

不同参数对蛋白免疫印迹法结果的影响

卢进¹, 周东东¹, 杨永清¹, 尹磊淼^{2,3*}

(1. 上海中医药大学, 上海 201203; 2. 上海市针灸经络研究所, 上海 200030; 3. 上海中医健康服务协同创新中心, 上海 201203)

摘要: [目的] 探讨曝光时间、洗脱时间等参数对蛋白免疫印迹法结果的影响。[方法] 通过测量灰度值, 比较不同曝光时间(6 s 和 21 s)、洗脱时间(30 min 和 8 h) 以及图像处理软件(Image J 和 Imagequant TL) 对蛋白免疫印迹法结果的影响。[结果] 上样量比值为 2:1 的蛋白曝光 6 s 的灰度值读数分别为 14766 ± 724 和 7171 ± 577 ($n=3$), 均数比值为 2.1:1。延长曝光至 21 s 后相同样品灰度值分别为 14932 ± 1198 和 11994 ± 616 ($n=3$), 均数比值减小为 1.2:1; 洗脱 30 min 和 8 h 后的曝光结果相比, 上样量为 1.64 μg 蛋白灰度值分别为 23713 ± 1895 和 22892 ± 571 ($n=3$), 差异无统计学意义; Image J 和 Imagequant TL 两种软件对倍比梯度上样的蛋白样品读值, 比值分别为 1:0.56:0.41:0.22 和 1:0.59:0.40:0.15; 对两组读值进行直线回归分析, 可得斜率分别为 0.13 和 0.14, 提示两组读值趋势一致。[结论] 曝光时间对蛋白免疫印迹法结果有明显影响, 高丰度蛋白需要低曝光时间, 才能保持确切的倍比关系; 洗脱时间超过 30 min 对蛋白免疫印迹法灰度值结果没有直接影响; 不同图像处理软件对灰度值结果分析趋势一致。

关键词: 蛋白免疫印迹法; Western Blot; 灰度值; 曝光时间; 洗脱时间

中图分类号: R446.61 文献标识码: A DOI: 10.16519/j.cnki.1004-311x.2019.04.0063

Effects of different parameters on the results of immunoblotting

LU Jin¹, ZHOU Dong-dong¹, YANG Yong-qing¹, YIN Lei-miao^{2*}

(1. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;

2. Shanghai Research Institute of Acupuncture and Meridian, Shanghai 200030, China;

3. Shanghai Innovation Center of TCM Health Service, Shanghai 201203, China)

Abstract [Objective] To investigate the effects of parameters such as exposure time and elution time on the results of immunoblotting experiments. [Method] Comparing the effects of different exposure time (6 s and 21 s), elution time (30 min and 8 h) and image processing softwares (Image J and Imagequant TL) on immunoblotting results by measuring the gray density values. [Result] The grayscale values of protein exposed 6s with a 2:1 ratio were 14766 ± 724 and 7171 ± 577 ($n=3$), respectively, and the mean ratio was 2.1:1. However, after extended exposure time to 21 s, the gray value of the same sample was 14932 ± 1198 and 11994 ± 616 ($n=3$), respectively, and the mean ratio decreased to 1.2:1. Compared with the exposure results after elution for 30 min and 8 h, the grayscale values of protein loading were 23713 ± 1895 and 22892 ± 571 ($n=3$) after elution. The differences were not statistically significant. The Image J and Imagequant TL softwares compared the reading values of the protein samples on the multiple ratio gradient with the ratios of 1:0.56:0.41:0.22 and 1:0.59:0.40:0.15. Through linear regression analysis, it can be concluded that the slope of the equation is similar, 0.13 and 0.14 respectively, and the two lines almost coincide. [Conclusion] The exposure time significantly changed the results, and high protein density required low exposure time to maintain the best multiple ratio relationship. The elution time more than 30 min had no direct effect on the results of immunoblotting grayscale. The different kinds of processing software have no obvious influence on the gray value result.

