



全自动蛋白质表达分析技术 原理及其应用



水生所分测中心蛋白质组学平台
王敏

2020.06.19



全自动蛋白质表达分析技术



Simple Western
微量样品全自动
蛋白质定量分析
系统



NanoPro 1000
纳米级超灵敏信
号转导通路分析
系统



Milo
单细胞蛋白质
表达分析系统

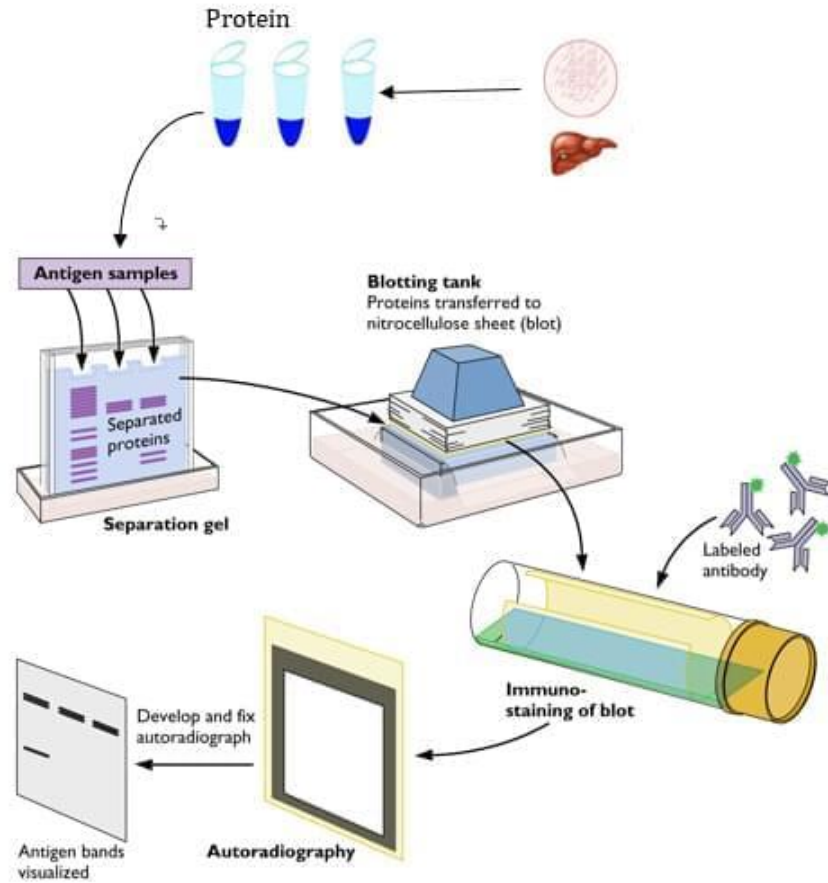


报告内容

- 一、全自动Wes的原理及其应用
- 二、NanoPro 1000的原理及其应用
- 三、Milo单细胞WB的原理及其应用
- 四、总结



蛋白质印迹法（免疫印迹试验）即Western Blot

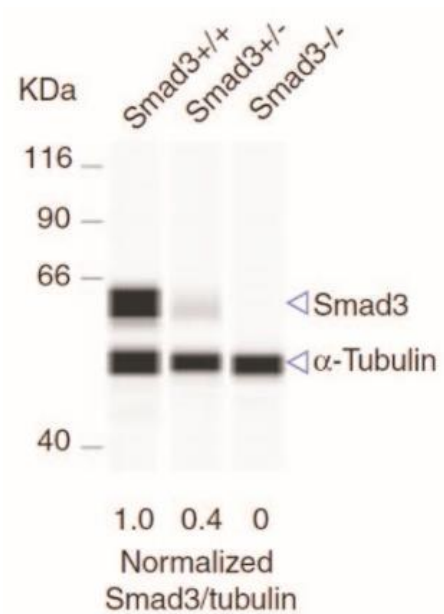


它是分子生物学、生物化学和免疫遗传学中常用的一种实验方法。

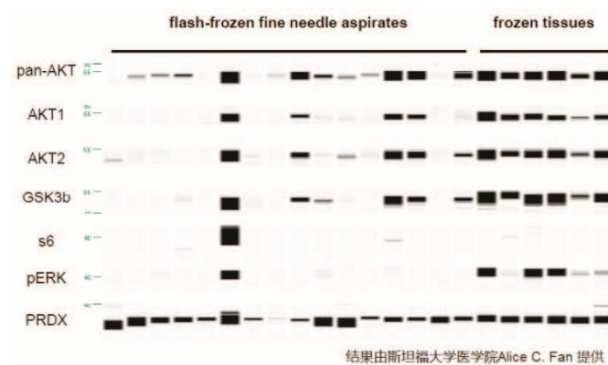
其基本原理是通过特异性抗体对凝胶电泳处理过的细胞或生物组织样品进行着色。通过分析着色的位置和着色深度获得特定蛋白质在所分析的细胞或组织中表达情况的信息。

WB应用领域

基因在蛋白水平的表达研究



疾病早期诊断



临床样本

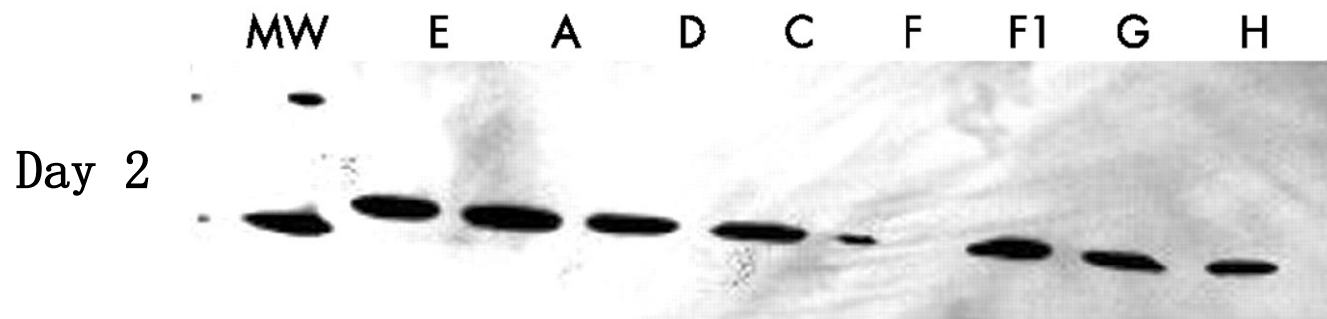
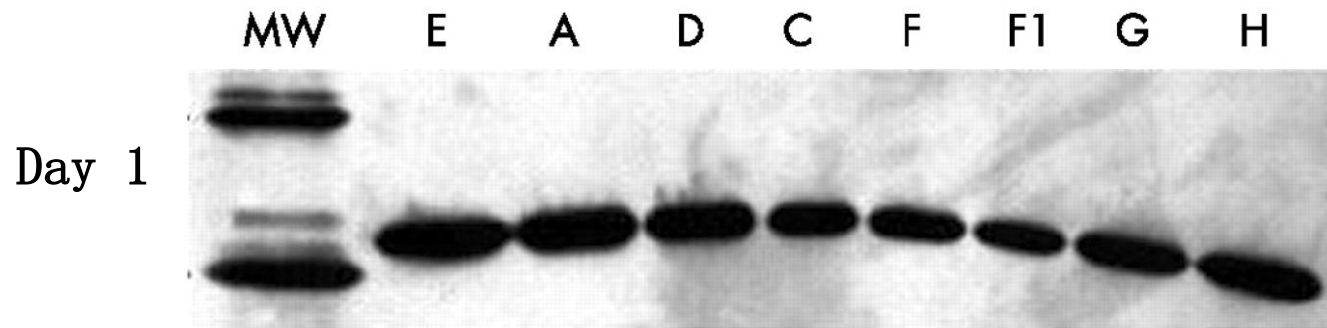


传统Western: 费事费力





传统Western: 结果重现性较差





一、全自动Wes的原理及其应用



美国ProteinSimple公司于2014年推出全自动蛋白表达分析系统 (Wes)

毛细管



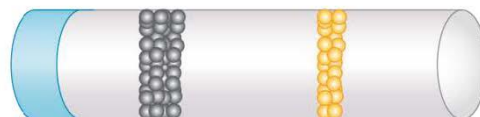
Load Matrix



Load Sample



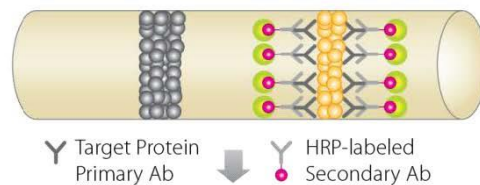
Separate



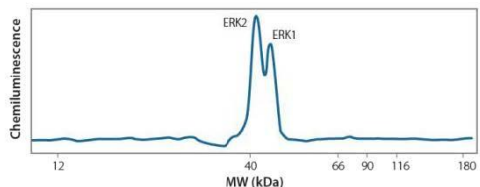
Immobilize



Immunoprobe



Quantitate Signal



全部过程在毛细管内自动完成

与传统 Western blot 不同, 全自动 Wes 无需:

制胶和跑胶

转膜

人工孵育或清洗

压片显影

主观性数据处理



SDS-PAGE

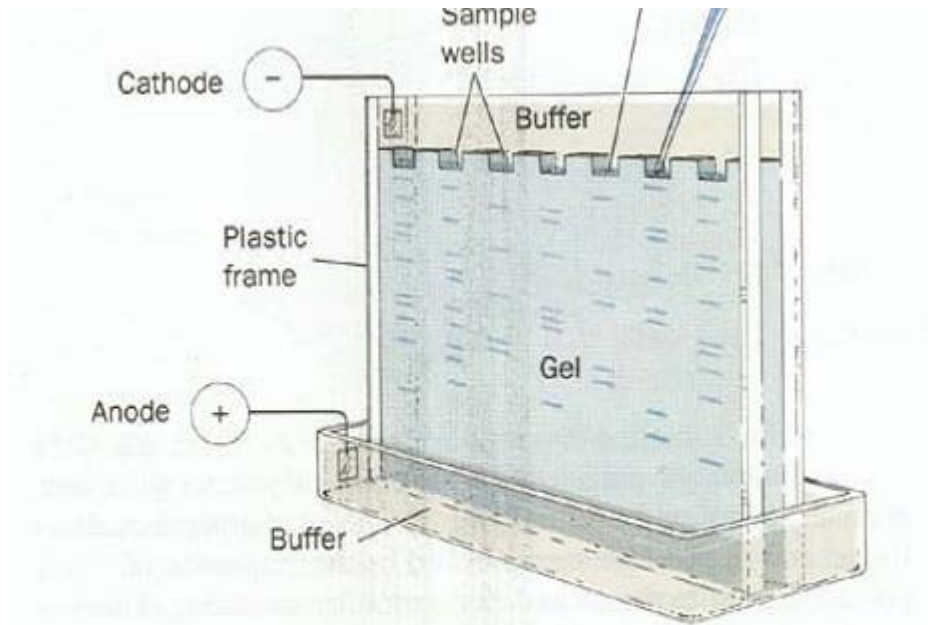


FIGURE 5-23. Apparatus for slab gel electrophoresis. Samples are applied in slots that have been cast in the top of the gel and electrophoresed in parallel lanes.

