],但是若保留过多不溶物使溶液浑浊,反而会影响 western blotting 的后续实验 [6]。因此,组织样本的蛋白提取方法目前仍存在争议,需要大量实验进一步研究。

## 2. western blotting 内参

目前,常用的内参包括管家基因蛋白内参和总蛋白染色法。其中蛋白内参主要包括 GAPDH、 $\beta$ -Actin、 $\beta$ -Tubulin 等;总蛋白染色法主要包括考马斯亮蓝染色、立春红染色等。

### 2.1 总蛋白染色法

#### 2.1.1 考马斯亮蓝染色

考马斯亮蓝与蛋白质结合后变成蓝色,该蓝色的深浅程度与所结合的蛋白质浓度大小成正比。因此,可以测量 595nm 时各个蛋白质的吸光度,并可由此确定待测蛋白质的浓度。近年来,文献报道介绍了一系列各种各样的总蛋白染色方法,而考马斯亮蓝染色仍然是最常用的,主要的原因在于其出色的敏感性 [7,8]。首先,考马斯亮蓝常常用来染电泳凝胶,有两种方法,第一种就是染转膜后的凝胶,观察泳道及胶上剩余多少蛋白,从而监测上样是否一致以及转膜效率。但是,这只能说明有多少蛋白离开凝胶,不能说明蛋白等量的到了膜上。另一个方法就是重复上样,电泳重复跑两块凝胶,一块用于考马斯染色,一块用于 western blotting 的后续实验,但是,这种方式也不太合理,首先因为是重复上样,势必会有上样误差;其次,当组织蛋白样本少时,无疑造成不必要的浪费。

考马斯亮蓝还可以染膜上的蛋白质,并有文献表明其染色后总蛋白所测灰度值

与蛋白上样量有比 GAPDH 还好的线性关系，因此，这种染色法得到许多文献的认可及使用。然而，近年来也有许多文献报道了考马斯亮蓝染色的局限性，例如：繁琐，毒性，染色不可逆 [9]。

### 2.1.2 立春红染色

另一个常用的染色方法即是立春红染色，它可以与膜上的蛋白质结合，呈现红色。此法有许多优势，例如，经济，方便，快速等，与考马斯染色相比，它与蛋白结合属于可逆反应，显色后可以用双蒸水洗去，不会干扰 western blotting 的后续实验 [10, 11]。此外，有文献报道，在某些情况下，立春红总蛋白染色作为内参比管家蛋白如 GAPDH、 $\beta$ -actin、 $\beta$  tubulin 作内参更可靠 [12]，与上样量有更好的线性关系 [13]。然而，此法也有不少局限性，首先，虽然是可逆反应，但是其敏感性较低；其次，颜色反应所得红色较易褪色。

### 2.1.3 其它染色

近年来，文献还报道了许多染色方法，例如，可以染电泳凝胶的 India ink, Gold 和 SYPRO Ruby [14]，这些方法在 western blotting 实验中都有着各自的优势和缺陷。2014 年，Christian P. Moritz 等设计了 Epicocconone 总蛋白染色方法，该法染色后不影响后续 western blotting 的免疫显影，同时具备高敏感性，并且与上样量有着较好的线性关系 [15]。因此，该法可作为较理想的 western blotting 的上样内参。2013 年，谢鹏教授团队介绍了 Direct-Blue 71 染色法 [16]，该法与蛋白结合也是可逆的，能够在免疫显影前染色总蛋白。通过实验研究表明，Direct-Blue 71 有着较好的重复性和可靠性，并且也有着与上样量较好的线性关系，此外，该法也不会影响 western blotting 的后续免疫显影实验，因此，该法也是值得提倡的染色方法。

