

蛋白质免染系统的应用、常见问题及改进

吴志明^{1,2}, 骆杨庆^{1,3}, 张俊杰^{1,2*}, 王工程⁴, 吕高奇⁵

- (1. 江苏海洋大学, 食品科学与工程学院, 连云港 222005; 2. 江苏省海洋生物技术重点实验室, 连云港 210095; 3. 连云港环海化工有限公司, 连云港 222066; 4. 江苏悠然生物科技有限公司, 连云港 222061; 5. 元测检测技术(江苏)股份有限公司, 宿迁 223800)

摘要: 聚丙烯酰胺凝胶电泳是蛋白质分离的关键方式, 随着蛋白质印迹法的应用, 常被用作生物医学等方面分析的下游工具。近年来, 近红外荧光材料膜的运用以及 3D 打印等新兴技术逐渐应用于组织工程中, 对蛋白质免染系统提出了更高的定量要求。本文阐述了免染系统的原理, 操作和分析中存在的问题及改进方法, 并对免染技术的发展进行了展望, 以期为实现标准免染技术对蛋白质的准确计量分析提供基础和思路。

关键词: 免染系统; 蛋白质印迹; 近红外; 3D 打印; 组织工程

Application, problems and improvement of protein stain-free system

WU Zhi-Ming^{1,2}, LUO Yang-Qing^{1,3}, ZHANG Jun-Jie^{1,2*}, WANG Gong-Cheng⁴, LV Gao-Qi⁵

- (1. School of Food Science & Technology, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China; 2. Jiangsu Provincial Key Laboratory of Marine Biotechnology, Lianyungang 210095, China; 3. Lianyungang Huanhai Chemical Limited Company, Lianyungang 222066, China; 4. Jiangsu Youran Biotechnology CO., Ltd, Lianyungang 222061, China; 5. Yuance Testing Technology (Jiangsu) Co., Ltd, Suqian 223800, China)

ABSTRACT: Polyacrylamide gel electrophoresis is a key method for protein separation. With the application of western blotting, it is often used as a downstream tool for biomedical analysis. In recent years, the application of near-infrared fluorescent material membranes and emerging technologies such as 3D printing have gradually been applied to tissue engineering, putting forward higher quantitative requirements for stain-free systems. This article described the principle of the stain-free system, the problems in its operation and analysis, and its improvement methods. It also looked forward to the development of stain-free technology, hoping to provide the basis and ideas for realizing the accurate measurement and analysis of protein by standard stain-free technology.

KEY WORDS: stain-free system; western blotting; near infra-red; 3D printing; tissue engineering

0 引言

聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)是以聚丙烯酰胺凝胶作为电中性介质的一

种电泳技术, 常用作蛋白质分离鉴定, 也可广泛应用于分离、鉴定、纯化 DNA 和小分子多肽等的现代生物技术研究^[1]。

蛋白质印迹法自 1979 年首次应用以来, 因其能够实

基金项目: 江苏省研究生科研与实践创新计划项目(SJCX20_1316、SJCX20_1313)、江苏省海洋生物技术重点实验室课题(HS13003)

Fund: Supported by the Jiangsu Province Postgraduate Research Program(SJCX20_1316, SJCX20_1313), Jiangsu Province Marine Biotechnology Key Laboratory Project (HS13003).

*通信作者: 张俊杰, 教授, 主要研究方向为食品加工与安全。E-mail: 631284077@qq.com

*Corresponding author: ZHANG Jun-Jie, Professor, Jiangsu Ocean University, No.59 Cangwu Road, Haizhou District, Lianyungang 222000. E-mail: 631284077@qq.com

现对蛋白质印迹的准确密度计量分析, 逐渐成为测定复杂生物样品中蛋白质的关键技术。标准免染技术不仅体现了基于染色法的总蛋白定量方法的优势, 更是能够通过检测和校正误差来为蛋白质印迹实验操作过程中数据的标准化处理提供了稳妥的质控工具^[2]。标准免染凝胶成像系统更是一种可重复、快速、环保的聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分析工具, 可实现蛋白质分析工作流程的高效及可视化。由于其易于操作使用及其蛋白质定量和数据分析能力的优势, 标准免染系统成为第一个能够替代几十年来传统考马斯蓝凝胶染色技术的体系^[3]。本文阐述了免染系统的原理, 操作和分析中存在的问题及改进方法, 并对免染技术的发展进行了展望, 以期为实现标准免染技术对蛋白质的准确计量分析提供思路。