Keywords: immunoblotting; Western Blot; Grey value; exposure time; elution time

收稿日期: 2019-05-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(81873373; 81574058); 上海市青年拔尖人才开发计划; 上海市人才发展基金项目(201610); 上海市协同创新建设项目(ZYJKFW201701005; ZYJKFW201811010)

作者简介: 卢进(1995-), 女, 江苏省大丰区人, 硕士生, 研究方向: 针刺抗哮喘机制研究, Tel: +86-021-54592134, E-mail: lujin0620@163.com。

* 通讯作者: 尹磊淼(1983-), 男, 浙江省青田县人, 博士, 研究员, 硕导, 研究方向: 针刺抗哮喘生物学机制, 在 Science Translational Medicine 等期刊发表论文 51 篇, 参与编写专著 5 部, 获/申请发明专利 6 项, 实用新型专利 4 项, 承担各类项目 15 项, 被评为上海中医药大学“十大杰出青年”, E-mail: collegetlm@shutcm.edu.cn。

杨永清(1964-), 男, 河南省淇县人, 博士, 研究员, 博导, 副校长, 研究方向: 针刺抗哮喘临床和基础研究, 发表论文 100 余篇, 主编/副主编专著 6 部, 获国家自然科学基金项目等 10 余项, 获科技进步奖 3 项, 获发明专利 5 项, 实用新型专利 4 项。

蛋白免疫印迹法(又称 Western Blot)是每个蛋白质分析实验室的标准工具^[1],它是指把聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳中分离的蛋白转移到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,然后用抗体等对其进行检测,以识别特定的多肽^[2-3]。这种技术对蛋白质混合物中特定蛋白的鉴别和鉴定具有高敏感度和准确性^[4],对于研究特定蛋白相对丰度、相对分子量等也具有重要的作用^[5-6]。因此,其在许多科学研究领域如分子生物学等学科中得到广泛应用^[7]。

Western Blot 实验步骤总体分为蛋白制备、电泳、转膜、一抗二抗孵育等五大步骤^[8],正是由于步骤繁多,每一步都可能影响结果可靠性和重现性^[8]。有研究分析 Western Blot 半定量检测对促红细胞生成素纯度的误差,发现总体误差大于 35%^[9]。另一以丙型肝炎病毒编码的核心蛋白为目的蛋白的研究检测其分析误差为 15% 左右,其中蛋白上样量、抗体浓度等可变因素均可成为其误差源^[10]。因此,严格控制参数变化是做好 Western Blot 的关键。

目前已有研究表明在实验过程中对于磷酸化蛋白湿转比半干转效果更佳,蛋白稀释比为 1:5 000 时蛋白信号较好^[11];对于 P-糖蛋白同样湿转且条件为 120 V 2 h 更好^[12];而 3 种常用细胞裂解液适用于不同分子量蛋白并影响其光密度值^[13]。综上所述可知,不同实验条件对结果确实有一定影响,但以上极少有涉及到抗体孵育以后实验参数的作用。特别是实验后期曝光时间、洗脱时间等参数对结果分析也具有重要影响。洗脱可以消除背景并除去未结合的抗体,而洗脱时间过长,则会减少蛋白表达信号^[14];成像分析则是膜上的蛋白与一抗结合后再与酶标的二抗结合起反应,加入化学发光底物后,通过化学发光法将化学发光信号转化为图片形式,进行成像灰度分析以确定蛋白表达^[15]。故本文拟比较曝光时间、洗脱时间以及不同图像处理软件等对蛋白灰度值检测稳定性的差异,以期在蛋白质检测层面为进一步深入研究蛋白提供技术参数支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料

1 只 6 w 的 SPF 级雄性小鼠(C57BL/6)购自上海斯莱克公司。

1.1.2 试剂

十二烷基硫酸钠(SDS)、三羟甲基氨基甲烷

(Tris)、甘氨酸(Glycine)、甘油、甲醇(Methanol)、氯化钠(NaCl)、氯化钾(KCl)、磷酸二氢钾(KH₂PO₄)、十二水合磷酸氢二钠(Na₂HPO₄·12H₂O)购自国药集团化学试剂有限公司;RIPA(Radio Immunoprecipitation Assay)裂解液、溴酚蓝、BSA 牛血清蛋白、吐温-20、通用型 ECL 化学发光试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;预染蛋白 Marker 购自美国 Thermo Fisher 公司;5×上样缓冲液、12%电泳预制胶 15 孔、HRP(辣根过氧化物酶)标记的山羊抗兔 IgG 购自上海生工生物有限公司;β-actin 抗体(β-actin (13E5) Rabbit mAb)购自美国 CST 公司。

