

如何对化学发光 Western Blot (1D 和 2D) 进行高质量的成像及定量分析

概述：

SDS PAGE 分离蛋白质，再电泳转运到化学发光 Blot 膜上进行检测，是一种用于鉴别复杂混合物中特定蛋白质是否存在及含量的理想方法，被称为 Western Blot。基本过程是：混合蛋白质先溶于 SDS 缓冲液中，随后通过电泳进行分离。一次电泳结束后，通过二次电泳，将胶上的蛋白质转运到膜上，以便蛋白质与免疫试剂进行反应。该 Blot 膜通常使用醋酸纤维膜或 PVDF 膜，是原始蛋白质胶的完全复制，并便于膜上的蛋白质与试剂进行反应。预先显色的分子量 marker，使待测蛋白质的识别，定量，及其大小的分析变的简单（请见图 1，2）。

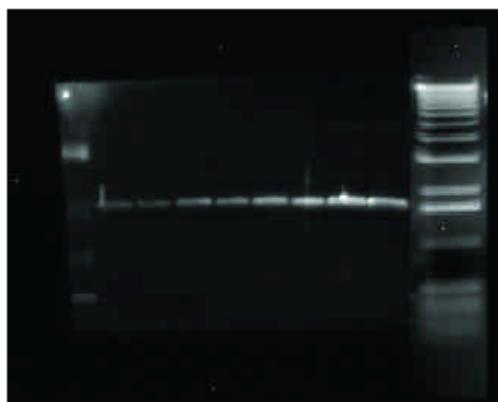


图 1. 通过 VisionWorks 软件将 Western Blot

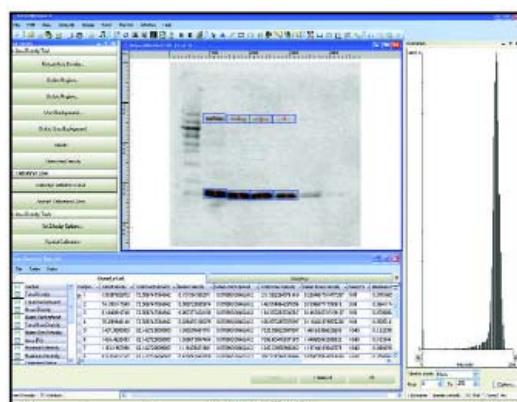


图 2.. 使用 VisionWorks 软件对成像后的条

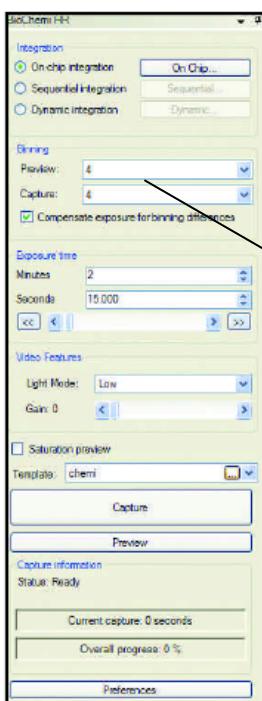
成像图与标准 marker 重叠在一张图上带进行定量分析

方法简介：

1. 按照常规要求对蛋白质 Blot 膜进行一抗、二抗处理。通常使用发光物质 (如 , HRP)或碱性磷酸酶 (Alkphos) 标记的试剂。
2. 将处理好的 Blot 膜放在一层薄的塑料上 , 加入 1-2ml 反应试剂。
3. 由于化学发光反应和发色反应都具有对温度敏感的特性 , 如果可能 , 最好将 Blot 膜放在温度可控的表面上 (如 , 30°C)。可选择使用美国 UVP 公司的加热盘 (请见图 3) , 用于免疫 Blot 膜的保温成像 , 以便获得重复一致的实验结果。



图 3. UVP 加热盘 , 使温度保持稳定



4. 封好 Blot 膜 , 并快速的将其放入 Biospectrum 成像系统暗箱内 (请见图 4) , 光圈调至 1.2 , 参数按照图 5 进行参考设置。通常的成像结果如图 6 或图 1 。