1 标准免染技术的原理及应用

1.1 标准免染技术的原理

标准免染系统是在利用 SDS-PAGE 标准惯例的基础上, 建立的一个快速而容易使用的蛋白质可视化系统。标准免染系统使用的标准蛋白试剂、样品制备方法和电泳方法与传统聚丙烯酰胺凝胶电泳相同。免染系统由 3 部分组成: 标准免染凝胶、标准凝胶成像仪和 Image LabTM软件^[4]。在凝胶制剂中掺入三卤代化合物, 在电泳结束后, 将凝胶从盒中取出, 放入标准免染凝胶成像仪中, 通过紫外线透照激活凝胶 1 min, 分离后蛋白质中所含色氨酸残基在合适的成像系统中暴露在 UV 照射下时被催化, 与免染凝胶中的三卤化合物发生共价反应, 所得的“活化”蛋白质被激发产生荧光信号。根据色氨酸残基的数量产生不同强度的荧光, 被电荷耦合器件(charge coupled device, CCD)摄像机检测和捕捉^[5], 进而在 Image LabTM软件中生成凝胶数字图像, 系统可以根据标准蛋白 marker 自动估算各泳道中蛋白条带的相对分子质量。因此, 标准免染技术在 Western 印迹过程中凸显出更多的优势^[6]。

1.2 标准免染技术的应用

标准免染系统广泛应用于食品分析检测以及现代生物医学中, 而蛋白质印迹技术是复杂生物环境中检测和定量蛋白质最常用的分析技术之一。蛋白质印迹技术往往作为分子生物学、生物化学和免疫遗传学等研究领域常用的检测蛋白表达水平的下游技术, 结合其他分析软件或影像软件使用, 从而达到更好的蛋白质表达评价效果。

1.2.1 分子结构评价

随着生命科学以及计算机科学的发展, 分子对接技术广泛应用于生物科技领域, 例如, 天然产物小分子配体与靶标蛋白的相互作用评价等, 分子对接技术通过算法的优化以及分子动力学模型的完善, 最终通过蛋白质印迹技

术实现对目的蛋白的表达评价^[7]。

张文通^[8]通过湿转法转膜、封闭及抗体杂交后, 辣根过氧化物酶-增强化学发光法(horseradish peroxidase enhanced chemiluminescence, HRP-ECL)鉴定后放入 KODAK 全光谱多功能活体成像系统中曝光。最终通过 IMAGE J 图像分析软件, 并结合使用 AUTODOCK VINA 分子对接方法评价 TGFBR1(Transforming growth factor beta receptor 1)与山柰酚-3-O-芸香糖苷(KR)之间的关系。Western blot 为分子结构评价提供了新颖的质控工具。

1.2.2 3D 组织结构打印

近年来, 3D 打印飞速发展, 已逐渐广泛应用于多个生物医学学科领域, 而蛋白质印迹技术作为其协作工具, 也有了新的要求和挑战。例如, 心血管领域的 3D 打印因其特殊精度要求, 促使蛋白质印迹检测的定量愈加精确^[9]。

徐臣年等^[10]通过心血管 CT 扫描后利用 Mimics 软件进行血管重建、3D 打印, 最终通过蛋白印迹法(Western blot)检测其 β -主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex)、心房利钠肽(atrial natriuretic peptide)等含量, 验证 3D 打印将应用于临床心血管生物产品的制作的可行性, 同时也说明 Western blot 是 3D 打印技术及横主动脉缩窄(transverse aortic coarctation, TAC)模型影像学评价等综合运用的重要工具。

杨家祥^[11]通过 Western blot 茜素红钙染色(Alizarin-red S)检测骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)、骨形态发生蛋白-7(bone morphogenetic protein-7, BMP-7)及骨桥蛋白(osteopontin, OPN)表达情况。通过 Micro-CT 扫描后, 利用 Micro-view 软件进行三维重建, 最终观察目的胫骨修复状况。3D 生物打印将成为组织工程和生物医学系统开发的强大制造工具, 而蛋白质印迹技术则是 3D 打印在医学方面应用发展强有力的支撑工具。

2 标准免染系统的优点及研究进展

2.1 标准免染系统的优点

传统的染色与脱色, 一般先用考马斯亮蓝 R-250 染色液对电泳后的 SDS-PAGE 凝胶染色, 再用常规脱色液(冰醋酸-甲醇体系)进行脱色处理, 此过程不仅耗时较长, 而且脱色时间较难控制, 得到的凝胶背景色往往过深或弱带不显示^[12]。另外, 甲醇是易燃、易挥发的有毒液体, 被人体吸收后能够经代谢形成甲酸, 在眼部积累, 对眼部造成不可逆转的永久性损伤^[13]。冰醋酸对身体的影响则是慢性的, 长期反复接触, 可导致皮肤干燥、脱脂和皮炎等^[14]。而使用免染系统则省去了电泳后的固定、染色、脱色等步骤。可使实验时间缩短 70%左右。成像和分析步骤实现自动化, 从而将电泳后染脱色时间从 2 h 以上缩短到约 2~5 min, 显著提升了实验效率, 同时整个过程避免甲醇、乙酸试剂的使用^[15]。

在传统考马斯染色法体系中对凝胶脱色会导致背景色去除不完全,会使得肉眼很难观察凝胶中的弱带;此外长时间的脱色会导致弱带的丢失,影响实验效果。而采用标准免染系统则不会被高背景信号所屏蔽,既易于蛋白质的观察和定量,又可以观察到弱带。因此,标准免染凝胶所产生的低背景图像为非定量和定量凝胶分析提供了优越的实验基础^[16]。