有毒有害的试剂，如TEMED

繁冗的制胶与电泳

重复性和稳定性较差



毛细管电泳优势

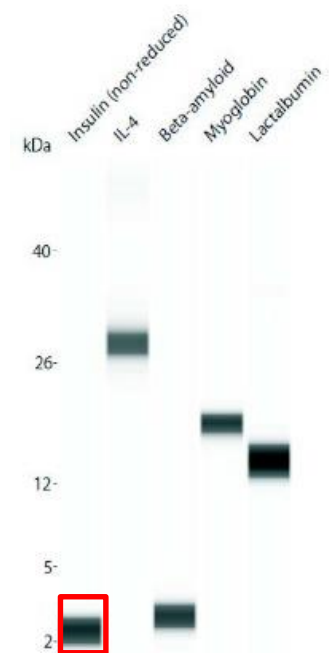
分辨率大概2KDa



大分子量蛋白质检测无忧



轻松完成小至2KD蛋白检测





毛细管电泳优势

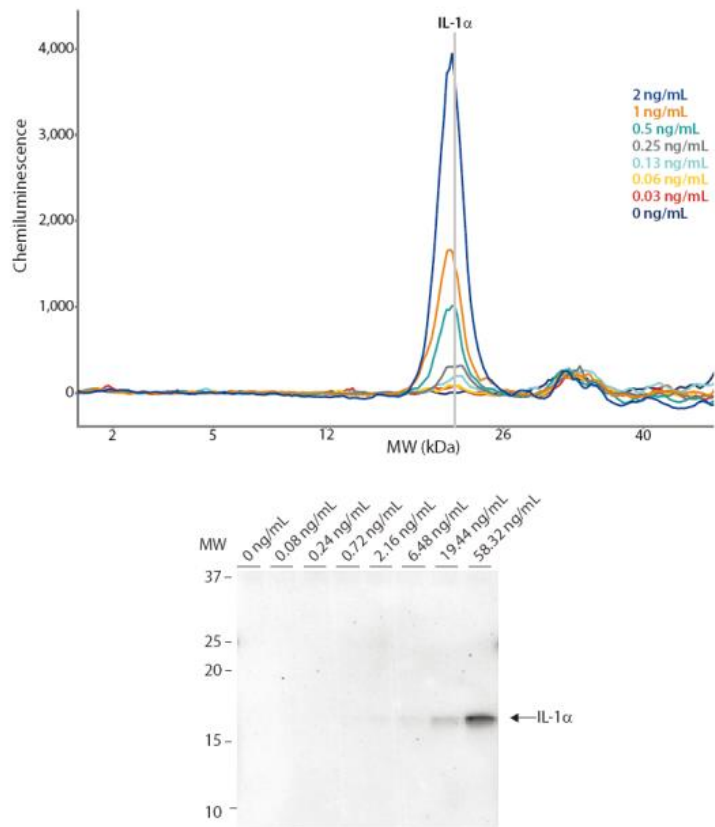


图3. Wes (上) 使用 SA-HRP 二抗检测添加到血清中的重组 IL-1 α ，灵敏度比传统 Western (下) 高 56 倍以上。计算得的灵敏度: Wes 为 0.085 ng/mL, 传统 Western 为 4.9 ng/mL。

灵敏度更高

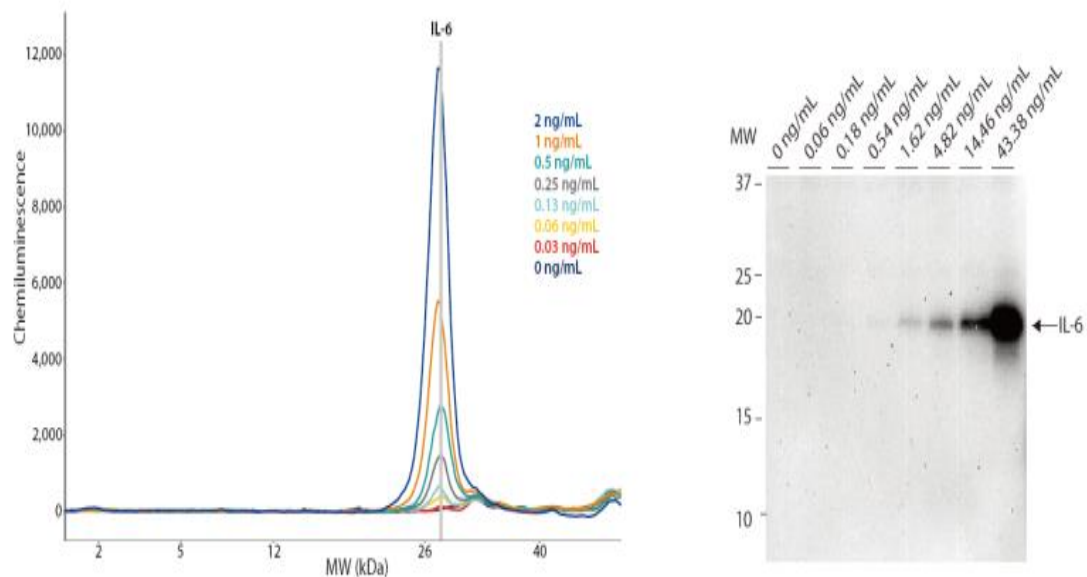


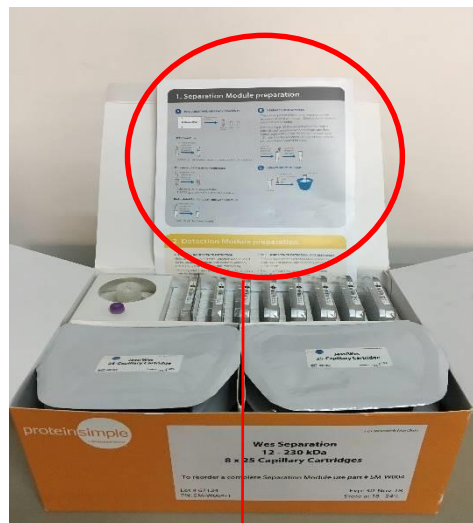
图4. Wes (左) 在利用二抗 SA-HRP 检测人血清中添加的重组 IL-6 时, 灵敏度比传统 Western (右) 高13倍。计算结果显示 Wes 的灵敏度为 0.063 ng/mL, 传统 Western 灵敏度为 0.8 ng/mL。

IL-1 α 灵敏度高**56**倍以上、IL-6灵敏度高**13**倍以上



全自动Wes试剂盒

室温保存



+

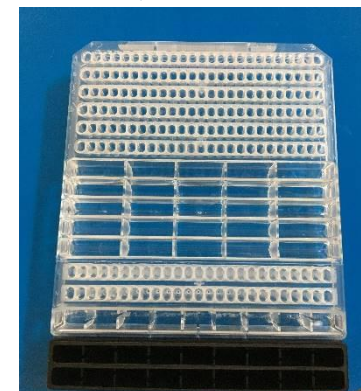
4°C 冰箱保存



操作说明书

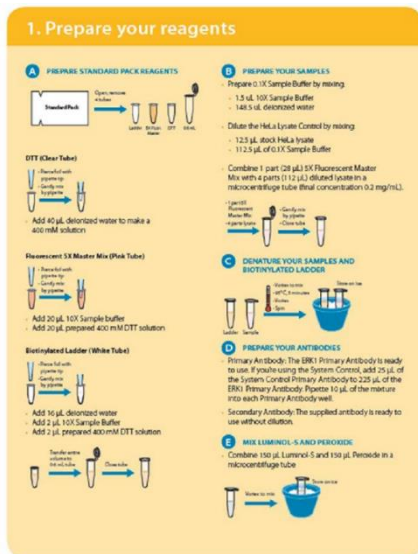


毛细管



样品板

注：试剂盒规格
根据分析的蛋白大小：2-40kDa、12-230kDa、66-440kDa
根据通量：13孔和25孔，可以搭配选择



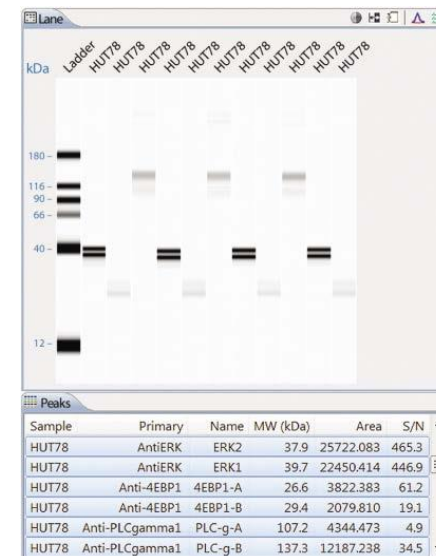
准备样品和试剂



加样



运行



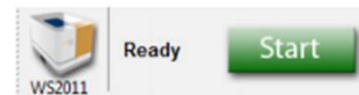
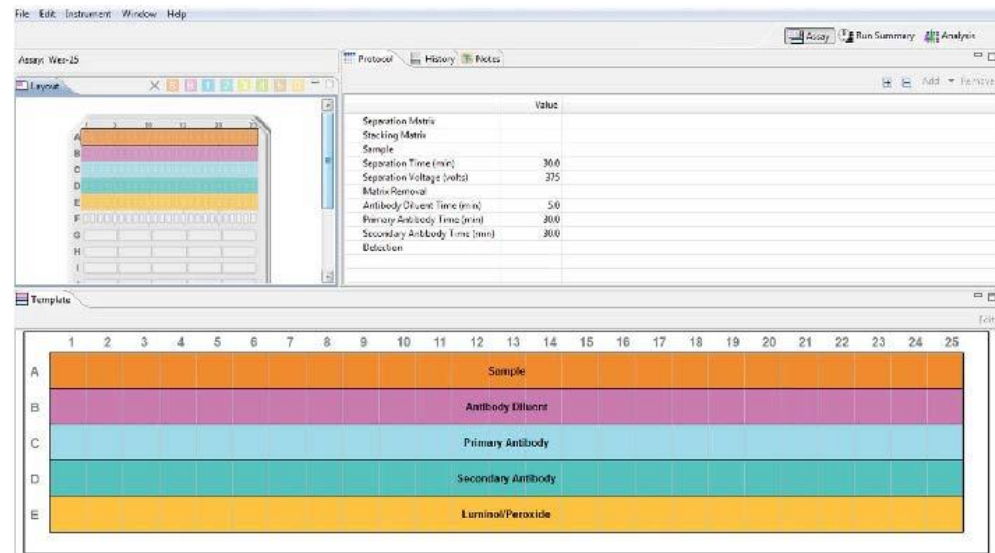
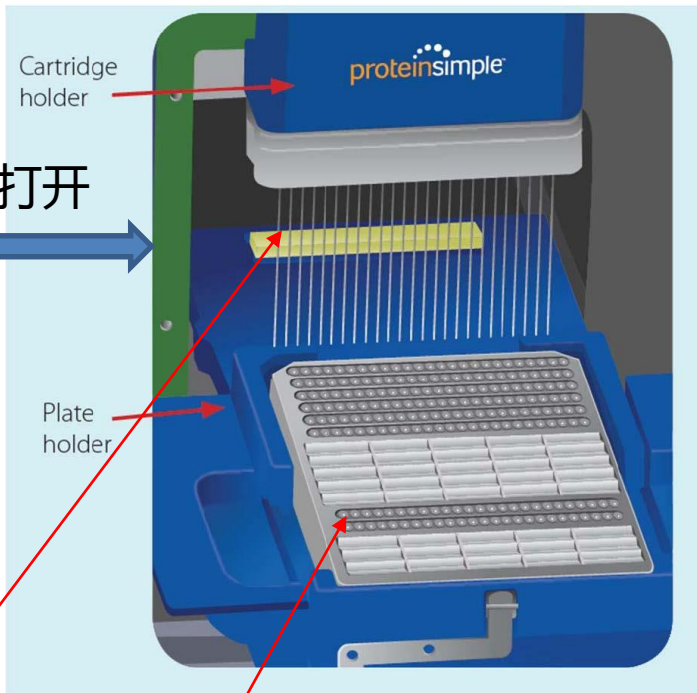
结果

操作简单

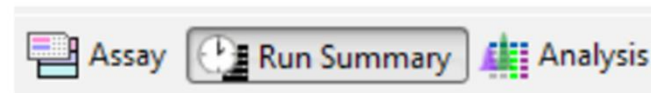
Wes全自动蛋白表达分析系统简明用户手册



黄色的门打开



To check when your results will be ready, click on the **Run Summary** icon...



...and view the **Assay Scheduler** in the **Status** tab:

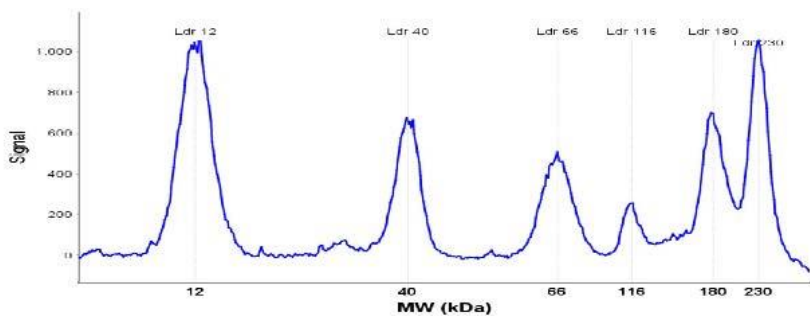
Sample	Sep	Block	1*	2*	Detect	Results
2:59 PM	3:04 PM	3:58 PM	4:05 PM	4:42 PM	5:22 PM	5:38 PM