1.1.3 仪器

MU-C04-0120 干式恒温器、GS-10 轨道式摇床购自杭州米欧仪器有限公司;Microfuge 22R 台式高速离心机购自美国贝克曼库尔特公司;Five Easy Plus 台式 pH 计购自美国梅特勒托利多有限公司;MP3 多功能微型垂直板电泳系统、PVDF 膜(0.2 μm)、小型湿式转印电泳槽购自美国伯乐公司;Amersham Imager 600 化学发生物分子成像仪购自美国 GE 公司,图像处理软件 Image J(版本号为 1.8.0),图像处理软件 Imagequant TL(版本号为 8.1)。

1.1.4 培养基

分别按照表 1 配制所需溶液,均混匀后常温保存备用。1×磷酸盐吐温缓冲液(PBST):10×PBS 稀释成 1×PBS,取 100 mL 10×PBS 于量筒内,再加 900 mL 超纯水定容至 1 000 mL,加 1 mL 吐温-20 搅拌均匀(pH=7.2)。

表 1 5×SDS-PAGE 电泳缓冲液的配制

Tab. 1 Preparation of 5×Electrophoretic buffer

Composition	Content
Tris	15.1 g
Glycine	94.0 g
SDS	5.0 g
ddH ₂ O	Add to total volume 1 000 mL

表 2 1×转移缓冲液的配制

Tab. 2 Preparation of 1×Tris-Glycine transfer buffer

Composition	Content
Glycine	14.4 g
Tris	3.0 g
Methanol	200 mL
ddH ₂ O	Add to total volume 1 000 mL

表3 10 × PBS 溶液的配制
Tab. 3 Preparation of 10 × PBS

Compositions	Content
NaCl	80.0 g
KCl	2.0 g
KH ₂ PO ₄	2.4 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	36.0 g
ddH ₂ O	Add total volume 1 000 mL

1.2 方法

1.2.1 蛋白制备

小鼠(C57BL/6)脱颈处死后肺组织取材,液氮下研磨后称重,按每20 mg组织加入150~200 μL RIPA裂解液,冰浴静置1 h充分裂解蛋白;在12 000 r/min 4 °C、20 min条件下离心后备用。

1.2.2 BCA法测定蛋白质浓度

测得肺组织蛋白原液浓度为6.55 mg/mL。

1.2.3 样品准备

先将5 × 上样缓冲液与裂解液按照1:4的比例混匀,与样品、裂解液以2:2:1的体积比混合形成母液,再对倍稀释。加样前先100 °C加热5 min,然后以10 000 r/min、4 °C离心10 min,使蛋白样品充分变性。

1.2.4 SDS-PAGE电泳

将凝胶玻璃板固定于电泳装置并放入电泳槽内,在槽内外加入1 × SDS电泳缓冲液。对照孔加入蛋白Marker,其他孔加入等体积梯度浓度样品。加样完成后,接通电源,由于使用的是连续不分层的预制胶,故将电压调至110 V,约90 min电泳至溴酚蓝到达分离胶的底部时停止。

1.2.5 湿转移

电泳结束后,取干净的电转槽,倒入转移缓冲液。将转印夹置于平面,依次平铺放上海绵、薄滤纸、胶(切除多余部分)、PVDF膜(甲醇溶液中浸泡活化1 min)、薄滤纸、海绵合成三明治结构放入装有冰盒的转移槽内,并将整个转移槽放入冰水混合物中,保持转膜过程中的低温,120 V转膜1 h。

1.2.6 封闭、抗体孵育及检测

将转膜后的PVDF膜放入抗体孵育盒中,加入适量的封闭液,在室温下孵育1 h左右以封闭膜上剩余疏水结合位点。按照比例为1:1 000将1 μL的抗体加到1 mL封闭液中,4 °C摇床过夜孵育。用PBST洗膜3次,每次10 min以洗去未结合的抗体;

根据抗体说明书按照比例为1:10 000将1 μL的抗体加入到10 mL的封闭液中,室温下孵育1 h。用PBST洗膜3次,每次10 min,另外一组则洗膜总时间为8 h。将膜取出用显色液中A液与B液等比例混匀后浸润进行显影,分别曝光6 s和21 s及利用Image J和Imagequant TL两种图像处理软件读取灰度值检测蛋白表达量变化。