图 4. UVP Biospectrum 成像系统

- 图 5. 使用 VisionWorks 软件进行化学发光成像时的常规参数设定

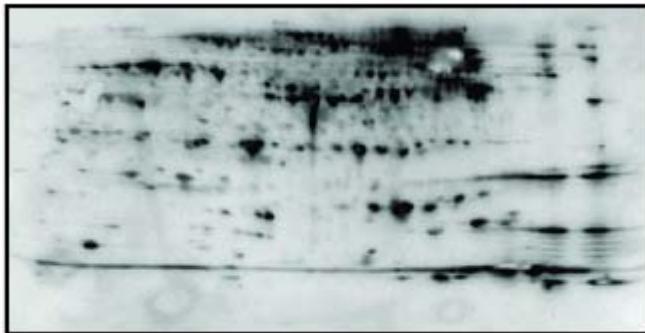


图 6. 细菌蛋白质 2D 胶。1stAb 是兔抗大肠杆菌抗体，2ndAb 是 HRP-标记的羊抗兔抗体

结论：

使用 UVP 公司的 Biospectrum 成像系统，配以 VisionWorks 成像分析软件，可以对 1D 或 2D Western Blot 进行高灵敏性的成像，并进行定量和定性分析。

有关 Biospectrum 成像系统的详细资料请见以下介绍：

型号：BioSpectrum 510 或 BioSpectrum 610 或 BioSpectrum 810

品牌：UVP

产地：美国

主要应用范围：

BioSpectrum 系列为全自动、计算机控制的高级凝胶成像系统。

适用于化学发光(Western Blot , Northern , Southern 等)，荧光成像(单色或多色荧光，如 EB, SYBR Green , SYBR Red, Alexa Fluo, Cy2, Cy3, Cy5, Cy7, GFP, RFP, Qdot 525, Qdot 655, SYPRO 等染料)，以满足不同

荧光染色的核酸胶和蛋白胶成像。也可对考马斯蓝、铜离子、银离子等染色的蛋白胶成像，也应用于色度分析，克隆/斑点计数，微孔板定量，放射自显影等，是一款具有高灵敏度，低检出限的凝胶成像系统。Biospectrum 系统采用 Peltier 制冷的高分辨率 CCD 技术（610 相机可达-50°C），可获得极高的灵敏度。系统配有功能强大的 VisionWorks 专业分析软件，用于图像采集和数据分析。

主要相机参数请见下表：

相机参数			
特性	MegaCam 810	OptiCam 610	BioChemi 510
CCD 位数	14 bit	16 bit	16 bit
A/D 转换位数	16 bit	16 bit	16 bit
灰度范围	65,536	65,536	65,536
分辨率	3296x2472	2184 x 1472	2048 x 2048
像素（百万）	8.1	3.2, 且可扩大到9.6	2.1, 且可扩大到5.4 和7.4
制冷类型	-35°C 相对温度 Peltier制冷	-50°C 相对温度 Peltier制冷	-35°C 相对温度 Peltier制冷
芯片	Kodak 4/3" KAF-8300	Kodak 3/4" KAF-3200ME	
像素单元组合	1x1 thru 8x8	1x1 thru 10x10	1x1 thru 8x8
图像大小	16.3mb	6.3mb @ 16-bit	3.7mb @ 16-bit
PC 连接方式	USB 2.0	Ethernet	USB 2.0
量子效率(峰值及425nm处)	50% & 44%	86% & 53%	55% & 45%
镜头选择	F/1.2 50mm Large Format (LF) Motorized Lens F/1.4 30mm LF Motorized Zoom Lens F/1.8 28mm LF Motorized Zoom Lens F/2.8 24-70mm LF Motorized Zoom Lens		12.5-75mm Zoom lens (Motorized or Manual)

如欲了解更多相关信息，请随时联系天美（中国）科学仪器有限公司市场部。