一次上机运行时间3个小时

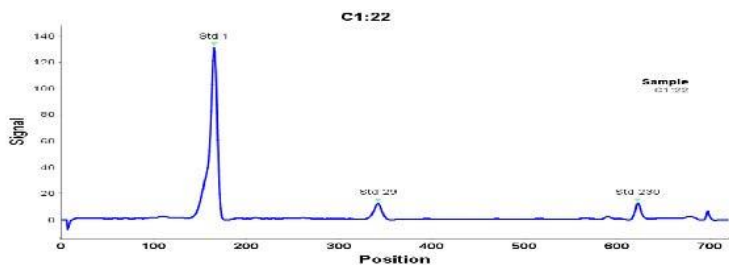


多种结果呈现方式

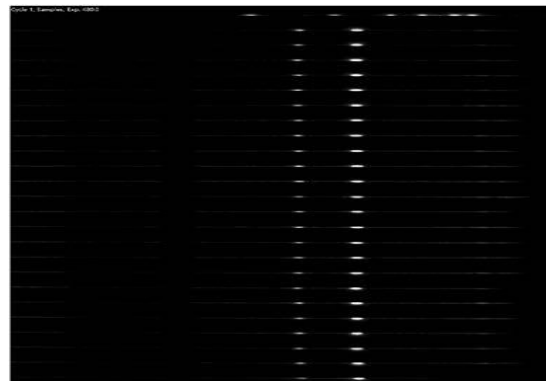
Biotnylated Standards



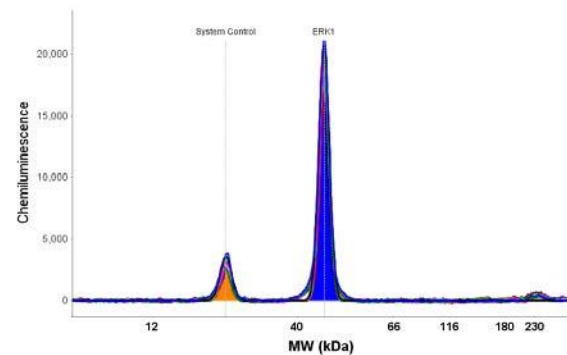
Fluorescent Standards



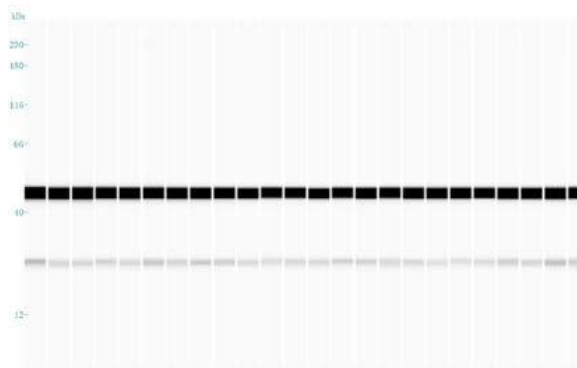
确定无误



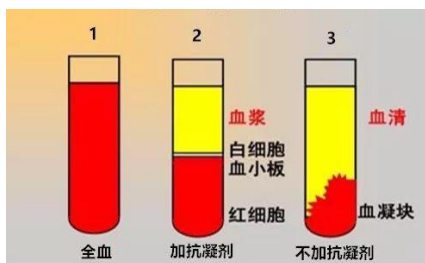
成像图



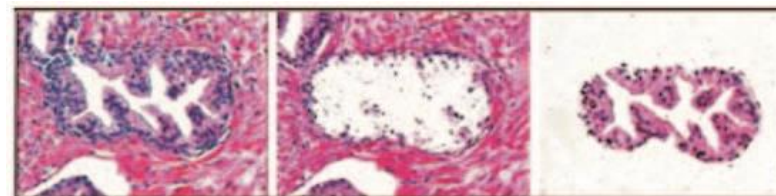
峰型图



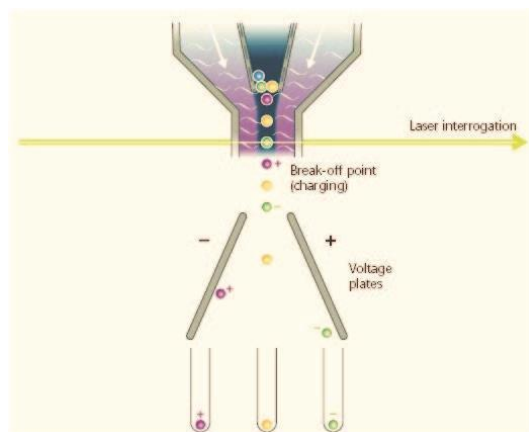
泳道图



血浆/血清



激光捕获显微切割样本 (LCM)



分选肿瘤干细胞/造血干细胞/免疫细胞

适用的样品类型

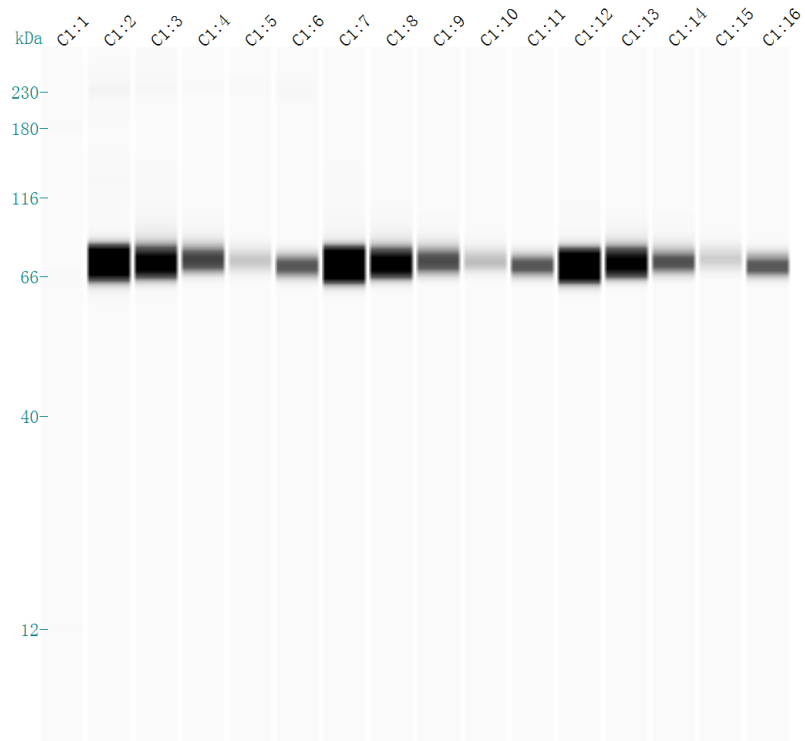


胚胎等稀缺生物医学样本

植物匀浆液、各类组织、重组蛋白等等



高度重复：准确检出弱效结果



Target: DDDDK-protein

Ab dilution: 1:200

Vendor: MBL

Cat: M185-3L

Sample: 293 T

Concentration: 0.025 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

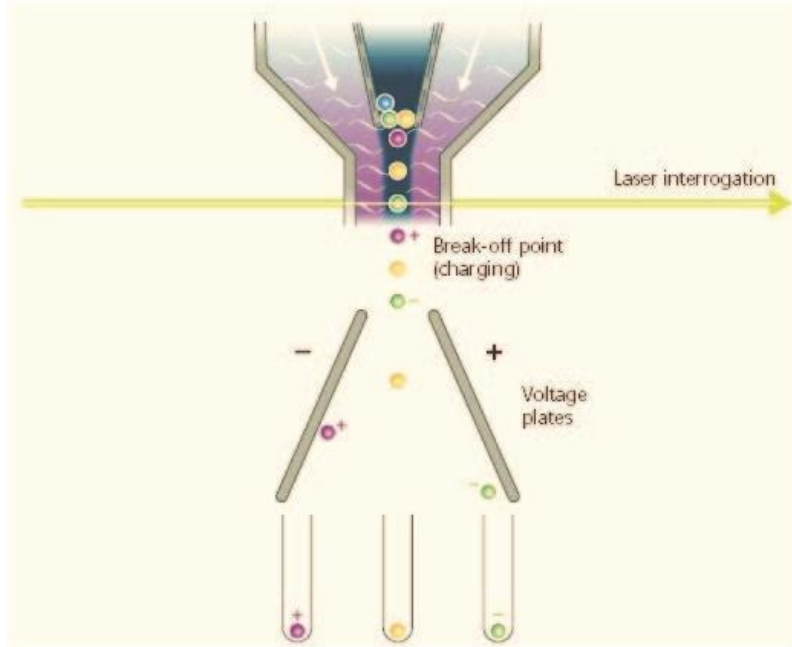


ATM 和 ATR 属于 PIKK 家族是 DNA
损伤检查点的主要成员

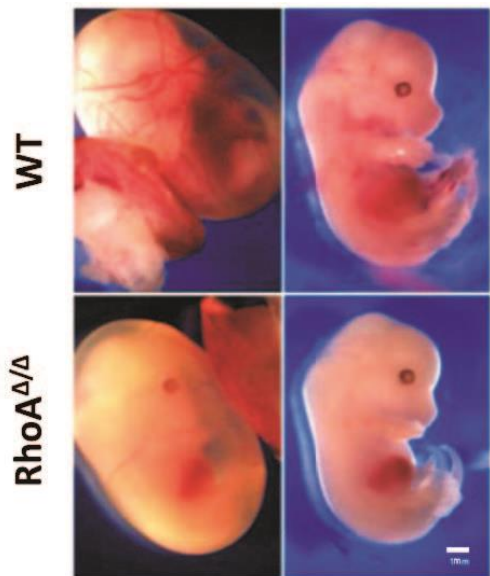




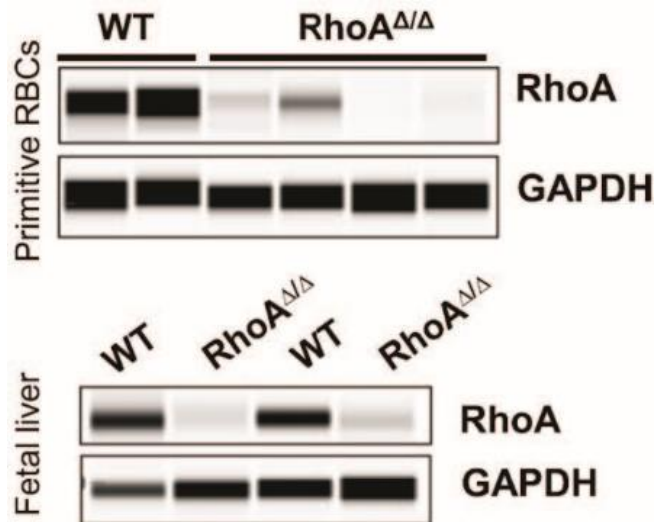
CD34+造血祖细胞



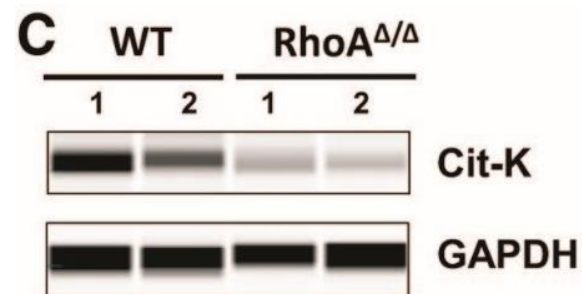
参考文献： Microvesicles from Mesenchymal Stromal Cells Are Involved in HPC-Microenvironment Crosstalk in Myelodysplastic Patients. **PLOS ONE** |
OI:10.1371/journal.pone.0146722 February 2, 2016



影像检测E13.5胚胎鼠卵黄囊和胚胎肝，RhoA缺陷显示明显贫血。

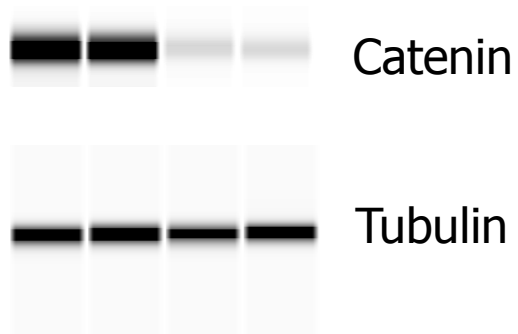


RhoA表达水平



Cit-K表达水平

参考文献：Cytokinesis failure in RhoA-deficient mouse erythroblasts involves actomyosin and midbody dysregulation and triggers p53 activation. *BLOOD*, 17 SEPTEMBER 2015 x VOLUME 126, **NUMBER 12**