1.2.7 统计学处理

实验数据用均数 ± 标准误差(means ± SEM)表示,实验独立重复3次,采用SPSS 24.0软件进行t检验、直线回归分析, $P < 0.05$ 表示具有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 不同曝光时间对蛋白免疫印迹法检测蛋白结果的影响

实验分析比较了不同曝光时间对实验结果的影响。用Image J对4条蛋白条带进行多次灰度值读数分析,上样量为6.55 μg和3.28 μg(比值为2:1)的蛋白曝光6 s后的灰度值读数分别为14766 ± 724和7171 ± 577(n=3),均数比值为2.1:1,倍比关系接近于其上样量;但曝光21 s后两上样量的灰度值均变大,分别为14932 ± 1198和11994 ± 616(n=3),均数比值为1.2:1,与上样量相比已不成倍比关系(图1)。结果提示:如β-actin这样的高丰度蛋白需要相对较低的曝光时间,才能保持确切的倍比关系,或者建议可采用连续曝光,找到最符合的曝光时间。

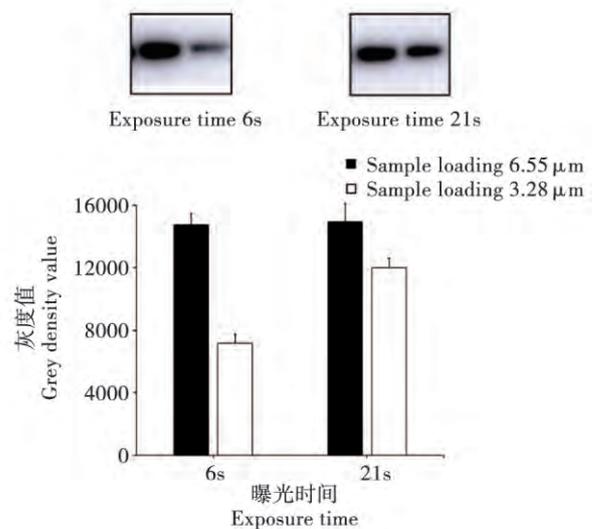


图1 不同曝光时间对蛋白免疫印迹结果的影响

Fig. 1 Effects of different exposure times on Western Blot results

2.2 不同洗脱时间对蛋白免疫印迹法检测蛋白结果的影响

实验分别比较了蛋白上样量为 1.64 μg 和 0.82 μg 在 30 min 和 8 h 洗脱时间对于蛋白免疫印迹法转印蛋白结果的影响,发现两次洗脱都很干净, β -actin 都出现聚集无弥散、背景清晰的条带(图 2),蛋白上样量为 1.64 μg 在洗脱 30 min、8 h 后的灰度值分别为 23713 ± 1895 和 22892 ± 571 ($n=3$),无统计学差异($P>0.05$);蛋白上样量为 0.82 μg 在洗脱 30 min、8 h 的灰度值分别为 13514 ± 3354 和 11117 ± 4175 ($n=3$),无统计学差异($P>0.05$)。提示:洗脱时间超过 30min 并不会改变蛋白结果图像灰度值之间的差异。

