

UVP BioSpectrum 成像系统和 BioLite 多谱光源 在蛋白印迹多重近红外成像上的应用

使用 BioSpectrum 系统和 BioLite 多谱光源进行近红外（NIR）成像具有快速、高效和简单的特点。

可选择多种激发和发射滤光片，使研究者可以检测和定量几乎任何的荧光染料（从可见光到近红外）。蛋白印迹是一种为了确定是否存在一种或多种蛋白的常规技术，并提供蛋白数量额外的信息。

整个制备、成像过程是简单的，使用 SDS-PAGE 胶首先通过大小来分离蛋白，接着通过电转移将蛋白转移至醋酸纤维素膜或 PVDF 膜上。

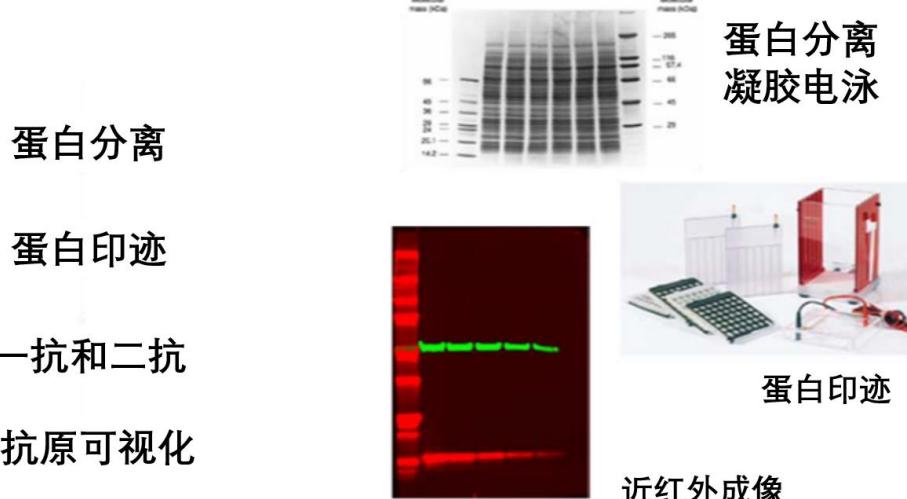


图 1 免疫印迹过程

注：蛋白印迹是生命科学研究实验室中的基础，通过 SDS-PAGE 分离、印迹、抗体探查和分析完成

膜表面吸收蛋白，研究者使用一抗来探查膜上特定的蛋白。酶或荧光染料标记的二抗用于识别一抗的结合位点。若单一特定蛋白被识别，则使用一种单抗和标记物。若在同一个印迹中识别到多个蛋白，则分析依赖于不同的一抗探查每个蛋白及携带不同荧光标记的二抗，产生多重结果。

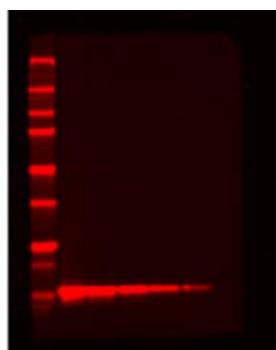
对于近红外印迹应用，通常使用两种荧光染料，或独立使用，或联合使用（表 1）。

表 1 用于近红外成像的滤光片 (680nm 和 770-800nm 荧光标记)

滤光片		蛋白标签-发射光		备注
激发光 (nm) (BioLite)	发射光 (nm) (BioSpectrum)	680 nm	770-800 nm	
700-740	800	√	√	双条带可见
600-645	700-740	√		只有 680 nm 条带可见
750-780	800		√	只有 800 nm 条带可见

通过直接连接到二抗上的荧光标签容易实现对结合到蛋白的一抗的检测。

对于荧光成像，通过顶置单色激发光 (BioLite) 照射印迹膜。每个标记点上诱导的荧光通过制冷 CCD 记录 (用于荧光的散射光滤光片并阻隔激发光)。图 2 显示处理的 NIR 印迹来识别样品中的两种蛋白。



羊 anti-兔IRDye680
Ex: 630 nm, Em: 720 nm



羊 anti-鼠IRDye800
Ex: 765 nm, Em: 800 nm 长波

图 2 同一个免疫印迹上的多重近红外印迹 (红 : COX IV 抑制剂 ; 绿 : 微管蛋白稀释液)

注：该近红外成像时的发射波长分别为 680 nm 和 800 nm

【材料与方法】

BioSpectrum 615 系统，320 万物理像素相机（-60°C 相对温度）和 5 个散射光滤光片。

BioLite 多谱光源，带 8 个激发光滤光片。

近红外专一性激发光和散射光滤光片（表 1）。

用于近红外蛋白印迹操作的试剂。

【样品制备】

HeLa 细胞稀释液（两倍）通过 SDS-PAGE（12%丙烯酰胺凝胶）分离。分离的蛋白转移至硝酸纤维素膜上。使用小鼠 anti- α 微管蛋白和兔 anti-COX IV 一抗（缓冲液带 0.1%Tween-20）来探查印迹，4°C 过夜；接下来在室温培育一小时（二抗：羊 anti-小鼠 IRDye800 和羊 anti-兔 IRDye680，溶剂为 0.1%Tween-20 的缓冲液，终浓度为 0.2 μ g/ml 或 0.04 μ g/ml）。

在一抗和二抗用 PBS 缓冲液（0.1%Tween-20）培育 4×5 分钟后，清洗印迹。

【成像】

使用 BioSpectrum 系统和 BioLite 多谱光源进行近红外成像（图 3）。使用 VisionWorks LS 图像获取分析软件（UVP）对图像进行操作，移除背景强度并合成图像。激发光和发射光的滤光片选择见表 1。

简单来说，在门开启的状态下定位印迹（样品盘上），相机进行预览，提供光源用于定位和聚焦。通过软件预设，选择激发光和发射光波长，镜头设置为 f/1.2。曝光，无饱和下调节最大信号，时间范围调整为 30 秒-2 分钟（参数设定取决于样品和设置的滤光片）。

图像拍摄后，原始图像自动存档，副本用于图像分析。通过 VisionWorks 软件移除图像的背景强度，调节对比度、红色（表征 IR680）和绿色（表征 IR800）（图 2）。



图 3 连接有 BioLite 的 BioSpectrum 系统

注：BioSpectrum 和 BioLite 组成一个强大的组合，取决于使用的滤光片，能专一地获得激发光（365-765 nm）和 400-850 nm 的发射光。在同一个试验中，可以最多获得 8 个激发波长和 5 个发射波长

【结果与讨论】

图 3 揭示了 UVP BioSpectrum 615 系统对于近红外多重成像的性能，能清晰并专一地分离出 IRDye680 和 800 发射光标签的信号。应用近红外蛋白印迹标签提供相较于化学发光或显色可视化成像的多个优点。

最重要的是，近红外和可视荧光标签允许多重成像，以至样品中的若干蛋白能在同一时间、单一蛋白印迹上被检测及分析。尤其是近红外标签提供用于极低的背景和高信噪比的定量级成像性能。额外的优势包括标签（操作过程和干印迹）上的高稳定性。多个月后，干印迹还可重复成像。

BioSpectrum 系统和 BioLite 多谱光源的组合使用不仅提供激发光的全范围波长，而且通过制冷 CCD 615（或 CCD 515/815）在低光镜头下捕获高分辨率图像。通常情况下，曝光在 30 秒至 2 分钟内完成，比激光扫描快。

【结论】

使用 BioSpectrum 和 BioLite 光源进行常规近红外成像具有快速、高效和简单的特点，获得用于量化和发表级别的全 16 位图像。