Target: Catenin

Ab dilution: 1:50

Vendor: Santa

Cat: sc-7963

Sample: 肺癌细胞
Concentration: 0.3 μ g/ μ L

Lysis Buffer: 普利莱

Target: Tubulin

Ab dilution: 1:500

Vendor: Sigma

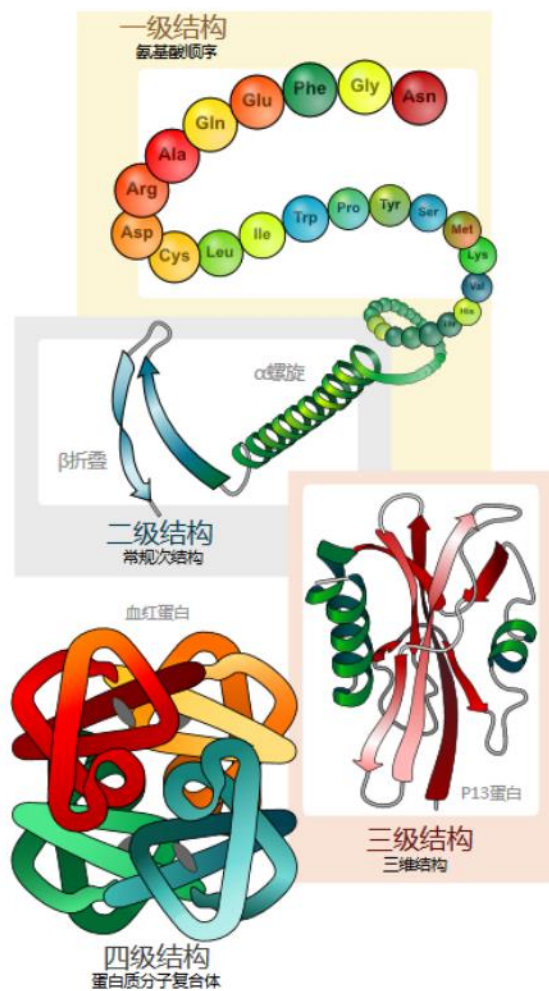
Cat: T9026



二、NanoPro 1000的原理及其应用



蛋白质的翻译后修饰

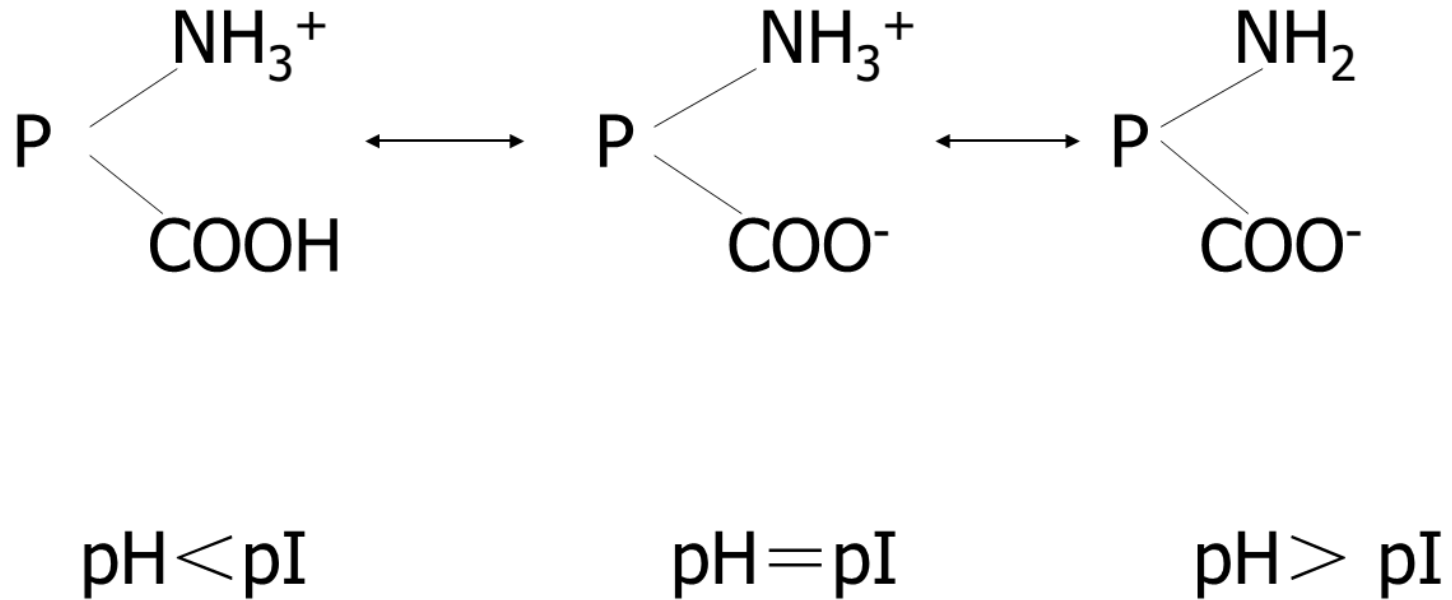


- 磷酸化 49 Da
- 乙酰化 170 Da
- 泛素化 (76AA) 8500 Da
- 甲基化 15 Da
-
- 蛋白质 kDa

这些修饰体往往具有重要的生物学功能，因此是蛋白质功能研究中的热点



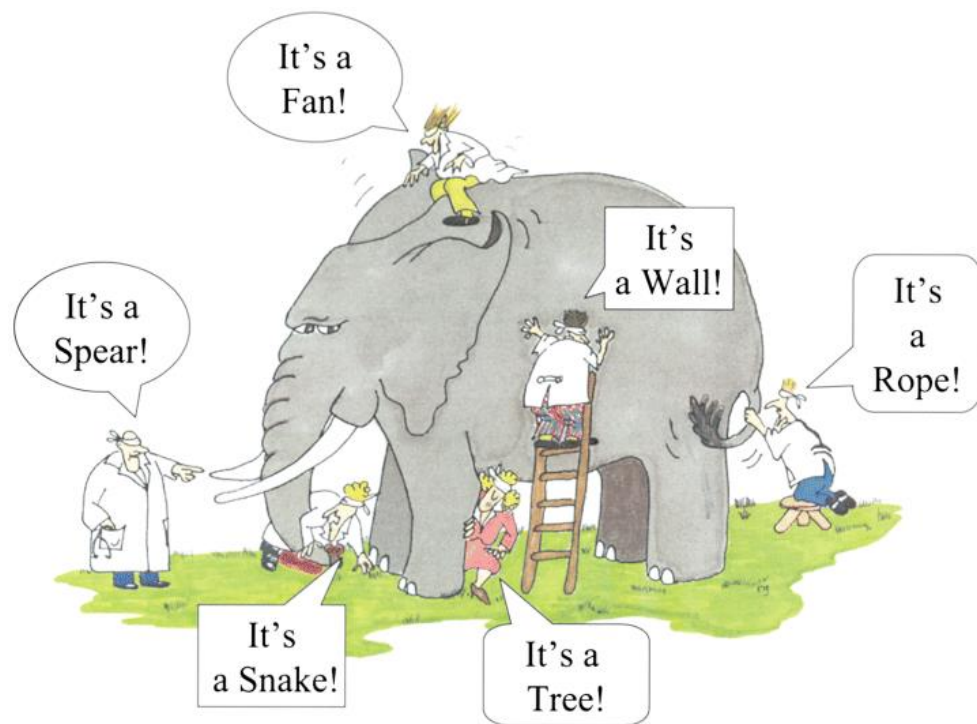
蛋白质的等电点



分辨率可达0.01pH单位，因此特别适合于分离
分子量相近而等电点不同的蛋白质组分



传统检测方法

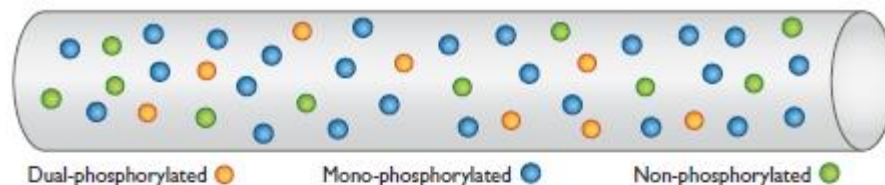


1. 样品用量大
2. 实验周期长
3. 修饰特异性抗体
 - 价格昂贵
 - 不易获得
 - 无法发现新修饰体



Nanopro 1000毛细管等电聚焦分离技术

吸取样品



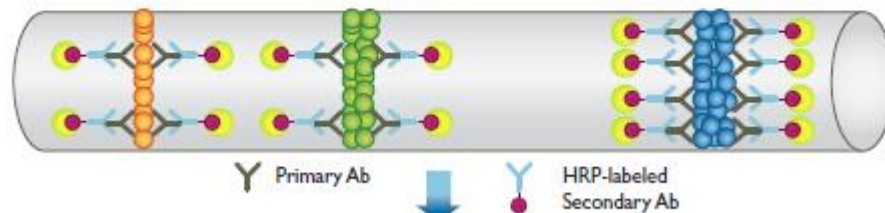
等电聚焦分离



蛋白捕获



全景式检测



化学发光信号值定量

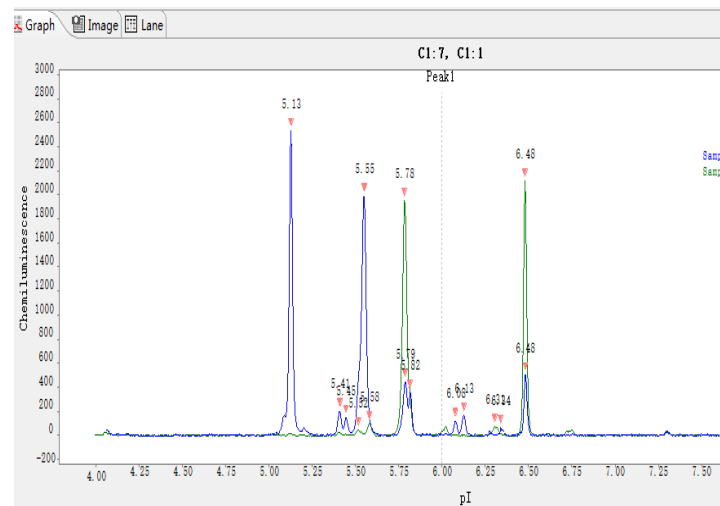
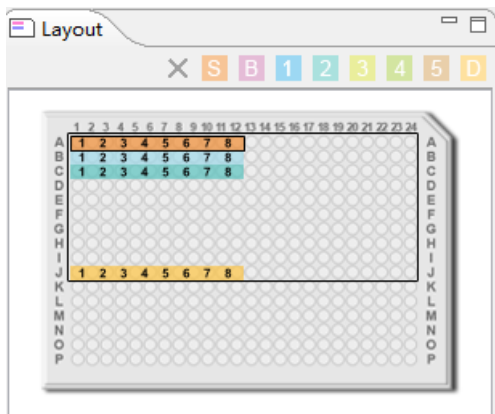


Figure 1-1: NanoPro 1000 system capillary.



全自动

5小时获得定量结果



Sample	Primary	Cap	Peak	Name	Position	pI	Height	Area	% Area	Width	S/N	Baseline
Sample	Prima...	C1:1	1		309	5.519	39.5	300		0.0352	13.2	20.2
Sample	Prima...	C1:1	2		322	5.582	95.4	593		0.0288	34.4	21.1
Sample	Prima...	C1:1	3		363	5.785	1875.1	12583		0.0311	662.5	22.8
Sample	Prima...	C1:1	4	Peak1	412	6.019	65.2	565	100.0	0.0336	19.6	22.0
Sample	Prima...	C1:1	5		482	6.307	69.4	677		0.0378	17.3	19.2
Sample	Prima...	C1:1	6		529	6.480	2075.7	14390		0.0207	726.9	19.5

操作简单

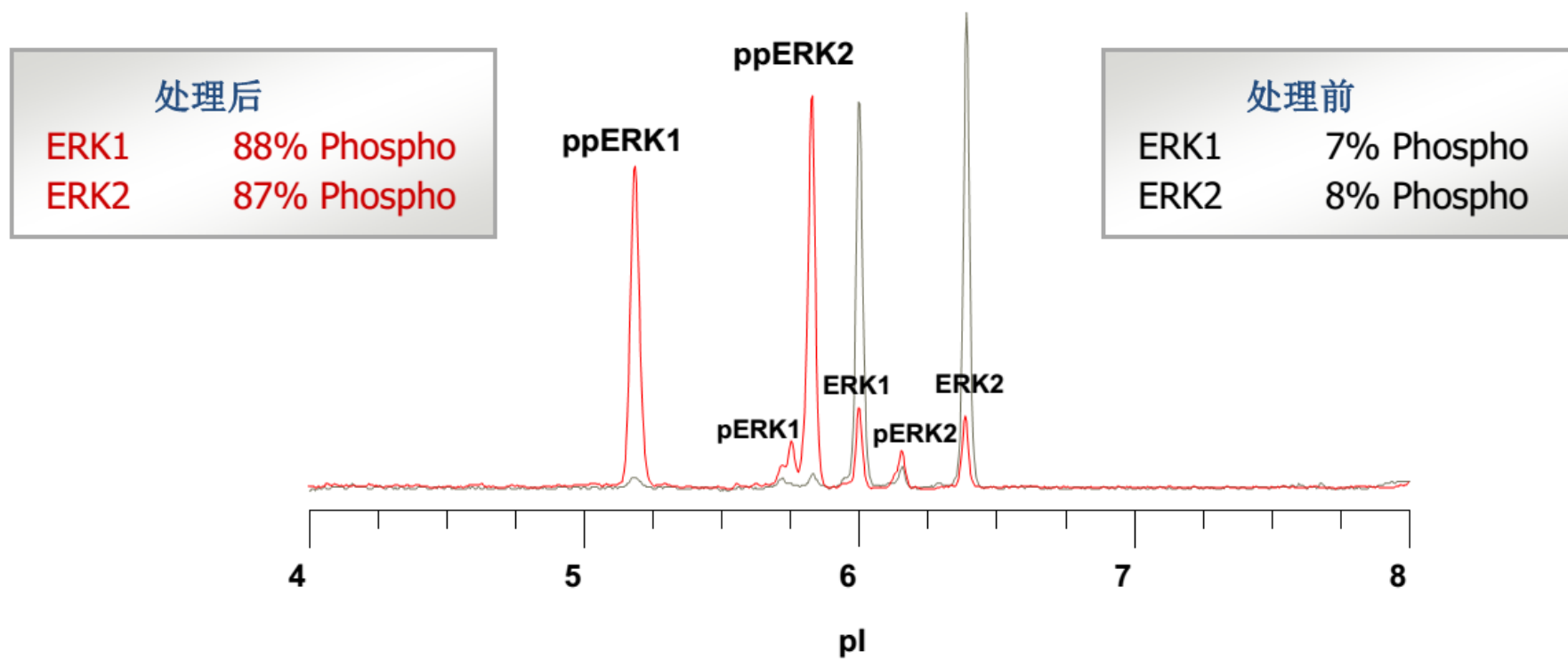
准备样品

点击开始

获得结果



HeLa 细胞对 EGF 处理的反应

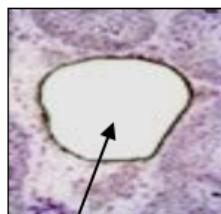
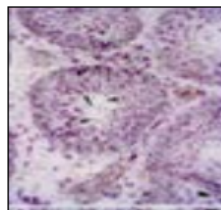