## 2.2 蛋白内参

### 2.2.1 GAPDH

甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 是细胞糖代谢酵解过程中的一个酶，其编码基因属于管家基因，由于其广泛表达于各种细胞组织中，其表达相对稳定，故常常用来作为 western blot 的上样内参。例如，Hong-Ren Yu 和他的团队研究证明 GAPDH 在儿童白细胞亚群 western blot 中作为上样内参，比  $\beta$ -actin 和  $\beta$ -tubulin 更

可靠[17]; 同时, Yonghong Wu 等人也研究证明, GAPDH 可以广泛用于真核、原核细胞中 [18]。然而, 近年来也有文献报道 GAPDH 会随着组织老化而发生表达水平的变化, 故不适合在年龄差别很大的组织样本中作上样内参 [19]。此外, GAPDH 是糖酵解过程中的一个酶, 故在研究肿瘤代谢过程时应慎用。

### 2.2.2 $\beta$ -Actin

$\beta$  肌动蛋白, 也是一类常见的管家基因编码的蛋白质, 主要功能是组成细胞的骨架。也是广泛表达各种组织当中, 其表达水平相对恒定。但是, 近年来有文献发现脂肪组织中  $\beta$ -actin 含量很少, 故不合作这类组织的 western blot 上样内参。另外 Kate Goasdouede 等人发现,  $\beta$ -actin 也不适合在猪缺血缺氧损伤脑组织中作上样内参[20]。此外, 由于组织的  $\beta$ -actin 高表达, 造成每次上样的 actin 都是超负荷上样[21], 并且 Angela Dittmer 等人发现, 不能够真实反映蛋白上样量的差异, 提示  $\beta$ -actin 不适合作为上样内参 [22]。总的来说,  $\beta$ -actin 作为上样内参的争议相对较多, 选择作为内参时应慎重考虑各个因素。

### 2.2.3 $\beta$ -Tubulin

微管蛋白, 是一类重要的管家基因编码的蛋白, 细胞周期过程中扮演重要角色。 $\beta$  微管蛋白是其中一个常见的亚型。也广泛用于作为 western blot 上样内参, 此外有文献报道, 在创伤后脊髓组织中  $\beta$ -tubulin 作为上样内参比  $\beta$ -actin 更合适 [23]。然而, 近年来有研究表明  $\beta$ -tubulin 在肿瘤发展过程中扮演着重要角色。例如,  $\beta$ -tubulin 可能是 Withaferin A 诱导乳腺癌生产停滞的一个新靶点 [24]。无独有偶, Ping Yin 等人发现 Phenethyl isothiocyanate 可通过下调  $\beta$ -tubulin 诱导人前列腺癌细胞周期停滞 [25]。还有文献表明, 可将  $\beta$ -tubulin 作为成神经细胞瘤的肿瘤抗原 [26], 或者作为胃肠肿瘤的特异抗原 [27]。因此, 在研究肿瘤增殖和肿瘤细胞周期时, 应慎用  $\beta$ -tubulin 作为 western blotting 的上样内参。

除了上述三种常见的内参蛋白外, 还有其他许多可作为上样内参的蛋白质。总的来说, 都是要具体问题具体分析, 根据组织的情况谨慎选择合理的蛋白内参, 才会使 western blot 的结果有意义。

### 3. 新技术

#### 3.1 stain-free 免染技术

Stain-free technique 即现在流行的 western blot 免染技术, 该技术电泳时用其特制的预制电泳凝胶, 含有三卤化合物。当在紫外照射的条件下, 即可催化三卤化合物和色氨酸残基的供价反应, 从而使蛋白质在紫外线下发出荧光, 该荧光可以很容易地被成像仪检测到 [28, 29]。该技术和传统的 western blot 相比具有许多优势, 例如, 电泳后无需任何染色即可成像, 并且有较高的灵敏度, 可与考马斯亮蓝染色相当, 同时比染色法定量更准确、重复率更高。此外, 该技术可以实时检测整个实验过程, 既能作为上样内参, 又可以监测转膜效率 [30]。并且可在同一块凝胶上成像、转膜和质谱分析。此外有文献报道, stain-free 免染技术比  $\beta$ -actin 作上样内参更可靠 [31]。而 B. Rivero-Gutiérrez 等人通过研究得出了相同结论, 认为 stain-free 免染技术比管家基因蛋白内参更可靠, 更有前景 [32]。