2.2 标准免染系统研究进展

标准免染系统近数十年来取得了长足的发展,已广泛应用于生物医学、组织工程等方面,与此同时,随着 3D 打印的应用,蛋白质印迹技术成为不可或缺的支持工具。另一方面,蛋白质印迹膜的改良、以及红外荧光材料的应用,蛋白质印迹的技术日益成熟。而蛋白质定量精度的提升、蛋白质印迹膜的改良以及定量过程中标准模型的建立与应用还有较大的提升空间。

2.2.1 蛋白质定量精度的提升

蛋白质印迹实验过程较长,在各个操作步骤(如:电泳、转膜等)都会增加实验误差的几率,从而影响蛋白质定量准确性,通常会增加相对恒定表达的“管家蛋白”作为内参载量对照^[17]。管家蛋白表达恒定通常是假设的,在某些条件下可能会发生改变。此外,由于抗体动态范围的局限性,会使信号检测系统易于饱和。目前,针对所述问题,国内外学者进行了一系列的研究和探讨^[18]。

王文倩等^[19]通过比较转膜电压和的时间组合后,使用含 20% 甲醇的转移缓冲液转膜并配合飞克级化学发光剂检测,可以更迅速有效地获得小分子蛋白的信号,提高蛋白检测的灵敏度。陈彩萍等^[20]则将不同浓度的凝胶以一定比例组合,组合后的凝胶能够充分发挥两部分凝胶的各自分离能力,同时检测大分子蛋白和小分子蛋白,具有较强的实用性。

BUTLER 等^[21]在不同的 SDS-PAGE 条件下采用红外荧光或化学发光检测蛋白质印迹,对 7 篇文献中的数据进行了对比,观察到非线性密度测定数据存在误差,提出进行专门设计的蛋白质印迹分析,以建立检测的动态范围的建议,从而使蛋白质印迹数据的定量更加精确。

2.2.2 蛋白质印迹膜的改良

蛋白质印迹通常使用硝酸纤维素或聚偏氟乙烯膜,而聚偏氟乙烯因其高蛋白质结合能力和较高的灵敏度等优点脱颖而出。同时,纯聚偏氟乙烯膜的孔径效应证实孔径在蛋白质印迹分析中起着至关重要的作用^[22],微孔膜是蛋白质结合的蛋白质印迹的基底,孔径决定了蛋白质不通过时结合膜的大小^[23]。

目前,已经进行了各种尝试来修饰用于蛋白质印迹分析的聚偏氟乙烯膜。例如,TANG 等^[24]等证明,用量子点改性的聚偏氟乙烯膜可以最大限度地减少小分子穿

过膜的渗透。CHO 等^[25]制造了用于检测蛋白质的聚偏氟乙烯纳米纤维,而不需要甲醇预湿步骤,显著提高了实验效率,避免了实验过程中甲醇对人体的损伤。LIN-MOSHIER 等^[26]通过使用辣根过氧化物偶联的抗肌动蛋白抗体进行实验,该协议在不增加实验成本以及不损失高数据质量的前提下,使蛋白检测时间缩短到 1~3 h,显著提高了 Western blot 的效率。

2.2.3 近红外材质的运用

蛋白质的近红外荧光检测因其克服了传统化学发光检测方法的局限,摆脱了传统酶促反应的依赖,能够在低背景下的高信噪比达到精准定量的优点从而得到推广^[27]。ORNBERG 等^[28]将基于近红外的量子点结合到聚偏氟乙烯膜上,将玻璃纤维涂覆在改性的硝酸纤维素上,该方法被提议作为传统聚偏氟乙烯膜的替代物,以实现更好的蛋白质转移和固定。PADMAVATHY 等^[29]则利用一种能够显示出近红外(near infrared, NIR)发射特性的自发荧光纳米多孔聚偏氟乙烯[poly(1,1-difluoroethylene), PVDF]膜来检测蛋白质印迹过程中的高分子量和低分子量蛋白质,并提供了一种在蛋白质转移过程中使用近红外发射 ALK-PVDF 膜的通用和有效的方法。

3 使用标准免染系统中遇到的问题及改进措施

3.1 凝胶制备液的渗漏

免染预制胶在制作过程中,很容易出现渗漏的情况,一旦出现渗漏,会导致预制胶的液面过低,点样孔的位置变低,从而影响点样操作。此外免染预制胶中除了含有聚丙烯酰胺外,还含有荧光剂。丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺单体及溶液是中枢神经毒物,具有较高的生物毒性,且在不凝结的情况下,毒性较高,容易造成水污染和环境污染^[30]。荧光剂具有较高的致癌性,荧光剂被人体吸收后不易分解和排出,并在体内逐渐蓄积,会成为潜在的致癌因素^[31]。同时荧光剂会与伤口处的人体蛋白质结合,导致伤口愈合时间长。因此,在操作中尽量避免胶液的渗漏问题。

3.2 保存时出现涨胶的情况

免染预制胶在保存的过程中,如果存放时间过长,会出现涨胶现象,另外,随着保存时间的延长,预制胶包装中注入的保存液减少,胶体与板之间容易形成空隙。由于空隙的存在,电泳时极易形成波浪形的褶皱^[32]。