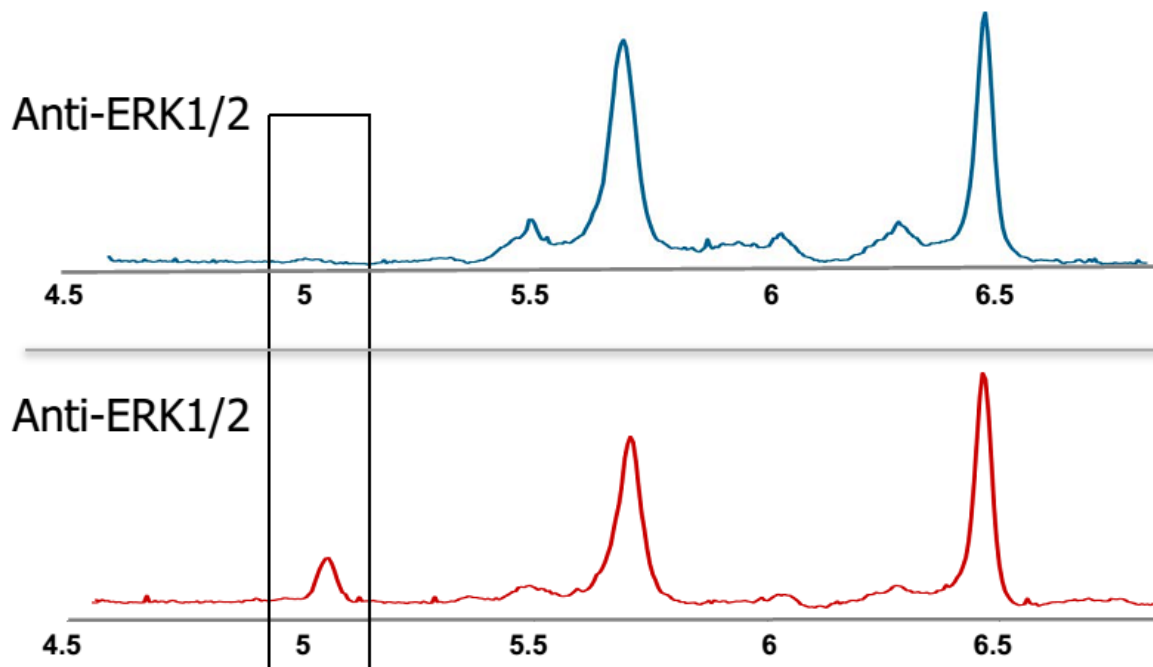
病理切片

分子水平与蛋白水平的完美结合

LCM 样品



切取200个
肿瘤细胞



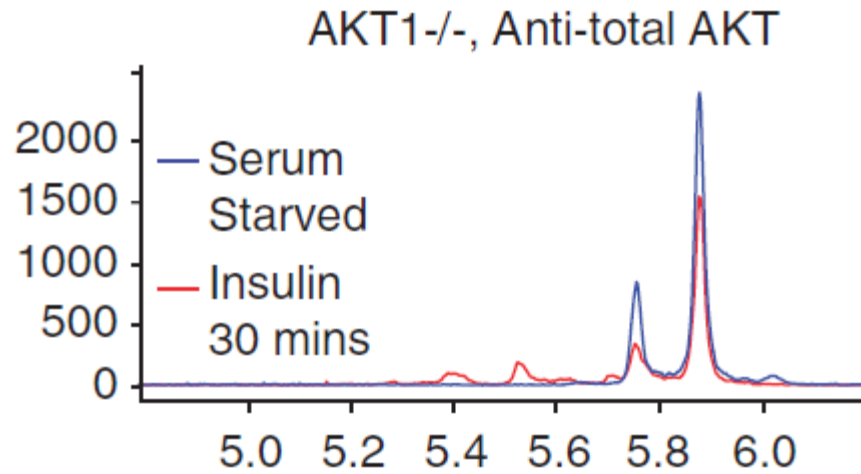
K-RAS
突变
患者

K-RAS
野生型
患者

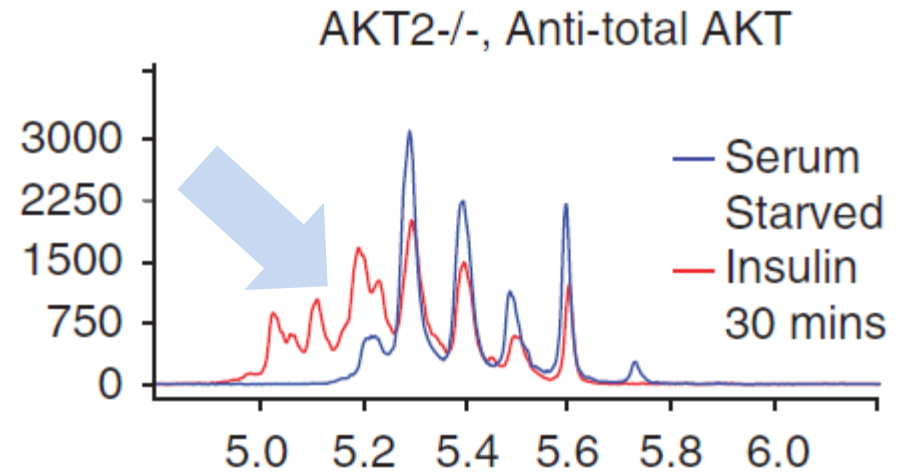
K-RAS是RAS基因
家族成员之一，
编码K-ras蛋白



Insulin 处理后 AKT 的变化



AKT2-specific peaks detected



AKT1-specific peaks detected

参考文献： Coordinate phosphorylation of multiple residues on single AKT1 and AKT2 molecules. *Oncogene* 2013 Aug



三、Milo单细胞WB的原理及其应用

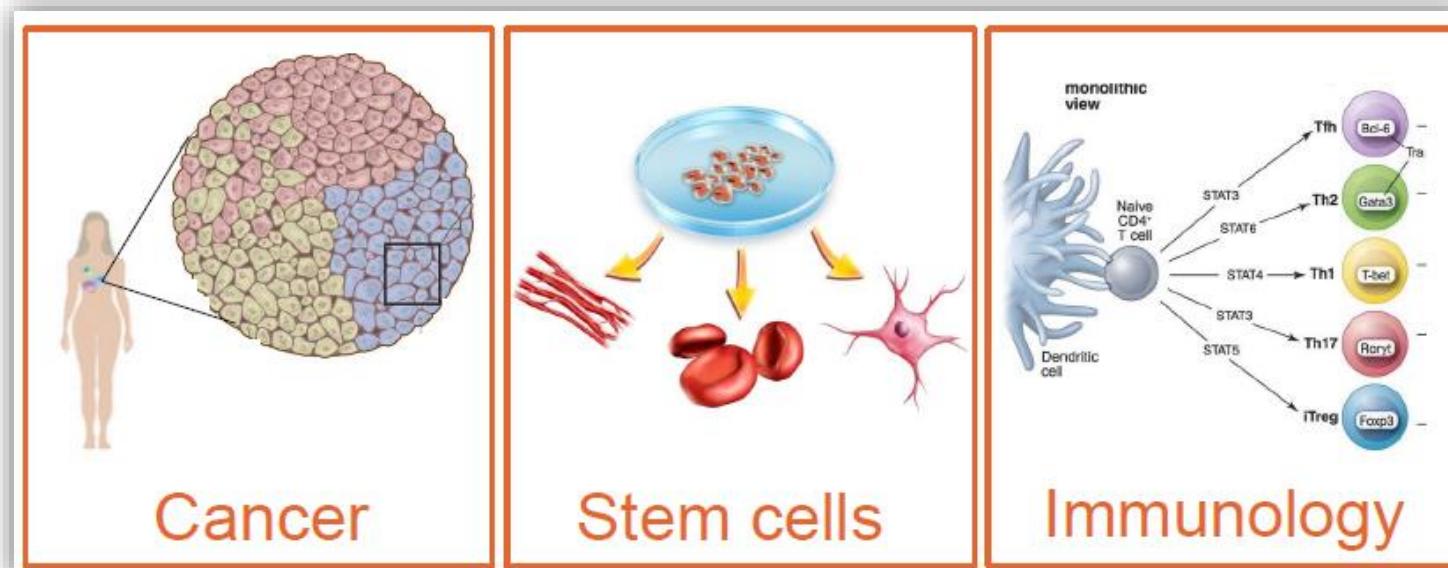


细胞异质性

肿瘤细胞异质性：肿瘤耐药基础+肿瘤恶性标志

干细胞异质性：干细胞分化发育基础

免疫细胞异质性：免疫状态及免疫应答基础





细胞异质性研究需要单细胞分析技术

nature

Single-cell analysis reveals a stem-cell program in human metastatic breast cancer cells

Devon A. Lawson, Nirav R. Bhakta, Kai Kessenbrock, Karin D. Prummel, Ying Yu, Ken Takai, Alicia Zhou, Henok Eyob, Sanjeev Balakrishnan, Chih-Yang Wang, Paul Yaswen, Andrei Goga & Zena Werb

Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development

Marc A. Gavin^{*1}, Troy R. Torgerson^{**2}, Evan Hoey[†], Elizabeth L. Ocheltree[‡], Philip D. Greenberg^{*1,†}

^{*}Department of Immunology and [§]Howard Hughes Medical Regional Medical Center, Seattle, WA 98105; [¶]Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA 98105; ^{||}Rikshospitalet University Hospital, N-0027 Oslo, Norway

Edited by Richard A. Flavell, Yale University School of Medicine

Cell Stem Cell

Volume 13, Issue 1, 3 July 2013, Pages 23–29

Brief Report

Single-Cell Analysis Reveals that Expression of Nanog Is Biallelic and Equally Variable as that of Other Pluripotency Factors in Mouse ESCs

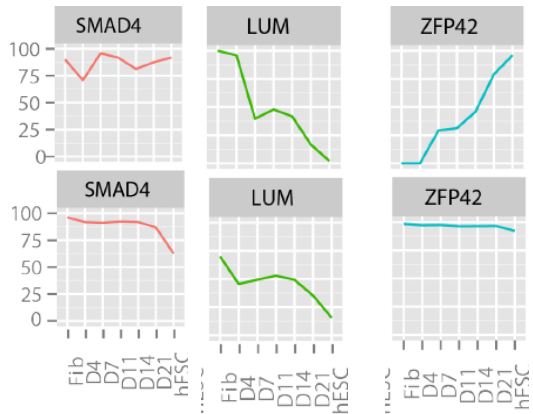
Dina A. Faddah^{1,2}, Haoyi Wang¹, Albert Wu Cheng^{1,3}, Yarden Katz^{1,4}, Yosef Buganim¹, Rudolf Jaenisch^{1,2}

[Show more](#)