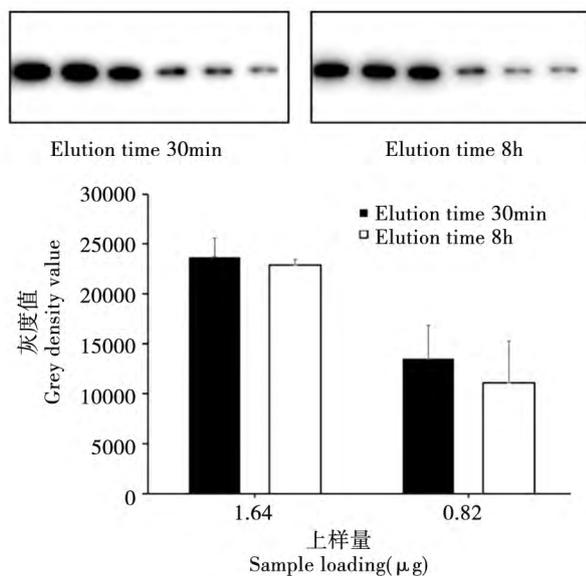


图 2 洗脱时间对蛋白免疫印迹结果的影响

Fig. 2 Effects of elution times on Western Blot results

2.3 不同图像处理软件对蛋白免疫印迹法检测蛋白结果的影响

实验按照 6.55 μg 、3.28 μg 、1.64 μg 、0.82 μg 的蛋白梯度上样获得信号后,分别用 Image J 和 Imagequant TL 读取灰度值并进行比值比较(图 3)。以各组 6.55 μg 蛋白灰度值为 1,其它各浓度蛋白灰度值均数比分别为 1:0.56:0.41:0.22 和 1:0.59:0.40:0.15。对上述两种软件获得的蛋白灰度值比值进行直线回归分析,相关系数 R^2 分别为 0.99 和 0.97,提示两种软件获得各组浓度灰度值呈现良好线性关系。比较线性方程斜率,分别为 0.13 和 0.14,提示两种软件读值对组内梯度上样的蛋白样品灰度值趋势一致。

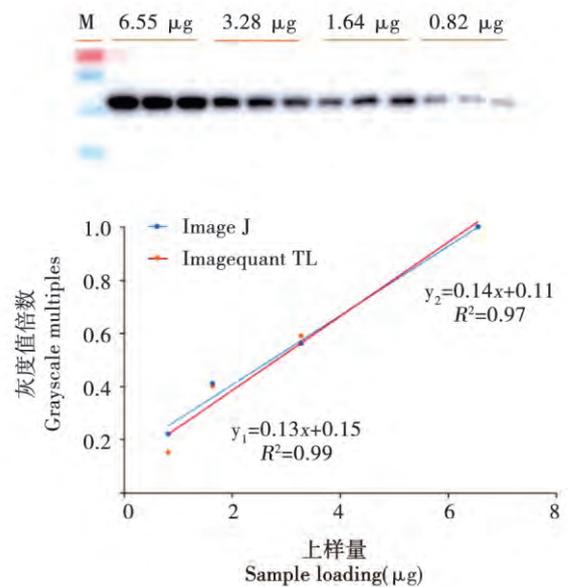


图 3 不同软件对蛋白免疫印迹结果的影响

Fig. 3 Effects of different softwares on Western Blot results

3 讨论

蛋白质印迹法是由瑞士的 Towbin Harry 在 1979 年提出的, Burnette Neal 于 1981 年首次称其为 Western Blot^[16]。在过去的 30 年中,蛋白免疫印迹法的使用量不断增加,目前它已经成为全球科学实验室中使用最广泛的分析技术之一^[17-18]。这种多步骤的方法不仅能够确定目标蛋白的存在与否、大小、状态,还可以对复杂蛋白混合物或匀浆中的特异性蛋白进行半定量分析^[19]。

Western Blot 要获得可量化的结果,通常需要将样品连续对倍稀释来进行测量^[20]。但由于该方法具有步骤较繁琐,实验变量较多等特性,使得应用该方法测定蛋白量时会降低其灵敏度,成为一种半定量补充分析方法^[21-22]。在此之前,已有研究对蛋白免疫印迹各种参数进行实验结果分析,比如选用高电压、短时间电泳组合,以及含 20% 甲醇转移缓冲液则更有助于小分子蛋白免疫印迹检测^[23];在 0.1% 转移缓冲液中加入 SDS 及降低甲醇浓度可提高 60~90 kDa 蛋白的转移结果^[24];还可以通过设计凝胶的浓度来使其适合多种分子量的蛋白^[25];此外不同裂解液也会影响蛋白显示结果^[26]。

基于以上前中期实验变量的研究,由此许多人忽视了实验后期参数对实验结果的重要性。而本实验的切入点是实验后期的参数,即比较不同曝光时间、洗脱时间和不同图像处理软件对蛋白检测结果