对于上述问题,免染预制胶在长期保存时,要确保包装的密封性,并在包装中加入适量保存液,密封完全后置于 4 °C 冰箱中保存。

3.3 凝胶状况对免染电泳效果的影响

聚丙烯酰胺凝胶(polyacrylamide gel, PAG)是由丙烯

酰胺(acrylamide)和交联试剂 N, N'-甲叉双丙烯酰胺(N,N'-methylenebisacrylamide)在有引发剂和增速剂的情况下聚合而成的^[33]。丙烯酰胺的单体形成长链,由 N,N'-甲叉双丙烯酰胺的双功能基团和链末端的自由功能基团反应发生交联^[34]。

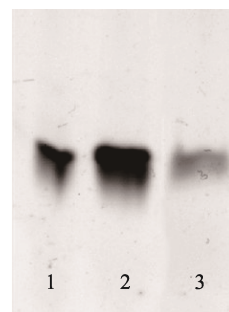
在免染预制胶的制作过程中,凝胶的状况对凝胶的质构及使用具有很重要的影响。凝胶受多重因素的影响,如气温、凝胶的浓度、制胶的试剂的纯度和两板之间的夹缝的厚薄等^[35]。环境温度较高时,凝胶速度快,在这种情形下制得的胶质构较脆,在拔出梳子时容易破坏点样孔,在电泳后取下时容易破碎;环境温度较低时,凝胶速度慢,放置较长时间后,胶液仍可以流动,导致局部凝结,局部未凝结,有时还会形成波浪形或者锯齿形的纹路,这都是凝胶不均匀的情形^[36]。两板之间的夹缝的厚薄决定凝胶的厚度,凝胶的厚度过厚会影响凝胶的凝结时间和凝胶质量以及成像效果^[37]。

3.4 电泳结果有拖尾及阴影

在电泳的过程中会产生条带拖尾或者是整块胶在凝胶成像系统下带有阴影,此时条带的分辨率就变得很低,并且会出现所有条带的溴酚蓝前沿线不平整、中间突出,两端向内翘起或者是溴酚蓝前沿线条带中间部分向内凹,两端向外突出的情况。拖尾现象通常是因为样品点样量过多和溶解不完全引起的(如图 1)^[38]。可以在加样前对样品进行离心,过滤去除不溶物。也可以通过选择适当的缓冲溶液和凝胶缓冲液改进样品的溶解性质,或者适当加入表面活性剂增溶(如图 2)。在凝胶成像系统下存有阴影,是因为还原剂在加热的过程中被氧化失活,使解离的蛋白质分子重新折叠和亚基重新缔合,由于其分子量通常要比目标条带大,所以会生成未知条带或阴影(如图 3)^[39]。为解决这一问题,在样品制备时,根据需要在煮沸变性后适量加入二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)或 Beta 巯基乙醇,从而补充还原剂的不足,同时要提高水的纯度,采用重蒸水或者去离子水(如图 4)^[40]。当出现前沿线不平整的情形时,中间向里凹的原因是在凝胶的过程中,中间部分的凝结度不好,不够均匀,需要均匀凝结后再做后续实验;中间鼓起的原因一般由于两板之间的底部间隙气泡未排除干净,或者聚合不完全,可以在使用时在两板之间加入适量的缓冲液以排除气泡^[41];同时电泳的速度跟电压有关,电压升高,蛋白质迁移速率增加,电泳速度加快,在确保电泳条带的良好前提下适当提高电压可以缩短电泳时间,提高效率。但是随着电压的升高,电泳温度升高且热量不能及时散出,会出现微笑型的前沿线,即凝胶中部的样品在电场的迁移速率比左右两侧快,导致条带成为弧形^[42]。

3.5 凝胶成像软件的使用

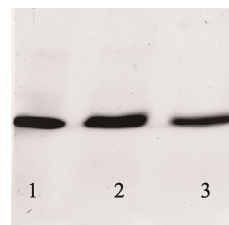
成像效果还与凝胶成像软件的匹配程度以及灵敏度有关。目前市面上的免染预制胶的凝胶成像系统软件主要有 Image Lab 和 1D 凝胶分析软件 Quantity One^[43]。Image lab 软件是实验中最常用的凝胶分析软件,不仅功能丰富,而且自动化程度较高,为标准免染实验过程中精确的数据处理与分析提供了新颖独特的质控工具^[44]。