现有研究手段

基因水平 ≠ 蛋白水平

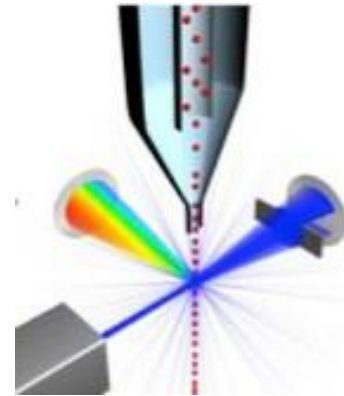


RNA

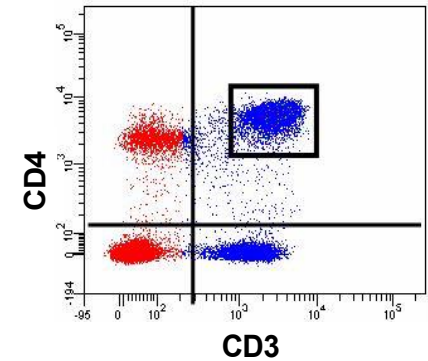
Protein



单细胞测序



流式细胞术

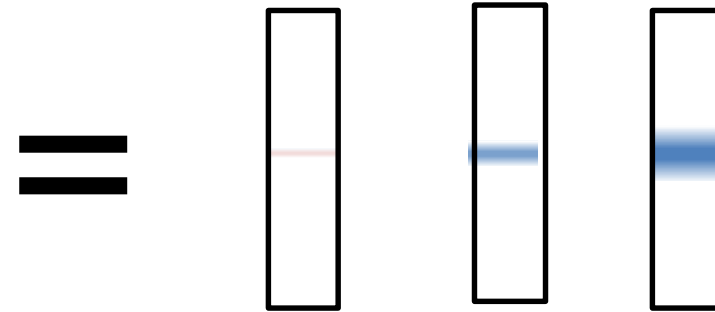
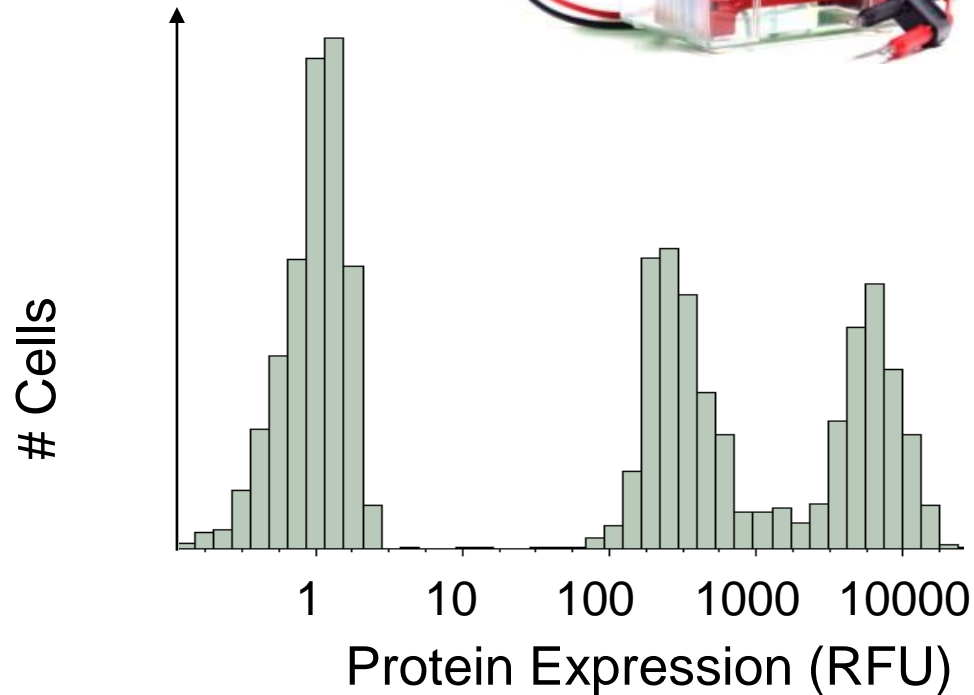
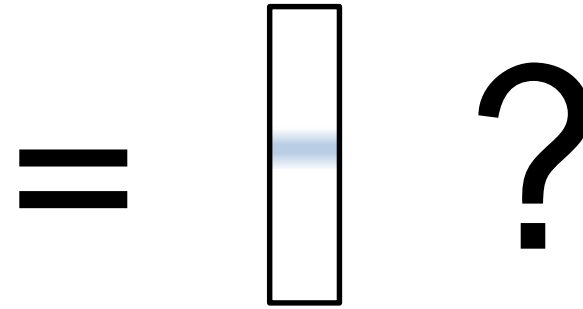
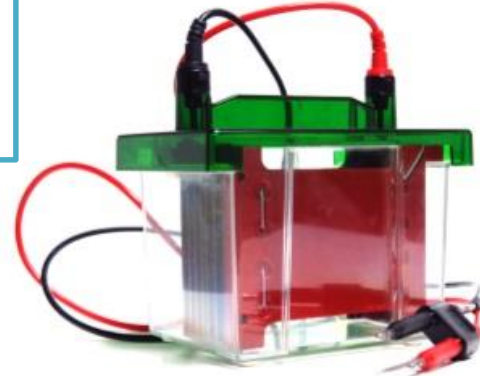


- 胞内蛋白检测操作难度大
- 抗体来源受限：很多靶蛋白没有流式验证抗体



Western Blot检测技术局限

传统Western Blot
无法进行细胞蛋白
表达异质性检测



单细胞western blot 检测
细胞蛋白质表达**异质性**



Milo单细胞western blot系统



基于western蛋
白质检测

+

异质性信息



Milo单细胞平台组成

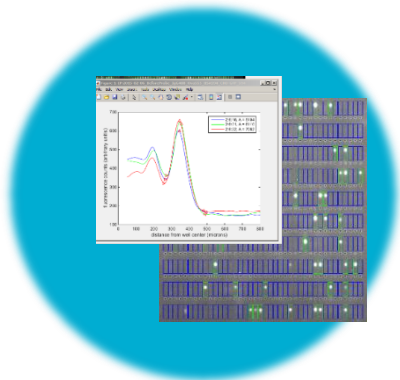
全自动电泳分离系统



scWest Kits



Scout Software

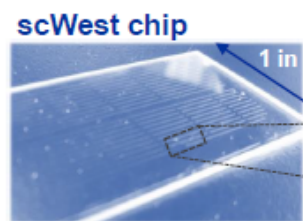


蛋白表达信号采集系统

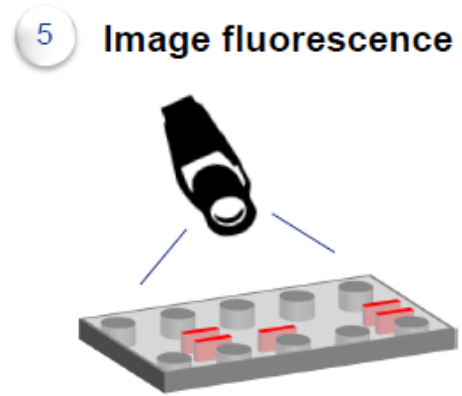
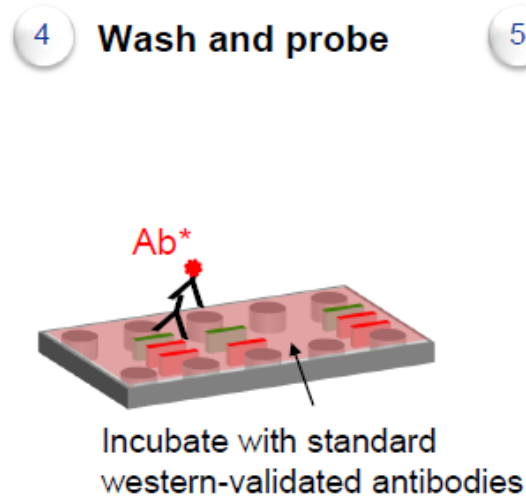
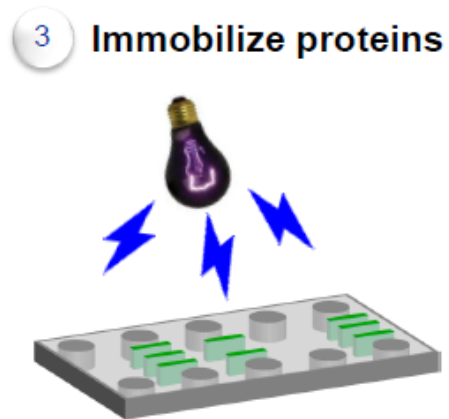
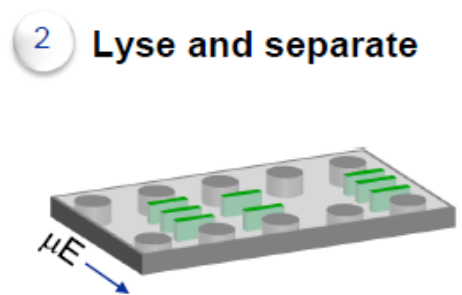
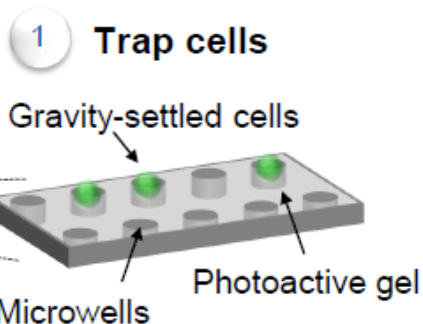