的影响。对于曝光时间,本实验结果显示:曝光 6 s 其灰度值结果比值 2.1:1 与原始上样量(比值为 2:1)倍比关系基本一致,但曝光 21 s 后两上样量的灰度值均变大,分别为 14932 ± 1198 和 11994 ± 616 ($n=3$),均数比值为 1.2:1,与上样量相比不成倍比关系。 β -actin 这种结构性表达蛋白通常在样品中高度表达,曝光时间越长,越容易导致其过曝超出其检测范围上限,导致有倍比关系的两上样蛋白检测值接近,趋近于固定值^[20-27]。目前还未有研究表明洗脱时间能否改变灰度值结果,而我们的实验表明,洗脱 30min 和 8h 后的曝光结果相比,蛋白上样量为 $1.64 \mu\text{g}$ 在洗脱 30 min、8 h 后的灰度值分别为 23713 ± 1895 和 22892 ± 571 ($n=3$),无统计学差异 ($P>0.05$),说明洗脱 30min 已经可以将未结合的抗体洗脱完全,并且使背景清晰,故 30 min 和 8 h 结果无差别。有研究表明虽然图像处理软件的使用逐渐深入,但其种类繁多,标准不一,对于上样量与灰度值之间的线性关系存在一定影响^[28],而从本实验来看 Image J 和 Imagequant TL 这两个不同图像处理软件读值对其对倍稀释梯度上样量趋势(两直线方程斜率接近,分别为 0.13 和 0.14)没有明显影响。

4 结论

用三种不同实验参数的变化对蛋白免疫印迹法结果进行了比较,发现曝光时间的不同对其结果有明显改变(6s 倍比关系为 2:1,21s 倍比关系为 1.2:1)如 β -actin 这样的高丰度蛋白需要低曝光时间,才能保持确切的倍比关系,或者可采用连续曝光找到最合适的曝光时间;洗脱 30min 可将未结合抗体洗脱完全,无需延长时间;不同图像处理软件(Image J 和 Imagequant TL)对蛋白免疫印迹倍比梯度上样的蛋白样品灰度值结果分析趋势一致。

参考文献

- [1] Sanders B J, Kim D C, Dunn R C. Recent advances in microscale Western Blotting[J]. *Anal. Methods* 2016, 39(08): 7002-7013.
- [2] Brooks H L, Lindsey M L. Guidelines for authors and reviewers on antibody use in physiology studies[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2018, 314(04): h724-h732.
- [3] Kim B. Western Blot techniques[J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1606: 133-139.
- [4] Bass J J, Wilkinson D J, Rankin D, et al. An overview of technical considerations for Western Blotting applications to physiological research[J]. *Scand J Med Sci Sports* 2016, 27(01): 4-25.
- [5] Janes K A. An analysis of critical factors for quantitative immunoblotting[J]. *Sci Signal* 2015, 8(371): rs2.
- [6] Butler TA J, Paul J W, Chan E C, et al. Misleading westerns: Common quantification mistakes in Western Blot densitometry and proposed corrective measures [J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 5214821.
- [7] Tomasello L, Cluts L, Croce C M. Experimental validation of microRNA targets: analysis of microRNA targets through Western Blotting[J]. *Methods Mol Biol* 2019, 1970: 341-353.
- [8] Mishra M, Tiwari S, Gomes A V. Protein purification and analysis: next generation Western Blotting techniques [J]. *Expert Rev Proteomics* 2017, 14(11): 1037-1053.
- [9] Angela K, Hermann W. Precision and variance components in quantitative gel electrophoresis [J]. *Electrophoresis*, 2010, 26(12): 2470-2475.
- [10] 姜晨晨,程军军,黄梦昊,等. 蛋白免疫印迹半定量分析在药理学研究中的影响因素[J]. *中国药学杂志*, 2015, 50(09): 758-762. [Jiang C C, Chen J J, Huang M H, et al. Impact factors on results of semi-quantitative Western Blot in pharmacological research [J]. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 2015, 50(09): 758-762.]
- [11] 韩晓杰,段婷婷,庞雨,等. Western Blot 免疫印迹法检测磷酸化蛋白表达条件优化研究[J]. *现代生物医学进展*, 2017, 17(21): 4047-4050. [Han X J, Duan T T, Pang Y, et al. Optimization research on the Western Blot experimental conditions for detecting phosphorylated protein [J]. *Progress in Modern Biomedicine* 2017, 17(21): 4047-4050.]
- [12] 吴琼,杨友辉,杨健,等. 大鼠肝组织中 P-糖蛋白的免疫印迹检测方法[J]. *贵州医药*, 2018, 42(01): 9-10. [Wu Q, Yang Y H, Yang J, et al. Detection of P-glycoprotein in rat liver with Western Blotting[J]. *Guizhou Medical Journal* 2018, 42(01): 9-10.]
- [13] 庞雅湘,聂启昊,刘晓宁,等. 3 种细胞裂解液提取总蛋白在 Western Blot 中的效果分析[J]. *河北医科大学学报*, 2019, 40(03): 263-267. [Pang Y X, Nie Q H, Liu X N, et al. Analysis of three cell lysates on total protein extraction in Western Blot [J]. *Journal of Hebei Medical University*, 2019, 40(03): 263-267.]
- [14] Qiang L Z, Mahmood T, Chang Y P. Western Blot: technique, theory and trouble shooting[J]. *Am J Med Sci* 2012, 4(09): 429-434.
- [15] Liu A, Zhao F, Zhao Y, et al. A portable chemiluminescence imaging immunoassay for simultaneous detection of different isoforms of prostate specific antigen in serum [J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, 81: 97-102.
- [16] Moritz, Christian P. Tubulin or not tubulin: Heading toward total protein staining as loading control in Western Blots [J]. *Proteomics* 2017, 17(20): 1600189.
- [17] Rajeshwary G, Gilda J E, Gomes A V. The necessity of and strategies for improving confidence in the accuracy of Western Blots [J]. *Expert Rev Proteomics* 2014, 11(05): 549-560.