注: 1. 1 mg/mL 溶菌酶; 2. 0.8 mg/mL 溶菌酶;
3. 0.1 mg/mL 溶菌酶。

图 1 拖尾现象

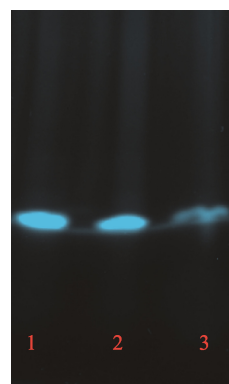
Fig.1 Tailing phenomenon



注: 1. 1 mg/mL 溶菌酶; 2. 0.8 mg/mL 溶菌酶;
3. 0.1 mg/mL 溶菌酶。

图 2 电泳正常成像

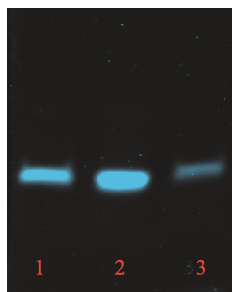
Fig.2 Normal electrophoretic imaging



注: 1. 1 mg/mL 溶菌酶; 2. 0.8 mg/mL 溶菌酶;
3. 0.1 mg/mL 溶菌酶。

图 3 阴影现象

Fig.3 Shadow phenomenon



注: 1. 1 mg/mL 溶菌酶; 2. 0.8 mg/mL 溶菌酶;
3. 0.1 mg/mL 溶菌酶。

图 4 凝胶正常成像
Fig.4 Normal gel imaging

一般在使用凝胶成像软件时,用化学高灵敏度设置对印迹进行成像,然后根据需要调整合适的曝光时间和灵敏度/分辨率设置^[45]。如果目标蛋白在使用高灵敏度设置时在短时间内被检测到,使用高分辨率图像并根据需要调整曝光时间^[46]。较长的激活时间(如 2 或 5 min)会产生更高的强度,但不会影响检测到的总蛋白量的线性关系^[47]。在标准免染系统中可使用任何合适的预染色蛋白质标准品,但是由于某些标准品的色氨酸含量较高或预染色时使用的染料颜色的原因,这些蛋白质标准品在凝胶成像系统下成像时会发出非常强的信号,较强的信号会干扰总蛋白定量的测定^[48]。因此,应选择合适的蛋白质标准品。

3.6 Western blot 中的问题及改进措施

转膜的效果一般与膜的种类、转膜液的选择以及转膜强度等有关。由于硝酸纤维素(nitrocellulose, NC)膜和 PVDF 膜与蛋白结合的原理不同,首先应根据目的蛋白的特性选择合适的膜,其次应根据目的蛋白的分子量,匹配相应的转膜液并选择合适的转膜强度(时间和电流)。若转膜强度太强,则会导致目的条带位置上方的杂带太强,同时转膜过程中尽量除去气泡,使膜、滤纸和胶紧密结合,洗膜时控制好洗膜强度。并且在抗体孵育的过程中,保持膜的充分浸润。

4 结语和展望

标准免染系统因其具有耗时短、环保、高效等优点,逐渐成为基础研究以及某些疾病的临床诊断中普遍使用的工具,作为实现蛋白质印迹可视化的系统,最终通过完备的免染体系、良好的样品制备技术、检测方法、软件和分析的共同协作,能够精准地确定目的蛋白的分子量^[49]。

本文通过对使用标准免染技术过程中遇到的凝胶渗漏、凝胶凝结状况不佳、凝胶成像效果差等问题提出了优化和改进的方法,优化后的标准免染技术体系能够达到凝胶完整不渗漏、背景色适合观察、凝胶成像效果良好、条带清晰,从而提升蛋白质的分离效果,实现标准免染技术

对蛋白质的准确计量分析^[50]。

近年来,具有近红外特性的材料在蛋白质印迹技术中得到广泛应用。与传统化学荧光发光相比,其膜和生物分子在光谱的近红外区具有低得多的自发荧光,并且其背景信号低、信噪比高、对组织有更深的穿透,这些优点使其比可见光更有利于生物应用^[51]。然而,使用近红外材料发光的内在毒性是一个重大的限制,所以聚偏氟乙烯膜的改性仍需进一步研究和探讨。

同时,材料学、生物工程、组织工程等学科领域的不断发展与融合,促使 3D 生物打印技术的不断进步,3D 打印有望彻底改变医疗行业^[52]。然而,用于组织工程的 3D 打印正处于起步阶段,开发的 3D 打印组织需结合动物模型,利用免疫组化、PCR、蛋白印迹等实验技术在动物体内进行验证^[53]。由于 3D 打印的高精度要求,这对蛋白质印迹中的蛋白定量或半定量的精度及准确性提出了较高的要求。因此,需采用适当的质量控制策略,使蛋白质印迹数据的定量更加标准化,消除数据收集和分析存在的局限性,才能使得蛋白质印迹作为分析的良好工具。