Milo工作过程

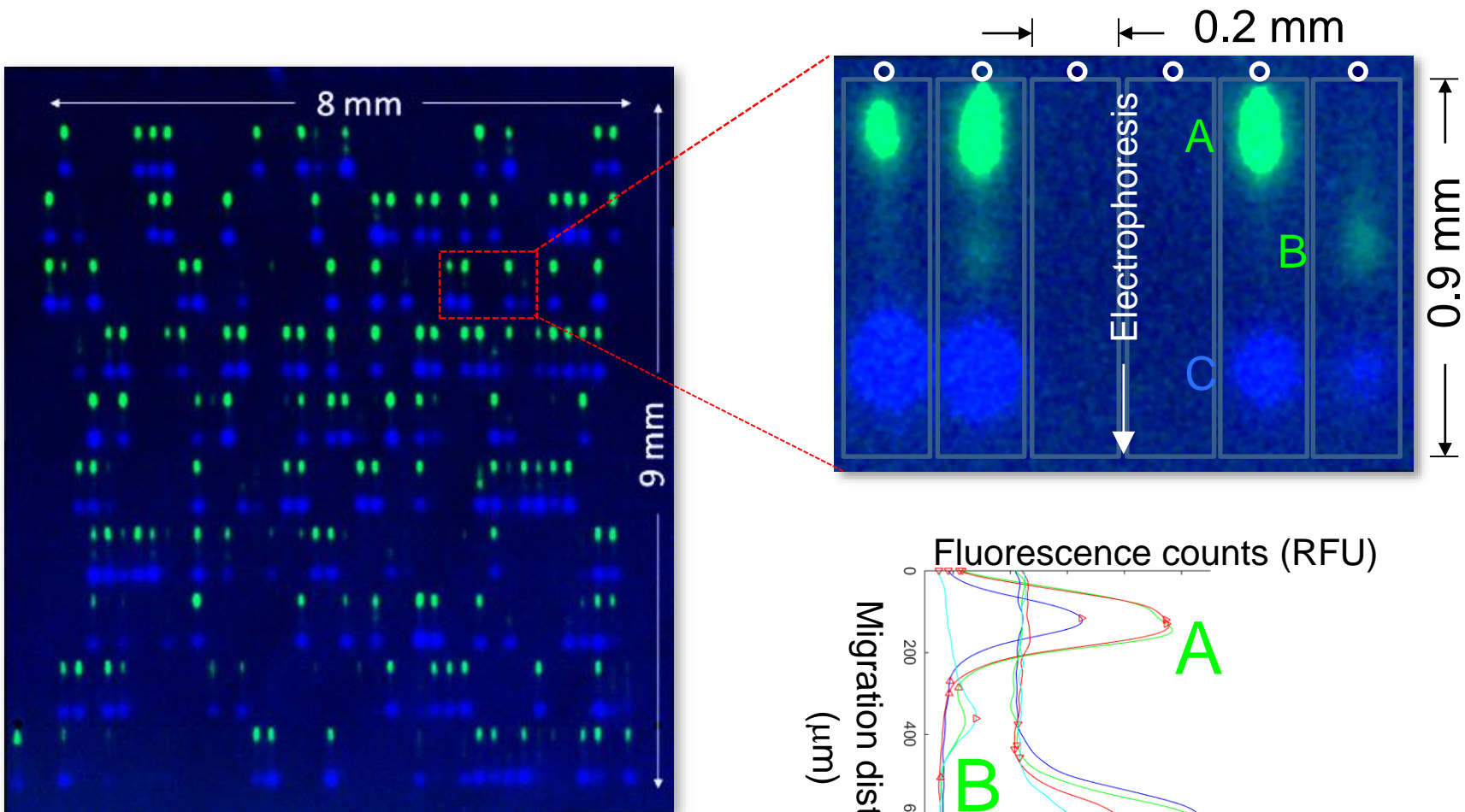


单次约1000
个单细胞WB





单细胞蛋白电泳分离

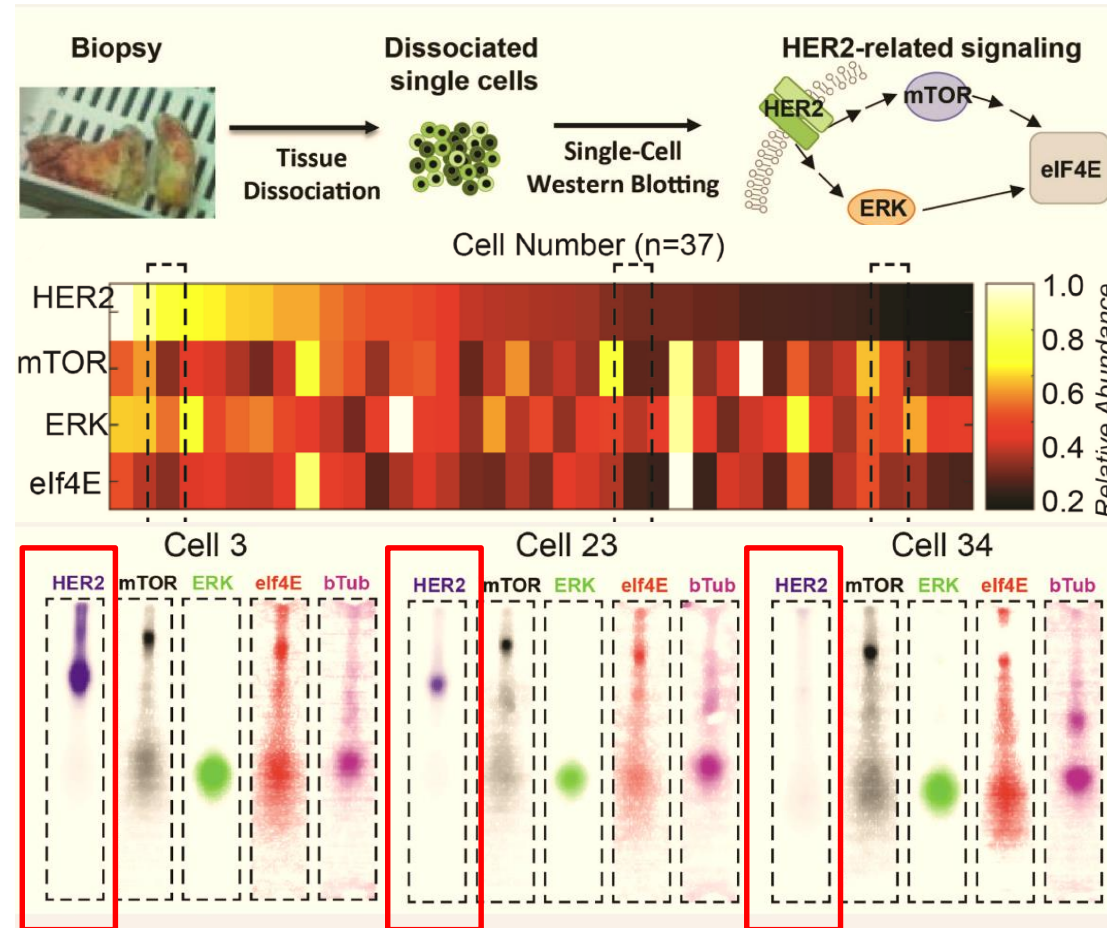


1/16th of scWest chip

蛋白质电泳分离提高特异性



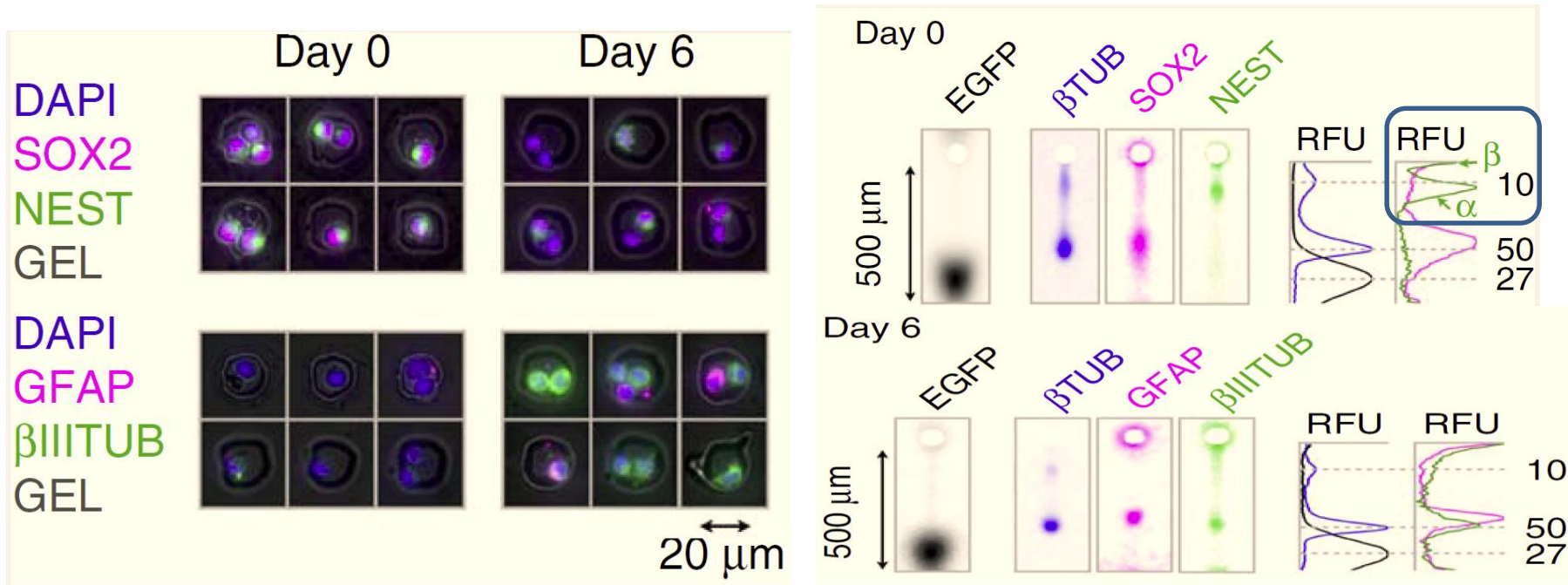
肿瘤组织细胞异质性分析



HER2+ 肿瘤细胞异质性



神经干细胞异质性



Milo单细胞孔进行免疫细胞荧光

Milo单细胞western blot检测

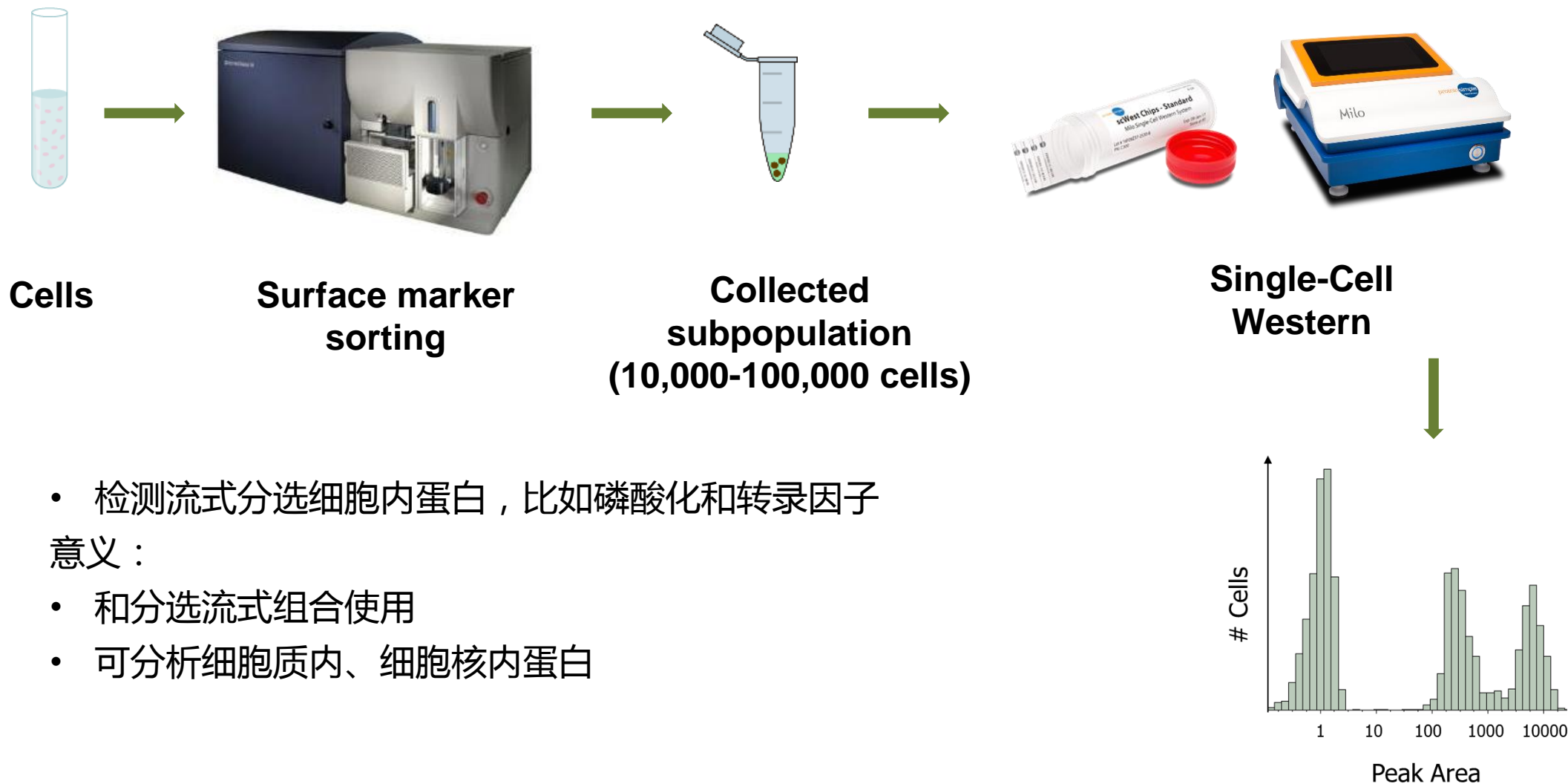
Day 0: 神经干细胞SOX2+, NEST+

Day 6: 神经干细胞比例从90%下降为40%，40%分化为神经元，7%星形胶质细胞

Nature method



Milo和分选流式细胞仪组合使用



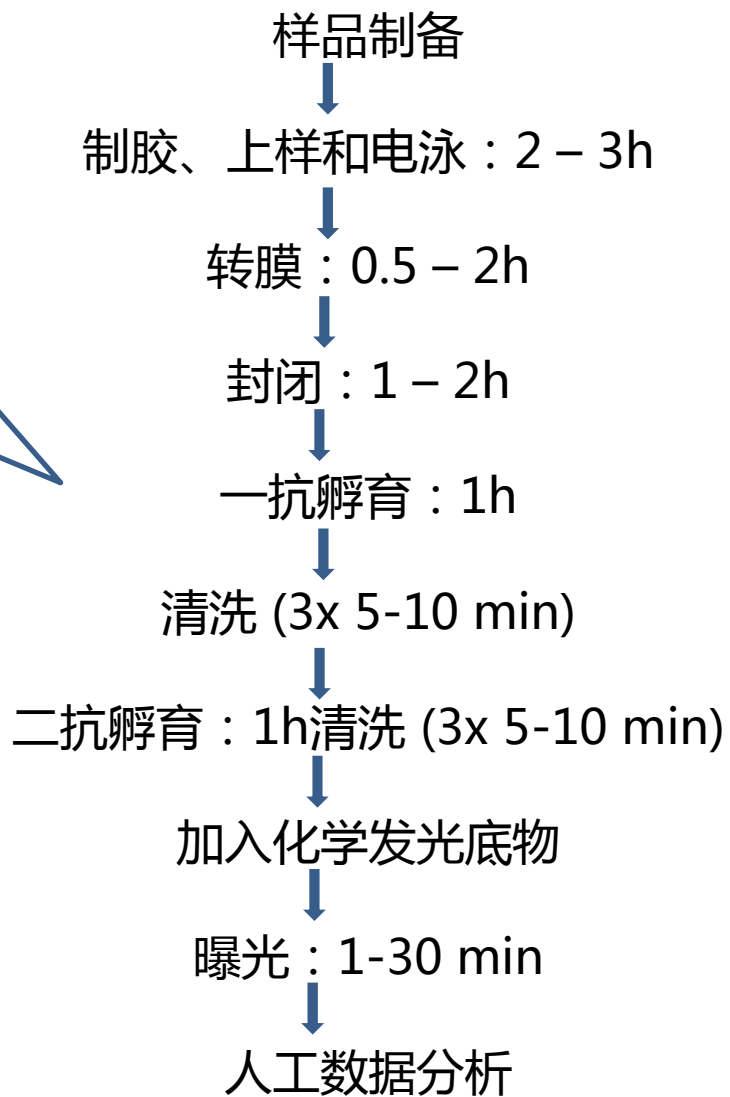


中国科学院 水生生物研究所
CHINESE ACADEMY OF SCIENCES

四、总结



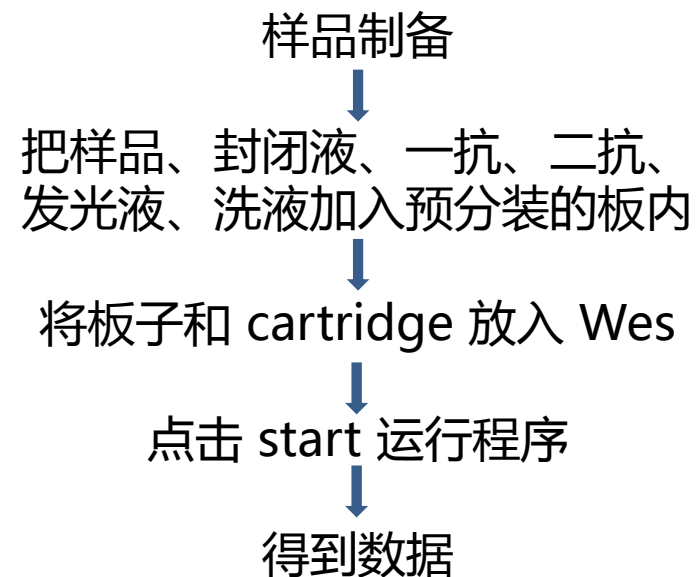
传统 Western



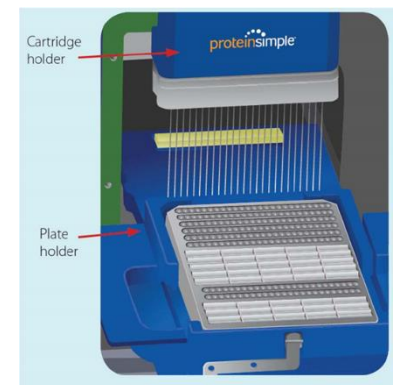
24h或更长时间

节省您的宝贵时间

Simple Western



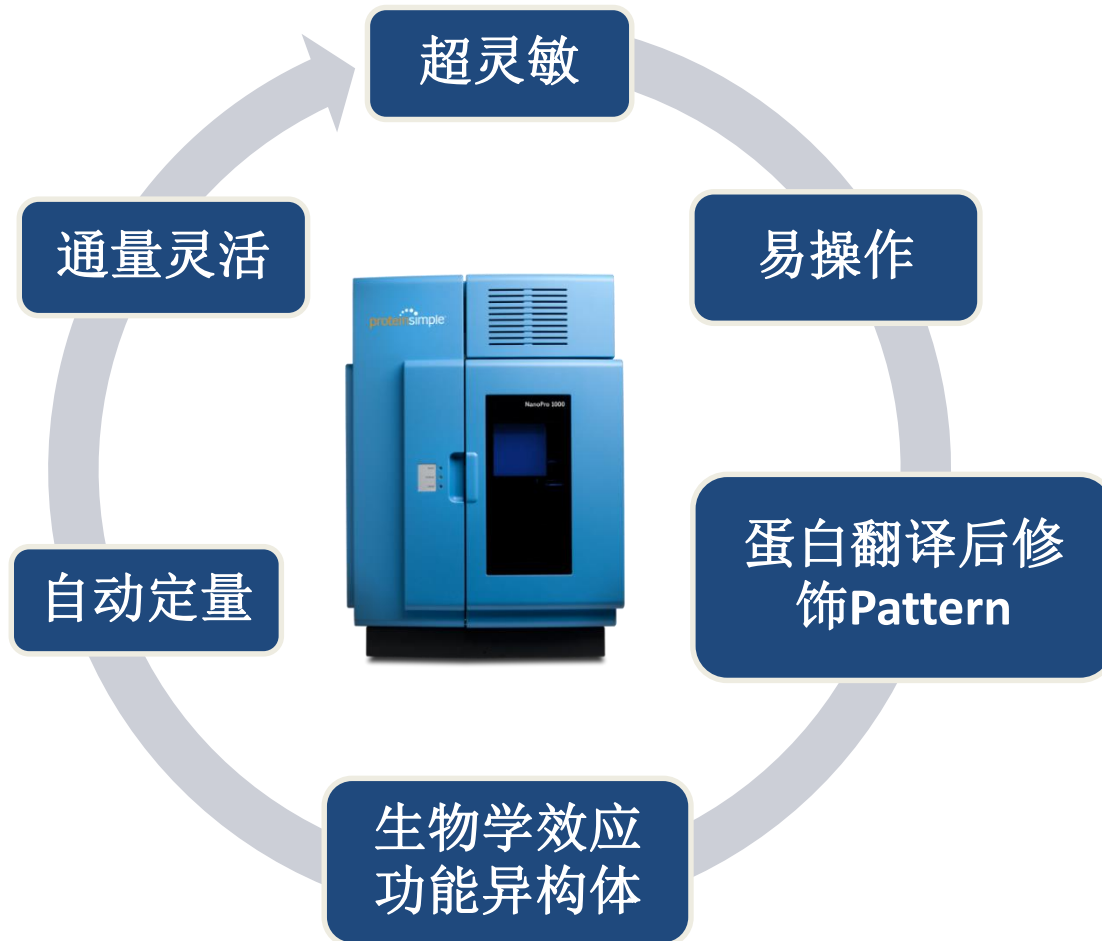
上机3小时





NanoPro 1000特点

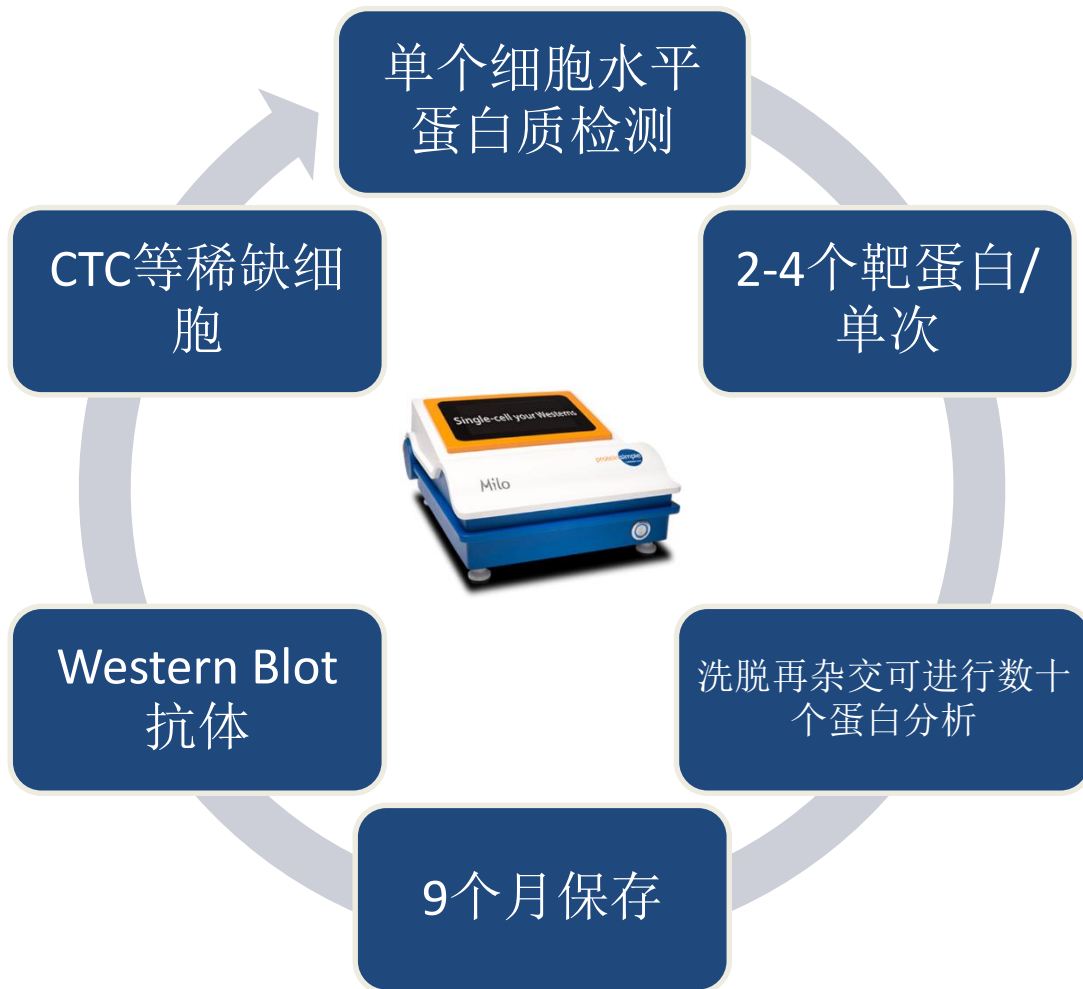
蛋白翻译后修饰





Milo特点

细胞
异
质
性





使用单位

2	科研	华东	1	复旦大学医学院病理系
3	工业	华东	2	睿智化学
4	科研	华东	3	滨州医学院
5	科研	华北	4	哈尔滨医科大学生物化学与分子生物学教研室
6	科研	华北	5	哈尔滨医科大学生物化学与分子生物学教研室
7	科研	华北	6	哈尔滨医科大学地病中心中心实验室
8	科研	华南	7	西南医院病理学（第三军医大学第一附属医院）
9	科研	华北	8	第四军医大学基础部生化与分子生物学教研室
10	科研	华东	9	江苏师范大学生科院
11	科研	华东	10	江苏师范大学生科院
12	科研	华东	11	南京中医药大学
13	科研	华东	12	南京中医药大学
14	科研	华南	13	中科院昆明动物所
15	科研	华南	14	广东医学院
16	科研	华东	15	南京农业大学动物科学院
17	科研	华东	16	瑞金医院血液病研究所
18	科研	华北	17	河南省立眼科医院
19	科研	华东	18	仁济医院干细胞研究中心
20	科研	华东	19	山东大学生殖医学研究中心
21	科研	华北	20	国家计量院
22	科研	华北	21	西安医学院
23	科研	华东	22	红房子医院妇产科研究所
24	科研	华北	23	国家计量院
25	科研	华南	24	西南医院烧伤科

26	科研	华南	25	西囡妇科医院基础实验室
27	科研	华南	26	中国医学科学院医学生物学研究所
28	科研	华南	27	昆明学院医学院
29	科研	华南	28	华中师范大学
30	科研	华南	29	广州医科大学（原广州医学院）
31	科研	华北	30	山西农业大学
32	科研	华南	31	广东省中医院
33	科研	华东	32	中国水产科学研究院淡水渔业研究中心
34	科研	华东	33	青医附院
35	科研	华南	34	江西中医药大学
36	科研	华南	35	广州中医药大学骨科重点实验室
37	科研	华北	36	北京市农林科学院
38	科研	华北	37	医科院血研所
39	科研	华南	38	中山大学口腔医学研究所
40	科研	华北	39	中科院微生物所蛋白质平台
41	科研	华北	40	国家纳米科学中心
42	科研	华北	41	新疆维吾尔医学专科学校
