

# 想要快速捕捉瞬間表現的磷酸化蛋白嗎？

## 捕捉磷酸化蛋白完全3對策: Western Blot, Phosflow, CBA

磷酸化蛋白在細胞內的訊息傳遞路徑上扮演著相當重要角色，但由於磷酸化蛋白表現的時間很短暫，表現量極少，增加研究上的困難。

目前，研究細胞內磷酸化的方法，主要是西方墨點法(Western Blot)、免疫沉澱(Immunoprecipitation)、體外激酶活性測定(In vitro Kinase)、質譜儀(Mass Spectrometry)等生化分析技術，但這一類實驗設計侷限於分析同類型或是高同質性的細胞膜型(Homogeneous Population)。如實驗系統中若只有少數族群會作出反應，傳統生化分析將無法凸顯它們的反應強度，因為被多數的族群平均稀釋。特別是針對一個複雜化的細胞族群，如人類周邊血單核細胞、鼠類脾臟細胞、骨髓細胞等含有少量或是不

同細胞類型的實驗體系。為了能夠靈敏地偵測次族群的生化反應，甚至能顧及細胞的個別差異性，研究人員紛紛採用能夠觀察單一細胞表現的技術來進行訊息傳導的研究，如流式細胞儀。針對細胞內磷酸化蛋白的表現，BD與史丹福大學教授Dr. Nolan合作研發出一系列不同配方之細胞打洞液和固定液，配合高度專一性抗體的染色(此系列產品稱之BD Phosflow)，可因此得到最佳細胞內染效果。此外，藉由流式細胞儀多參數的分析，以ELISA的基本原理，研發出可於同一樣本同時分析多種蛋白的實驗套組--BD™ Cytometric Bead Array，相較傳統Western blot分析，省時(約需4小時)又省力(可同時分析30種不同蛋白)。

## Western Blot / Phosflow / CBA 分析磷酸化蛋白的優缺點

|      | Western Blot  | BD™ Phosflow   | BD™ Cytometric Bead Array   |
|------|---|--|---|
| 樣本類型 | 來自細胞或組織的lysates   | 懸浮或貼附型細胞   | 來自細胞或組織的lysates   |
| 優勢   | 可分析蛋白的分子量大小   | 1. 單一細胞表現分析<br>2. 小量樣本即可分析<br>3. 以細胞表面分子區分多個群體細胞<br>4. 3小時即可得知結果 | 1. 可相對定量磷酸化蛋白含量<br>2. 小量樣本即可分析<br>3. 可同時分析30種不同蛋白<br>4. 4小時即可得知結果 |
| 限制   | 1. 耗時<br>2. 一次能分析的樣本數有限<br>3. 需要較大量的樣本<br>4. 半定量<br>5. 欲分析某群細胞蛋白表現，需先純化該群細胞 | 較不適用於組織分析  | 欲分析某群細胞蛋白表現，需先純化該群細胞  |

## 對策1 Western Blot BD 提供高專一性抗體，降低 background 發生機率

### 起源

自1979年Towbin等人研發出Western blot蛋白質分析方法後，Western blot成為極普遍的蛋白質分析方法之一。Western blot可偵測樣本中特定的微量蛋白質，這項技術是結合膠體電泳(gel electrophoresis)的優越解析力、抗體的專一性、enzyme的敏感性。如此一來，使得在一複合物中，海底撈針地找尋一蛋白質，成為可能。

### Western blot主要分成三個步驟：

#### Step 1

將蛋白質混合物置於SDS-polyacrylamide膠體上，電泳分離。接著是blotting即解析的蛋白質在電場中，從膠體轉移到Nitrocellulose transfer membrane。

#### Step 2

將transfer membrane浸於含有標的蛋白質的抗體(primary antibody)溶液中，形成抗原-抗體複合體。

#### Step 3

加入對primary antibody具專一性的enzyme-linked抗體(secondary antibody)。之後，漂洗此membrane，再加入受質，產生冷光域有色物質，而得知感興蛋白质分子量。

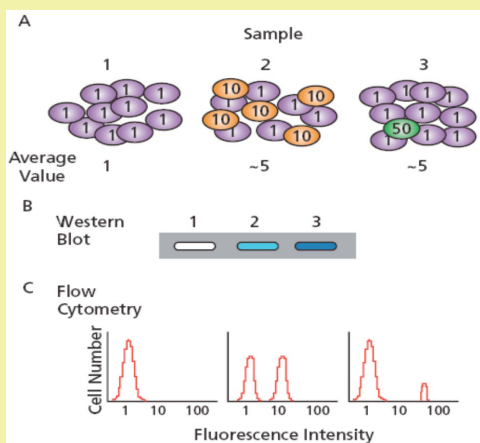
## 對策 2 BD™ Phosflow 高專一性抗體及特製 protocols 讓您輕易地就抓到它!