总之,标准免染系统是蛋白质印迹法高信息量和低成本蛋白质分析工具,这标志着不仅在生物科学领域而且在临床领域,标准免染系统都将是蛋白质分析重要发展方向。

参考文献

- [1] 王露露,刘欣婷,贾东海,等. 银染聚丙烯酰胺凝胶电泳技术体系的优化[J]. 新疆农业科学, 2019, 56(12): 2312-2319.
WANG LL, LIU XT, JIA DH *et al.* Optimization of silver staining polyacrylamide gel electrophoresis technology system [J]. Xinjiang Agric Sci, 2019, 56(12): 2312-2319.
- [2] GÜRTLER A, KUNZ N, GOMOLKA M, *et al.* Stain-Free technology as a normalization tool in Western blot analysis [J]. Anal Biochem, 2013, 433(2): 105-111.
- [3] ZHANG R, YANG D, ZHOU C, *et al.* β -Actin as a loading control for plasma-based Western blot analysis of major depressive disorder patients [J]. Anal Biochem, 2012, 427(2): 116-120.
- [4] KAZMIN D, EDWARDS RA, TURNER RJ, *et al.* Visualization of proteins in acrylamide gels using ultraviolet illumination [J]. Anal Biochem, 2002, 301(1): 91-96.
- [5] 杜照奎,徐慧君,柯世省. 蛋白质 SDS-PAGE 电泳实验常见问题及改进措施[J]. 山东化工, 2019, 48(16): 135-136.
DU ZK, XU HJ, KE SS. Common problems and improvements of SDS-PAGE electrophoresis for protein [J]. Shandong Chem Ind, 2019, 48(16): 135-136.
- [6] NASCIMENTO AF, FLETCHER CDM. The controversial nosology of benign nerve sheath tumors: Neurofilament protein staining demonstrates intratumoral axons in many sporadic schwannomas [J]. Am J Surg Pathol, 2007, 31(9): 1363.
- [7] 曹茂启,王珏,刘德见,等. 分子对接技术在天然产物小分子与靶标蛋白相互作用中的研究进展[J]. 广东化工, 2019, 46(19): 109, 130.

- CAO MQ, WANG Y, LIU DJ, *et al.* The use of synchrotron vacuum ultraviolet photoionization in the study of secondary organic aerosol [J]. *Guangdong Chem Ind*, 2019, 46(19): 109, 130.
- [8] 张文通. 山柰酚-3-O-芸香糖苷对血管平滑肌细胞增殖、迁移及 TGFBR1 信号通路激活的影响[D]. 广州: 南方医科大学, 2018.
- ZHANG WT. Effects of kaempferol-3-o-rutinoside on proliferation, migration and activation of TGFBR1 signaling pathway of vascular smooth muscle cells [D]. *Guangzhou: Southern Medical University*, 2018.
- [9] YI Z, YI C, CONG C, *et al.* CD36 upregulation in HT-29 tumor cells cultured on 3D multicellular spheroids culturing platform based on anisotropic magnetic hydrogel [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2018, 14(3): 594–600.
- [10] 徐臣年, 刘洋, 丁鹏, 等. 3D 打印技术在小鼠主动脉缩窄模型影像学评价中的应用研究[J]. *中国体外循环杂志*, 2020, 18(5): 312–316.
- XU CN, LIU Y, DING P, *et al.* The application of 3D printing technology in the evaluation of mice aortic coarctation model [J]. *Chin J Extracorp Circulat*, 2020, 18(5): 312–316.
- [11] 杨家祥. 3D 打印技术构建的新型复合组织工程骨修复骨缺损的研究[D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2019.
- YANG JX. Study on repairing bone defect with new composite tissue engineering bone constructed by 3D printing technology [D]. *Hefei: Anhui University of Chinese Medicine*, 2019.
- [12] 王琳, 刘杰, 黄金林, 等. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离拟南芥叶片实验教学的改进[J]. *教育教学论坛*, 2019, (30): 266–267.
- WANG L, LIU J, HUANG JL, *et al.* Improvement of experimental teaching of *Arabidopsis thaliana* leaves separation by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis [J]. *Educate Teach Forum*, 2019, (30): 266–267.
- [13] 邸瑶, 张丽萍, 夏红梅. 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳的实验教学改革[J]. *实验室科学*, 2011, 14(1): 58–59.
- DI Y, ZHANG LP, XIA HM. Improvement of experimental teaching of sodium dodecyl sulfate-polyacrylate gel electrophoresis [J]. *Lab Sci*, 2011, 14(1): 58–59.
- [14] 王凯丰. 从降低白酒生产中甲醇的含量谈食品安全危害控制措施的合理分类[J]. *品牌与标准化*, 2020, (5): 53–56.
- WANG KF. Discussion on reasonable classification of food safety hazard control measures from reducing the content of methanol in liquor production [J]. *Brand Stand*, 2020, (5): 53–56.
- [15] MEYER TS, LAMBERTS BL. Use of coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips [J]. *BBA General Subject*, 1965, 107(1): 144–145.