43	科研	华东	42	蚌埠医学院
44	科研	华北	43	中国检科院卫生检疫研究所
45	科研	华南	44	广东省中医院
46	科研	华南	45	中科院水生所分析测试中心
47	科研	华南	46	中科院水生所分析测试中心
48	科研	华东	47	上海市肿瘤研究所公共仪器平台
49	科研	华北	48	医科院药植所药用植物种质资源库



273	工业	华南	272	四川海思科制药有限公司
274	科研	华南	273	武汉大学生命科学学院病毒学实验室
275	工业	华东	274	天演药业（苏州）有限公司
276	科研	华南	275	南昌大学食品学院
277	科研	华南	276	华中农业大学园艺植物生物学教育部重点实验室
278	科研	华北	277	内蒙古民族大学医学院
279	科研	华南	278	广州再生医学与健康广东省实验室
280	科研	华南	279	广西师范大学国家重点实验室2号楼生物医学研究中心309
281	科研	华北	280	天津中医药大学中药学院
282	工业	华东	281	上海勃林格殷格翰动保研发中心
283	科研	华南	282	贵州大学精细化工中心
284	科研	华东	283	生态环境部南京环境科学研究所
285	科研	华北	284	天津科技大学食品科学与工程学院407
286	科研	华北	285	内蒙古医科大学蒙药研究院
287	科研	华东	286	青岛大学分子诊断与再生医学实验室
288	科研	华东	287	浙江省中医药研究院
289	科研	华北	288	军科院
290	科研	华北	289	郑州大学第一附属医院医学研究中心
291	科研	华南	290	深圳中山泌尿外科医院临床研究中心
292	科研	华北	291	中国科学院动物研究所
293	科研	华北	291	中国科学院动物研究所
294	科研	华北	292	中国农科院质标所风险评估室
295	科研	华北	293	中国中医科学院中医基础理论研究所
296	科研	华北	294	中国农业科学院植保所仪器平台（5号楼403）



核心成员及服务内容



陈希，武汉大学博士，高级工程师，蛋白质组学技术专家，在蛋白质组及生物质谱领域有**14年专业积淀**，发表SCI论文30余篇，申请发明专利5项，实用新型专利2项，软件著作权8项，主持多项国家及省市基金。



王敏，中国药科大学硕士，实验师，具有丰富的液质管理经验，能够**熟练操作使用多种液质系统及进行相关维护**，熟练掌握蛋白质样品提取、胶内酶解、溶液内酶解、肽段脱盐、分离等样品前处理方法。



贾书召，华中农业大学硕士，助理工程师，主要负责**蛋白质组样本前处理、质谱上机、数据分析等**，在鉴定蛋白质组学、定量蛋白质组学、蛋白质的翻译后修饰及其定量等研究领域积累了大量经验。

<p>胶内蛋白质鉴定</p>	<p>SDS-PAGE电泳得到的条带，经胶内酶解后用于质谱分析以获得蛋白质信息。此外，蛋白的翻译后修饰位点（如磷酸化、泛素化、乙酰化等）也可以通过该方法进行检测。</p>
<p>溶液内蛋白质鉴定</p>	<p>复杂的全细胞裂解液、IP洗脱液、蛋白纯化产物，通过质谱检测，可以得到样品中蛋白的鉴定结果。</p>
<p>非标记定量蛋白质组学分析</p>	<p>无需标记，操作简单，不受比较样品数限制。对实验过程的操作和质谱仪的状态要求较高。</p>
<p>标记定量蛋白质组学分析</p>	<p>目前基于标记的定量蛋白质组学方法可分为化学标记和代谢标记。常用的化学标记如TMT、iTRAQ、Dimethylation；代谢标记通常指SILAC。可同时比较多组样品之间的蛋白表达量。</p>
<p>磷酸化位点鉴定和定量分析</p>	<p>蛋白质磷酸化修饰是生物体内普遍存在的调节机制。目前，基于IMAC/TiO₂的磷酸化肽段富集技术，结合高通量液相色谱质谱联用技术，成为高通量定性和定量研究蛋白质磷酸化修饰的最有效手段。</p>



谢谢

欢迎来中心技术交流

蛋白质组学平台咨询：

陈 希 13517294773

王 敏 13387651430

贾书召 15827113841