

摘要

使用 FluorChem®HD2 成像系统采集数字图像是与化学发光免疫蛋白印迹检测胶片相比较而言的。结果表明数字图像在同等曝光时间下比检测胶片产生的图像质量更高、获得的动态范围更宽、蛋白质检出含量更低。随着每张图像的成本降低、时间减少、图像归档以及定量图像分析，数字成像技术是化学发光免疫蛋白印迹检测中可供选择的最佳方法。

引言

免疫蛋白印迹法是广泛使用的方法，它的特性优良，用于量化在细胞培养、组织、血清和纯化蛋白样品（1）中的蛋白质丰度。化学发光是一种利用酶和过氧化物底物催化反应产生光信号的标准检测技术，无需光照，背景噪音低。酶与二抗结合，二抗与一抗结合，一抗特异性与目的蛋白结合。研究人员广泛应用化学发光技术，因为它与放射方法相比危险更小，但具有同等的性能。

通过曝光胶片进行化学发光检测是常用的方法，该法的线性范围有限，胶片相互作用差。

FluorChem®HD2和FC2成像系统采用CCD相机、快速镜头、暗箱实现定量化学发光检测；当优化使用时，该免疫蛋白印迹分析工具功能强大。与Alpha Innotech ChemiGlow® 化学发光底物配合使用，可以快速成像并获得高品质图像和精确结果。并且不需要昂贵的检测胶片和胶片冲洗。

材料与与方法

化学发光免疫印迹的胶片检测与 FluorChem®HD2 检测

通过在相同印迹上成像来评估胶片和 FluorChem®HD2 性能。首先在 FluorChem®HD2 上然后在胶片上成像影。

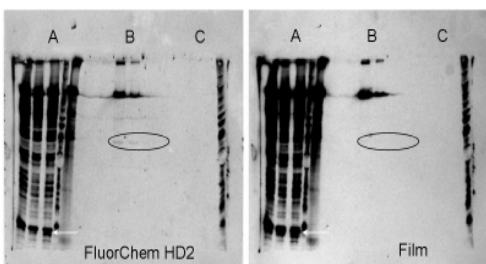


图 1：免疫蛋白印迹的 HD2 和胶片图像的比较。化学发光标记免疫蛋白印迹显示：(A) 全部细胞细菌裂解液；(B) 纯化转座酶 (tnp) 蛋白质和 (C) 分子量标准。采用 FluorChem®HD2 成像系统获得的图像（左图像）和每种系统上曝光 5 分钟采用胶片获得的图像（右图像）。FluorChem®HD2 系统的分辨率置于“Normal”位置。胶片图像在 FluorChem®HD2 系统上以白光照射成像而转换成数字图像。要注意的是如图中毗邻明条带（箭头）的暗条带的分辨率和个别暗带检测（椭圆形）所示，

FluorChem®HD2 图像的图像质量更高。

把一个上样有全部细胞细菌裂解液的、纯化转座酶蛋白质和标准蛋白条带的标准 SDS-PAGE 凝胶溶解，使用标准转膜技术转移到一个印迹膜上。封闭该印迹，以免抗转座酶一抗温育，然后以辣根过氧化物酶结合的羊抗兔抗体标记。该印迹以 ECL 化学发光检测试剂盒（GE Healthcare）处理，在正常分辨率（无结合）条件下使用 FluorChem®HD2 成像系统五分钟成像。然后该印迹胶片曝光 5 分钟，制成胶片。

系列狭缝印迹稀释液

FluorChem®HD2 系统量化蛋白数量的能力通过成像和分析系列稀释蛋白进行评估。

制备一系列稀释度的辣根过氧化物酶结合的抗体（goat antirabbit IgG Horseradish Peroxidase Antibodies Inc, Davis, CA），采用歧管型过滤器（The Convertible, Gibco BRL, Gaithersburg, MD），把它们沉积在低自发荧光杂交膜（Millipore-FL）的表面。在第一沉积带上的蛋白质的浓度为全部蛋白质的 1ng。另外稀释液包括一系列 1:10 稀释度，最后浓度每沉积带为 100fg。该印迹以 ChemiGlow® 系统处理，并在 FluorChem®HD2 成像系统上成像。

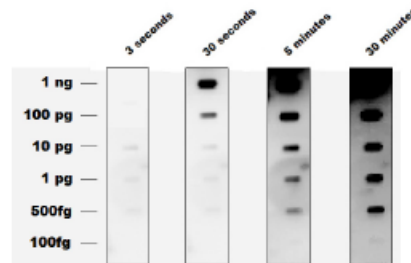


图 2：在化学发光狭缝印迹上以 FluorChem®HD2 系统成像，系列稀释液显示把曝光时间延长到 30 分钟的效果。系统使用数字成像检测少量蛋白（500fg）的能力随曝光时间的增加而增加。

结果与讨论

图像质量、线性动态范围和检测低水平蛋白的能力是化学发光免疫印迹检测仪器的重要性能。

高图像质量需要目测评估相邻条带的分离情况（分辨率）和发现各种蛋白质数量范围（对比度）。胶片也要求采用使用低对比度损失的白光照射来数字化原始胶片的额外步骤。当通过条带的清晰度和对比度以及暗条带的可视化效果来判断时，FluorChem®HD2 系统的化学发光免疫印迹图像要比胶片图像高质量一些。

蛋白质数量的定量分析要求宽的线性动态范围和检测低水平蛋白的能力。同胶片成像（3）相比较，该 FluorChem®HD2 系统拥有 3.80D 的线性动态范围（2）和长期持续（有用的）的信号采集时间。来自 500fg 沉积蛋白的信号显著高于背景变量。因为常规检测低水平蛋白质依赖于样品制备和标记条件，这些结果表明数字成像能够检测低水平蛋白。

当采用 FluorChem® HD2 系统时，通过延长曝光时间能够检测少量蛋白质，同时保持了对信号强度的显著线性响应。由于胶片相互作用差，对比度损失，较亮的信号很快饱和，与为检测较亮信号而优化的曝光时间相比，用胶片检测微弱的信号也需要延长曝光时间。

总之，在要求最苛刻的免疫蛋白印迹实验中，化学发光免疫蛋白印迹检测技术使用 FluorChem®HD2 成像系统产生了高品质图像和定量结果。

参考资料

1. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.
2. <http://www.alphainnotech.com>

3. http://www.kodak.com/global/images/en/consumer/products/techInfo/e2329/f002_0618ac.gif

该 FluorChem® 生物成像系统系列是为用于化学发光、荧光、可见光成像而设计。该 FluorChem® 系列产品结合灵敏度、分辨率和动态范围为客户提供一流的凝胶、膜和微孔板实验成像能力。

更多信息，请登陆：<http://www.alphainnotech.com>。