- [16] 郭培国, 刘文杰, 李海洋, 等. 一种快速有效检测 SSR 标记的非变性聚丙烯酰胺凝胶的银染方法[J]. *广州大学学报(自然科学版)*, 2016, 15(4): 8–12, 49.
- GUO PG, LIU WJ, LI HY, *et al.* A rapid and effective method of silver staining for detecting SSR markers in nondenaturing polyacrylamide gels [J]. *J Guangzhou Univ (Nat Sci Edit)*, 2016, 15(4): 8–12, 49.
- [17] FORTES MAS, MARZUCA-NASSR GR, VITZEL KF, *et al.* Housekeeping proteins: How useful are they in skeletal muscle diabetes studies and muscle hypertrophy models? [J]. *Anal Biochem*, 2016, (504): 38–40.
- [18] COURSEY TG, HENRIKSSON JT, BARBOSA FL, *et al.* Interferon- γ -induced unfolded protein response in conjunctival goblet cells as a cause of mucin deficiency in sjgren syndrome [J]. *Am J Pathol*, 2016: 1547–1558.
- [19] 王文倩, 魏颖, 徐玉东, 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(7): 1230–1232.
- WANG WQ, WEI Y, XU YD, *et al.* Optimization research on the Western blot experimental conditions for detecting small molecule proteins [J]. *Progress Mod Biomed*, 2015, 15(7): 1230–1232.
- [20] 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 CP, FENG ZQ, SONG Z, *et al.* Improvement on the Western blot experimental conditions for simultaneous analysis of proteins with high and low molecular mass [J]. *Progress Mod Biomed*, 2016, 16(24): 4618–4621.
- [21] BUTLER TAJ, PAUL JW, CHAN EC, *et al.* Misleading westerns: Common quantification mistakes in western blot densitometry and proposed corrective measures [J]. *Bio Med Res Int*, 2019, (1): 1–15.
- [22] CHO S, JO WJ, KANG JW, *et al.* Isolation of extracellular vesicle from blood plasma using electrophoretic migration through porous membrane [J]. *Sens Actuat B Chem*, 2016, 233(5): 289–297.
- [23] TU JL, DING MY, ZHANG Q, *et al.* Design of carbon encapsulated Fe₃O₄ nanocatalyst with enhanced performance for fischer-tropsch synthesis [J]. *Chem Cat Chem*, 2015, 7(15): 2323–2327.
- [24] TANG F, ZHANG S, ZHALA G, *et al.* Gold-nanoparticle-modified polyvinylidene fluoride membranes used for western blotting with high sensitivity [J]. *Rsc Adv*, 2014, 4(59): 31337–31340.
- [25] CHO E, KIM C, HWANG CH, *et al.* Western blot membrane composed of electrospun polyvinylidene fluoride nanofiber membrane and polyethylene terephthalate sheet [J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2013, 13(6): 4355–4357.
- [26] LIN-MOSHIER Y, MARCHANT JS. A rapid western blotting protocol for the *Xenopus oocyte* [J]. *Cold Spring Harbor Protocol*, 2013, (3): 072793.
- [27] TU JL, DING MY, ZHANG Q, *et al.* Design of carbon encapsulated Fe₃O₄ nanocatalyst with enhanced performance for fischer-tropsch synthesis [J]. *Chemcatchem*, 2015, 7(15): 2323–2327.
- [28] ORNBERG RL, HARPER TF, LIU H. Western blot analysis with quantum dot fluorescence technology: A sensitive and quantitative method for multiplexed proteomics [J]. *Nat Methods*, 2005, 2(1): 79–81.
- [29] PADMAVATHY N, DAS GHOSH L, SHARMA M, *et al.* Ultra-sensitive detection of proteins using chemically modified nanoporous PVDF membrane with attenuated near IR autofluorescence [J]. *Chem Select*, 2018, 3(13): 3839–3847.
- [30] 高凌云, 黄爱民, 黄健文. 凝胶电泳考马斯亮蓝微波染色[J]. *福建医科大学学报*, 2003, (1): 78–85.
- GAO LY, HUANG AM, HUANG JW. SDS-PAGE Coomassie brilliant blue microwave staining [J]. *J Fujian Med Univ*, 2003, (1): 78–85.
- [31] 初红涛, 姚冬, 苏立强, 等. 液相色谱法快速检测纸质品中 4 种荧光增白剂[J]. *印染*, 2019, 45(7): 49–53.
- CHU HT, YAO D, SU LQ, *et al.* Quick detection of 4 fluorescent brighteners in paper products with LC method [J]. *Dye Finish*, 2019, 45(7): 49–53.
- [32] 徐亚军, 李珂, 刘珂珂, 等. 大豆根瘤内生菌全细胞可溶性蛋白 SDS-PAGE 电泳图谱分析[J]. *食品研究与开发*, 2019, 40(11): 159–165.