(下转第 366 页)

全满足后续实验要求。

参考文献

- [1] 张军,蒋惠萍,陈咏宁,等. *Fat-1* 基因过表达抑制宫颈癌 HeLa 细胞生长机制研究[J]. 现代妇产科进展, 2019, 28(4): 241-245.
- [2] 夏迪,蒋雯雯,王慧霄,等. *HOTAIR* 对宫颈癌 HeLa 细胞增殖及自噬的影响[J]. 中国妇产科临床杂志, 2019, 20(1): 7-9.
- [3] 王欣,谭磊,陆凤,等. *DC-SIGN* 真核表达载体的构建及其稳定转染 HeLa 细胞系的建立[J]. 中国妇产科临床杂志, 2015, 23(3): 12-16.
- [4] 潘婧,彭佳,潘跃银,等. *D896N* 突变型 *EGFR* 稳转细胞株的构建及其对吉非替尼敏感性的研究[J]. 安徽医科大学学报, 2018, 53(9): 1327-1331.
- [5] 林怡婷,林雨虹,阮梅,等. *MC38-luc* 稳转细胞株的构建及在小鼠结肠癌肝转移模型中的应用[J]. 福建医科大学学报, 2018, 52(5): 305-310.
- [6] 黄萃园,张洪,白瑞丹,等. *Toll* 样受体 4 重组质粒及稳转 HepG2 细胞株的构建[J]. 福建医科大学学报, 2018, 22(9): 1714-1716.
- [7] 梁天宇,许雯雯,王国庆,等. 过表达 *FCHSD1* 对细胞增殖以及迁移行为的影响[J]. 泰山医学院学报, 2019, 4(3): 161-164.
- [8] 谢宝明,于国伟,令世鑫,等. 慢病毒介导稳定表达 *FRT-lacZ* 基因的 MDCK 细胞株构建[J]. 生物技术, 2016, 26(1): 23-28.
- [9] 张永军,李静静,郑典鹏,等. 慢病毒介导稳定表达 *MCM7-CDC6* 细胞株的建立[J]. 生物技术, 2018, 28(5): 411-416.
- [10] 陈姣,王晓冬,贾永前,等. 稳定表达 *FLT3-ITD/FIV* 载体的急性髓细胞白血病细胞株的构建及鉴定[J]. 中国药科大学学报, 2017, 48(6): 727-732.
- [11] 李聪聪,朱莉,等. 宫颈癌的病因及宫颈癌疫苗现状[J]. 现代肿瘤学, 2018, 26(20): 3333-3335.
- [12] 沈艳,沈凤,闫海洋,等. *TET1* 过表达载体构建及其稳定过表达的宫颈癌 HeLa 细胞鉴定[J]. 山东医药, 2018, 58(16): 43-45.
- [13] 刘鹏飞,陈纳泽,向阳,等. 视黄醇代谢相关基因 *LRAT* 和 *RDH12* 在宫颈鳞癌细胞系中的抗肿瘤作用[J]. 现代妇产科进展, 2018, 27(1): 9-13.
- [14] 郑小妹,林叶飞,张韶琼,等. *WIFI* 在宫颈癌中的表达及其对宫颈癌细胞生物学行为的影响[J]. 重庆医学, 2018, 47(21): 2857-2860.
- [15] 佐合拉古丽,木塔力甫,阿依努尔,等. 转录因子-21 对宫颈癌细胞放疗敏感性及凋亡的影响[J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(12): 2977-2981.
- [16] 韦荣飞,李梦媛,杨星九,等. *Smad3* 对非小细胞肺癌 A549 细胞和宫颈癌 HeLa 细胞迁移的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(1): 11-15.
- [17] 陈华萍,陈旭昕,董伟杰,等. *Rab26* 诱导宫颈癌 HeLa 细胞凋亡并抑制其迁移[J]. 第三军医大学学报, 2016, 38(24): 2576-2579.
- [18] 杨光辉,刘香香,吴琼,等. *FuGENE6* Transfection Reagent 及 pEGFP-N1-HSF1 转染 JEG-3 细胞条件的优化[J]. 贵州医科大学学报, 2017, 42(12): 1-5.
- [19] 于洋,高聪,红霞,等. *PDZK1* 基因过表达对宫颈癌基因过表达对宫颈癌 HeLa 细胞生物学行为的作用[J]. 武警后勤学院学报, 2016, 25(12): 969-973.
- [20] Gallo-Oller G, Ordonez R, Dotor J. A new background subtraction method for Western Blot densitometry band quantification through image analysis software[J]. J Immunol Methods, 2018, 457: 1-5.
- [21] Kurien B T, Scofield R H. Validating antibody specificities for immunohistochemistry by protein blotting methods[J]. Methods in Molecular Biology, 2017, 1554: 61.