BD™ Phosflow產品之演進: 流式細胞儀提供單一細胞多參數之分析

早在1994年就有人發表，運用流式技術來粗略測量細胞內蛋白質磷酸化的情形，但因為當時沒有一套通用的細胞前處理及細胞染色的方法，所以沒有辦法做出一致性、高再現性的結果。一直到史丹福大學的 Dr. Garry Nolan改良實驗方法，才真正解除了流式磷酸化分析技術的瓶頸，在2003年 Cytometry文章中，他詳述如何在為期近兩年的研究中，檢測了十多種不同的細胞固定與破膜的方法所提供的磷酸化特異性染色環境。並提出「先固定後免疫染色的重要性」。在文獻中他更指出蛋白質磷酸化測量的成敗取決於兩個關鍵的參數：(1) 最初的細胞固定必須要快速，有效地將蛋白質靜止於在磷酸化的狀態。(2) 細胞破膜的過程必須保證在適當的變性或為變性的狀態下，能夠暴露與抗體結合的特定位點。

因為Dr. Nolan的貢獻，進一步促進多螢光、多參數的訊息傳導分析，並且推動新的磷酸化位點特異性抗體的發現和生產。越來越多的研究人員，利用這嶄新的技術，開發出新的應用領域，如開發抑制細胞訊息傳導路徑的小分子新藥或是研究腫瘤細胞的磷酸化網路。相信不久的未來，這些資訊就會給臨床免疫醫生提供幫助，對患者選擇最有效的治療方式。

而 BD™ Phosflow即是與Dr. Nolan合作的產品之一，針對不同磷酸化蛋白的抗體染色，除了高專一性的抗體之外，另外提供了特製的打洞和固定液，以期有最佳的染色效果。每一種 BD™ Phosflow抗體適用的打洞液和固定液種類及最適protocol，均詳述於抗體產品資訊內容中。



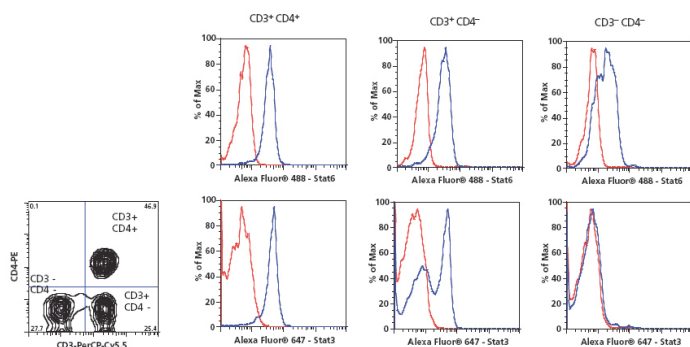
### Flow Cytometry可分析次細胞群的表現

如左圖，三種sample(1, 2, and 3)各含相同細胞數，單顆細胞各含有1倍(紫色)，10倍(紅色)，及50倍(綠色)濃度的相同蛋白質，sample 2和3於Western Blot的表現強度接近。於細胞染色後，兩者之間的差異度則在流式細胞儀表現更為明顯。

### BD™ Phosflow 染色流程



### 單一細胞多參數分析



Stat 6 (pY641)

Human PBMCs: 未處理 (左, 紅色 histograms) 或以 IL-6 + IL-4 100 ng/ml each for 15 minutes at 37° C處理 (藍色 histograms and CD3, CD4 contour plot), 之後細胞以BD Cytotix™ Buffer 固定 10 minutes at 37° C 接著以 BD™ Phosflow Perm Buffer III 打洞 (30 minutes on ice).

Stat 3 (pY705)

Human PBMCs were stained with PerCP-Cy5.5 anti-human CD3, PE anti-human CD4, Alexa FluorR 488 anti-Stat 6 (pY641), and Alexa FluorR 647 anti-Stat 3 (pY705).

細胞表面分子: CD3, CD4      細胞內磷酸化蛋白: Stat6(pY641), Stat3(pY705)