然而, stain-free 免染技术目前仍未完全普及, 需要购买商业化的预制胶和昂贵的成像系统。当然, 在课题经费充足的情况下, 还是值得一试。

#### 3.2 heat-mediated western blot

Western blotting 实验中, 大分子蛋白, 电泳慢, 转膜效率低, 故不太容易被免疫显影检测到的。因此, Jack O'Sullivan 等人设计了一个热法转膜的方法, 即用一套温控组件控制转膜时温度保持 78°C [33]。该法大大提升了大分子蛋白的检出率, 特别适合组织样本少的大分子蛋白 western blotting。

### 4. 小结与展望

随着 western blot 的不断发展, 未来充满着机遇与挑战。首先, 在组织样本的蛋白提取方面, 越来越多文献指出 RIPA 裂解法的缺陷, 故需后续研究解决此类问题或者设计出新的蛋白提取方法。其次, western blotting 内参中的总蛋白染色法和管家基因蛋白内参法各有优势也各有缺陷, 需具体问题具体分析, 谨慎选择合适的内参。最后, stain-free 技术与热法转膜不仅有利于 western blotting 实验的更好进行, 同时也提示我们目前的实验方法并不是完美的, 我们应该时刻关注实验的细节, 思考并尝试设计各种步骤优化的方法, 最后用严谨的实验去验证它是否可靠。

## 参考文献

- [1] DeSeau V, Rosen N, Bolen JB. Analysis of pp60c-src tyrosine kinase activity and phosphotyrosyl phosphatase activity in human colon carcinoma and normal human colon mucosal cells. *J Cell Biochem.* 1987, 35(2):113-128.
- [2] Zapata JM, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. Granzyme release and caspase activation in activated human T-lymphocytes. *J Biol Chem.* 1998, 273(12):6916-6920.
- [3] Ngoka LC. Sample prep for proteomics of breast cancer: proteomics and gene ontology reveal dramatic differences in protein solubilization preferences of radioimmunoprecipitation assay and urea lysis buffers. *Proteome Science* 2008, 6:30.
- [4] Mukhopadhyay C, Triplett A, Bargar T, Heckman C, Wagner KU, Naramura M. Casitas B-cell lymphoma (Cbl) proteins protect mammary epithelial cells from proteotoxicity of active c-Src accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016, 113(51):E8228-E8237.
- [5] Murphy RM, Mollica JP, Lamb GD. Plasma membrane removal in rat skeletal muscle fibers reveals caveolin-3 hot-spots at the necks of transverse tubules. *Exp. Cell. Res.* 2009, 315(6):1015-1028.
- [6] Ghosh R, Gilda JE, Gomes, AV. The necessity of and strategies for improving confidence in the accuracy of western blots. *Expert. Rev. Proteomics.* 2014, 11(5): 549-560.
- [7] Arndt C, Koristka S, Feldmann A, Bartsch H, Bachmann M. Coomassie-Brilliant Blue staining of polyacrylamide gels. *Methods Mol Biol.* 2012, 869:465-469.
- [8] Welinder C, Ekblad L. Coomassie staining as loading control in Western blot analysis. *J Proteome Res.* 2011, 10(3):1416-1419.
- [9] Colella, A. D., Chegenii, N., Tea, M. N., Gibbins, I. L., Williams, K. A., Chataway, T. K., *Anal. Biochem.* 2012, 430:108-110.
- [10] Stochaj WR, Berkelman T, Laird N. Staining membrane-bound proteins with ponceau s. *CSH Protoc.* 2006, 2006(5).