- [22] Taylor S C, Thomas B, Geetha Y, et al. A defined methodology for reliable quantification of Western Blot data[J]. Mol Biotechnol, 2013, 55(03): 217-226.
- [23] Boltaev U, Meyer Y, Tolibzoda F, et al. Multiplex quantitative assays indicate a need for reevaluating reported small-molecule TrkB agonists[J]. Sci Signal, 2017, 10(493): eaal1670.
- [24] Prudent R, Demoncheaux N, Diemer H, et al. A quantitative proteomic analysis of cofilin phosphorylation in myeloid cells and its modulation using the LIM kinase inhibitor Pyr1[J]. PLOS ONE, 2018, 13(12): e0208979.
- [25] 王文倩,魏颖,王宇,等. 蛋白免疫印迹法检测小分子蛋白的实验条件优化研究[J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(07): 1230-1232. [Wang W Q, Wei Y, Wang Y, et al. Optimization research on the Western Blot experimental conditions for detecting small molecule proteins[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2015, 15(07): 1230-1232.]
- [26] Ni D, Xu P, Gallagher S. Immunoblotting and immunodetection[J]. Curr Protoc Cell Biol, 2017, 74: 6.2.1-6.2.37.
- [27] 陈彩萍,冯志奇,宋壮,等. 蛋白免疫印迹法同时检测大、小分子蛋白的实验条件改进[J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(24): 4618-4621. [Chen C P, Feng Z Q, Song Z, et al. Improvement on the Western Blot experimental conditions for simultaneous analysis of proteins with high and low molecular mass[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2016, 16(24): 4618-4621.]
- [28] 任向波,吴秀丽,李芬. 不同裂解液对血管蛋白提取和磷酸化蛋白免疫印迹的影响[J]. 河南师范大学学报: 自然科学版, 2015, 43(05): 102-106. [Ren X B, Wu X L, Fen L. Effect analysis of different cell lysate on the extraction of total protein from vascular tissue and detection of phosphor-protein by Western Blot[J]. Journal of Henan Normal University: Natural Science Edition, 2015, 43(05): 102-106.]
- [29] 杨权. Western Blotting 检测肝硬化患者肝组织中 B7 分子实验条件的探讨[D]. 南京: 东南大学, 2006.
- [30] 申婷婷,杨举,王宫,等. 基于免疫印迹定量分析的总蛋白提取方法比较[J]. 生物技术, 2018, 28(04): 366-371. [Shen T T, Yang J, Wang G, et al. Comparison of different protein extraction methods using immunoblot quantification analysis[J]. Biotechnology, 2018, 28(04): 366-371.]

(上接第 375 页)