- XU YJ, LI K, Liu KK, *et al.* Analysis on whole cell soluble protein electrophoresis of SDS-PAGE electrophoresis profiles of endophytic bacteria from soybean nodules [J]. *Food Res Dev*, 2019, 40(11): 159–165.
- [33] 叶长春. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳染色方法的改进[J]. *湖北工业大学学报*, 2009, 24(4): 16–18.
- YE CC. A modified method for SDS-PAGE staining [J]. *J Hubei Univ Technol*, 2009, 24(4): 16–18.
- [34] 王竹林, 杨睿, 刘联正, 等. 聚丙烯酰胺凝胶电泳银染的影响因素[J]. *实验室研究与探索*, 2011, 30(9): 15–17.
- WANG ZL, YANG R, LIU LZ, *et al.* Factors of silver staining of polyacrylamide gel electrophoresis [J]. *Res Explor Lab*, 2011, 30(9): 15–17.
- [35] 王润润, 王东霞, 张小微, 等. 用于蛋白质组分析的两种马铃薯块茎蛋白质提取方法的比较[J]. *甘肃农业大学学报*, 2019, 54(1): 89–95.
- WANG RR, WANG DX, ZHANG XW, *et al.* Comparison of two extraction methods of potato tuber protein for proteomic analysis [J]. *J Gansu Agric Univ*, 2019, 54(1): 89–95.
- [36] 贺福初, 译. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- HE FU, translate. *Molecular cloning experiment guide* [M]. Beijing: Science Press, 1999.
- [37] 刘军花, 李学龙, 刘茜阳, 等. 一种基于琼脂糖凝胶电泳法检测 SARS-CoV-2 的新方法[J]. *微生物学杂志*, 2020, 40(3): 51–54.
- LIU JH, LI XL, Liu XY, *et al.* A new method for detection of SARS-CoV-2 based on agarose gel electrophoresis [J]. *J Microbiol*, 2020, 40(3): 51–54.
- [38] SANGUINETTI CJ, NETO ED, SIMPSON AJG. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels [J]. *Biotechniques*, 1994, 17(5): 914–921.
- [39] 岳志蕾, 王菲. 现代蛋白质分离纯化技术[J]. *养生保健指南*, 2018, (26): 339.
- YUE ZL, WANG F. Modern protein separation and purification technology [J]. *Sci Technol Vis*, 2018, (26): 339.
- [40] 王清蓉, 万德光, 国锦琳, 等. 三斑海马蛋白质组学双向电泳技术的建立与优化[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(5): 50–54.
- WANG QR, WANG DG, GUO JL, *et al.* Establishment and optimization of two-dimensional electrophoresis technique for proteomics of *Hippocampus trimaculatus* [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2018, 24(5): 50–54.
- [41] 王冬冬, 刘佳伟, 陆晓玉, 等. 微卫星 PCR 凝胶电泳染色方法的比较[J]. *分子植物育种*, 2017, 15(8): 3179–3182.
- WANG DD, LIU JW, LU XY, *et al.* Comparison of microsatellite PCR gel electrophoresis staining methods [J]. *Mol Plant Breed*, 2017, 15(8): 3179–3182.
- [42] 陆建. 蛋白质纯化技术及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- LU J. *Protein purification technology and its application* [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005.
- [43] CHARETTE SJ, LAMBERT H, NADEAU PJ, *et al.* Protein quantification by chemiluminescent Western blotting: Elimination of the antibody factor by dilution series and calibration curve [J]. *J Immunol Methods*, 2010, 353(1-2): 148–150.
- [44] VIGELS A, DYBBOE R, HANSEN CN, *et al.* GAPDH and β -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.
- [45] RIVERO-GUTIÉRREZ B, ANZOLA A, MARTÍNEZ-AUGUSTIN O, *et al.* Stain-free detection as loading control alternative to ponceau and housekeeping protein immunodetection in western blotting [J]. *Analy Biochem*, 2014, 467: 1–3.
- [46] JIN S, KENNEDY RT. New developments in western blot technology [J]. *Chin Chem Lett*, 2015, 26(4): 416–418.
- [47] WU Y, WU M, HE G, *et al.* Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: A universal internal control for Western blots in prokaryotic and eukaryotic cells [J]. *Anal Biochem*, 2012, 423(1): 15–22.
- [48] NEUHOFF V, STAMM R, EIBL H. Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis [J]. *Electrophoresis*, 2010, 6(9): 427–448.
- [49] 王世东, 赵墩, 胡玉立, 等. 立显蛋白染色液在 SDS-PAGE 中检测微量蛋白的应用[J]. *中国生物制品学杂志*, 2019, 32(7): 803–805.
- WANG SD, ZHAO D, HU YL, *et al.* Application of fluorescent staining buffer in test for trace protein in SDS-PAGE [J]. *Chin J Biol*, 2019, 32(7): 803–805.
- [50] 陈鑫, 周琬琰, 段蕊, 等. 一种基于蓝银法的快速、低毒染色法在 SDS-PAGE 中的应用研究[J]. *食品科技*, 2020, 45(4): 302–307.
- CHEN X, ZHOU WY, DUAN R, *et al.* Optimization of blue silver staining method in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis [J]. *Food Sci Technol*, 2020, 45(4): 302–307.
- [51] JANES KA. An analysis of critical factors for quantitative immunoblotting [J]. *Sci Signal*, 2015, 371(8): 2005966.
- [52] 孙石磊. 骨碎补与 3D 打印的新型骨组织材料修复糖尿病性牙槽骨缺损及其机制[D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2019.
- SUN SL. Repair of diabetic alveolar bone defect with new bone tissue materials of rhizoma drynariae and 3d printing and its mechanism [J]. Harbin: Harbin University of Commerce, 2019.
- [53] 丁鹏, 刘洋, 徐臣年, 等. 3D 打印技术结合经心尖导管主动脉瓣植入 15 例[J]. *中国体外循环杂志*, 2019, (5): 261–264.
- DING P, LIU Y, XU CN, *et al.* 3D printing technology combined with aortic valve implantation via apical catheter: A report of 15 cases [J]. *Chin J Extracorp Circul*, 2019, (5): 261–264.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介

吴志明, 硕士, 主要研究方向为食品加工与安全。

E-mail: 631284077@qq.com

张俊杰, 教授, 主要研究方向为食品加工与安全。

E-mail: 631284077@qq.com