- [11] Harlow E, Lane D. Staining immunoblots for total protein using ponceau s. CSH Protoc. 2006, 2006(1).
- [12] Fortes, M. A., Marzuca-Nassr, G. N., Vitzel, K. F., da Justa Pinheiro, C. H., Newsholme, P., Curi, R., Anal. Biochem. 2016, 504:38-40.
- [13] Thacker JS, Yeung DH, Staines WR, Mielke JG. Total protein, or high abundance protein: which offers the best loading control for Western blotting? Anal Biochem. 2016, 496:76-78.
- [14] Sasse, J., Gallagher, S. R., Curr. Protoc. Mol. Biol. 2003, Chapter 10, Unit10.7.
- [15] Moritz CP, Marz SX, Reiss R, Schulenburg T, Friauf E. Epicocconone staining: a powerful loading control for Western blots. Proteomics. 2014, 14(2-3):162-168.
- [16] Zeng L, Guo J, Xu HB, Huang R, Shao W, Yang L, Wang M, Chen J, Xie P. Direct Blue 71 staining as a destaining-free alternative loading control method for Western blotting. Electrophoresis. 2013, 34(15):2234-2239.
- [17] Yu HR, Kuo HC, Huang HC, Huang LT, Tain YL, Chen CC, Liang CD, Sheen JM, Lin IC, Wu CC, Ou CY, Yang KD. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a reliable internal control in Western blot analysis of leukocyte subpopulations from children. Anal Biochem. 2011, 413(1):24-29.
- [18] Wu Y, Wu M, He G, Zhang X, Li W, Gao Y, Li Z, Wang Z, Zhang C. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: a universal internal control for Western blots in prokaryotic and eukaryotic cells. Anal Biochem. 2012, 423(1):15-22.
- [19] Vigelsø A, Dybboe R, Hansen CN, Dela F, Helge JW, Guadalupe Grau A. GAPDH and  $\beta$ -actin protein decreases with aging, making Stain-Free technology a superior loading control in Western blotting of human skeletal muscle. J Appl Physiol (1985). 2015, 118(3):386-394.
- [20] Goasdoue K, Awabdy D, Bjorkman ST, Miller S. Standard loading controls are not reliable for Western blot quantification across brain development or in pathological conditions. Electrophoresis. 2016, 37(4):630-634.



- [21] Chen W, Xu WH.  $\beta$ -Actin as a loading control: Less than 2  $\mu$ g of total protein should be loaded. *Electrophoresis*. 2015, 36(17):2046-2049.
- [22] Dittmer A, Dittmer J. Beta-actin is not a reliable loading control in Western blot analysis. *Electrophoresis*. 2006, 27(14):2844-2845.
- [23] Liu NK, Xu XM. beta-tubulin is a more suitable internal control than beta-actin in western blot analysis of spinal cord tissues after traumatic injury. *J Neurotrauma*. 2006, 23(12):1794-1801.
- [24] Antony ML, Lee J, Hahm ER, Kim SH, Marcus AI, Kumari V, Ji X, Yang Z, Vowell CL, Wipf P, Uechi GT, Yates NA, Romero G, Sarkar SN, Singh SV. Growth arrest by the antitumor steroidal lactone withaferin A in human breastcancer cells is associated with down-regulation and covalent binding at cysteine303 of  $\beta$ -tubulin. *J Biol Chem*. 2014, 289(3):1852-1865.
- [25] Yin P, Kawamura T, He M, Vanaja DK, Young CY. Phenethyl isothiocyanate induces cell cycle arrest and reduction of alpha- and beta-tubulin isotypes in human prostate cancer cells. *Cell Biol Int*. 2009, 33(1):57-64.
- [26] Prasannan L, Misek DE, Hinderer R, Michon J, Geiger JD, Hanash SM. Identification of beta-tubulin isoforms as tumor antigens in neuroblastoma. *Clin Cancer Res*. 2000, 6(10):3949-3956.
- [27] Bouras G, Nakanishi T, Fujita Y, Tsunemi S, Takubo T, Tanigawa N. Identification of  $\beta$ -tubulin as a common immunogen in gastrointestinal malignancy by mass spectrometry of colorectal cancer proteome: implications for early disease detection. *Anal Bioanal Chem*. 2012, 403(7):1801-1809.
- [28] C.L. Ladner, J. Yang, R.J. Turner, R.A. Edwards, Visible fluorescent detection of proteins in polyacrylamide gels without staining, *Anal. Biochem*. 2004, 326:13–20.
- [29] A. Posch, J. Kohn, K. Oh, M. Hammond, N. Liu, V3 stain-free workflow for a practical, convenient, and reliable total protein loading control in Western Blotting, *J. Vis. Exp*. 2013, 30.
- [30] Gürtler A, Kunz N, Gomolka M, Hornhardt S, Friedl AA, McDonald K, Kohn JE, Posch A. Stain-Free technology as a normalization tool in Western blot analysis. *Anal Biochem*. 2013, 433(2):105-111.

- [31]Gilda JE, Gomes AV. Stain-Free total protein staining is a superior loading control to  $\beta$ -actin for Western blots. *Anal Biochem.* 2013, 440(2):186-188.
- [32] Rivero-Gutiérrez B, Anzola A, Martínez-Augustin O, de Medina FS. Stain-free detection as loading control alternative to Ponceau and housekeeping protein immunodetection in Western blotting. *Anal Biochem.* 2014, 467:1-3.
- [33] O'Sullivan J, McMahon HEM. Development of a heat-mediated protein blotting method. *Anal Biochem.* 2016, 499:66-70.

## 致谢

三年的硕士生活即将结束，首先要感谢我的导师刘长安教授，感谢您耐心教导与关心。此外还要特别感谢对我实验工作帮助很大的龚建平教授，感谢您的帮助与鼓励。在以后的生活与学习中，我会时刻铭记“严谨、求实、勤奋、进取”，为实行革命的人道主义而奋斗终身。

感谢重庆医科大学附属第二医院病毒性肝炎研究所的廖勇教授、彭明利老师、汤慧老师、颜亮老师以及实验室的刘扬师兄、湛莎莎师姐、陈瑜师姐、李鸣鸿硕士、张振芳硕士等在课题研究中给予的支持与帮助。

感谢我的师兄苗春木博士、刘一鸣博士、张俊勇博士、王梦皓博士、张文峰博士、袁方超博士、龚俊华硕士、赵稚博硕士、朱韦硕士等在我硕士研究生学习和生活上给予的帮助。

感谢我的家人，谢谢你们对我的支持与肯定。

谢谢你们！

## 攻读硕士期间发表的论文:

1. Gong Jun-Hua, Gong Jian-Ping, **Zheng Kai-Wen\***. Checking transfer efficiency and equal loading via qualitative optical way in western blotting. Electrophoresis 2017, 38(21):2786-2790.
2. Mei Ying, **Zheng Kai-Wen(co-author)**, Liu Chang-an, Ding Xiong\*, Gong Jian-Ping\*. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: A reliable loading control in western blotting of liver tissues. (Under review)
3. Mei Ying, **Zheng Kai-Wen(co-author)**, Liu Chang-an, Ding Xiong\*, Gong Jian-Ping\*. VEGF-Nrp1 promotes Glycolysis in Hepatocellular carcinoma via HIF-1 $\alpha$ . (In preparation)
4. Wang Meng-Hao, Yuan Fang-chao(co-author), **Zheng Kai-Wen**, Zhang Jie, Li Jin-Zheng, Wu Hao, Zhang Wen-Feng, Miao Ming-Yong\* and Gong Jian-Ping\*. Downregulating SHMT2 Suppresses Liver Regeneration and Deteriorates Hepatic Ischemia Reperfusion Injury.(In preparation)