

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.21.011

Western blot 免疫印迹法检测磷酸化蛋白表达条件优化研究*

韩晓杰 段婷婷 庞雨 徐玉东 王宇 杨永清[△] 尹磊森[△]

(上海中医药大学 上海 201203)

摘要 目的:探讨 Western blot 免疫印迹法不同转膜方法和不同抗原抗体比例对磷酸化蛋白表达的检测效果。**方法:**选择肌球蛋白轻链(myosin light chain, MLC)及其磷酸化蛋白作为研究对象,比较半干转印法、湿转法和 1:3000、1:5000、1:10000 等抗体稀释比例对磷酸化蛋白检测效果的影响。**结果:**半干转印法(恒压 16V, 30 min)观察到蛋白信号断续;而同样样品利用湿转法(恒压 130 V, 1 h)检测发现信号连续且强度明显增高;对于磷酸化蛋白,半干转印法无法观察到磷酸化蛋白信号;而同样样品湿转法检测出现连续信号。统一利用湿转方法进行后续蛋白磷酸化检测,当抗体稀释比为 1:3000 时,结果出现非特异性条带;降低抗体稀释比为 1:5000 时无非特异性条带,且蛋白信号效果较好;抗体稀释比为 1:10000 时条带图像出现弥散且背景较高。**结论:**选择合适的转膜方式和抗原抗体比例有助于磷酸化蛋白表达检测。

关键词:蛋白质免疫印迹法;半干转印;湿转;抗原抗体比例

中图分类号:R446.6 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2017)21-4047-04

Optimization Research on the Western Blot Experimental Conditions for Detecting Phosphorylated Protein*

HAN Xiao-jie, DUAN Ting-ting, PANG Yu, XU Yu-dong, WANG Yu, YANG Yong-qing[△], YIN Lei-miao[△]

(Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, 201203, China)

ABSTRACT Objective: Using different transfer methods and antigen-antibody dilution proportion to investigate the detection effects of Western blot on phosphorylated protein. **Methods:** Myosin light chain (MLC) and corresponding phosphorylated protein were chosen in the study. The conditions of different transfer methods (semi-dry transfer and wet transfer methods) and antigen-antibody dilution proportion (1: 3000, 1: 5000, 1: 10000) were compared. **Results:** The signals of β -actin and MLC from semi-dry transfer method (16 V, 30 min) were discrete. However, signals from wet transfer method (130 V, 1 h) were continuous and significantly stronger while using the same sample. There was no signal for the phosphorylated protein using semi-dry transfer method. The same sample showed a continuous signal using wet transfer method. Wet transfer method was applied for subsequent phosphorylated protein detection. Non-specific bands showed up when antigen-antibody dilution proportion was 1: 3000. Correct band showed up and non-specific bands disappeared when antigen-antibody dilution proportion was 1: 5000. The bands were diffused and background was high when antigen-antibody dilution proportion was 1: 10000. **Conclusion:** Choosing appropriate transfer methods and antigen-antibody dilution proportion can contribute to the detection effects of phosphorylated protein using Western blot.

Key words: Western blot; Semi-dry transfer method; Wet transfer method; Antigen-antibody dilution proportion

Chinese Library Classification(CLC): R446.6 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)21-4047-04

前言

蛋白质免疫印迹技术(Western Blot)是重要的细胞分子生物学实验研究技术,基本步骤是根据蛋白质分子量大小、先用凝胶 SDS-PAGE 电泳分离蛋白质样品^[1,2],通过蛋白特异性抗体识别目的蛋白或者特定蛋白磷酸化位点,最终通过分析抗原抗体结合位置和信号强度获得目的蛋白在样品中表达情况。Western Blot 常用于蛋白质表达半定量和蛋白磷酸化表达状态

检测^[3-6],主要关键点包括转膜和抗原抗体比例^[7]。

Western Blot 实验中有半干转和湿转两种不同转膜方法,二者原理相同,都是基于蛋白在电场力作用下在 SDS-PAGE 凝胶中定向转移原理,但用于固定胶、膜叠层和施加电场的机械装置不同^[7]。Western Blot 另外一个关键点是特异性抗体对特定抗原的有效识别。抗体识别蛋白特异性位点的过程是一个抗原抗体反应,只有当抗原和抗体比例适当时才出现最大反应,因此需要为特定抗原量(即蛋白量)选择合适的一抗稀释比例^[8,9]。

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81473760;81574058);上海市卫生系统优秀青年人才培养计划(XYQ2013081);

上海市中医药事业发展三年行动计划重大项目(ZY3-CCCX-3-3005);上海市人才发展资金(201610)

作者简介:韩晓杰(1989-),女,硕士研究生,研究方向:针刺抗哮喘机制研究,电话:021-54592134, E-mail: hxjholly@163.com

[△] 通讯作者:杨永清,电话:021-54592134, E-mail: collegeym@shutcm.edu.cn, 电话:021-54592134, E-mail: yyq@shutcm.edu.cn;

尹磊森,电话:+86-21-54592134, E-mail: collegeym@shutcm.edu.cn, 电话:+86-21-54592134, E-mail: yyq@shutcm.edu.cn

(收稿日期:2016-11-02 接受日期:2016-12-12)

本研究拟采用分子量 18kD 的肌球蛋白轻链 (myosin light chain, MLC) 及其磷酸化蛋白作为研究对象, 比较不同转膜方法, 不同抗体稀释比例对该蛋白及磷酸化表达检测效果的影响, 以期为进一步深入研究蛋白磷酸化机制提供技术参数支持。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

十二烷基硫酸钠(SDS)、过硫酸铵(APS)、四甲基乙二胺(TEMED)、三羟甲基氨基甲烷 (Tris), 30%凝胶储备液, 10× SDS-PAGE 电泳缓冲液购自美国 Bio-Rad 公司, 甘氨酸(Glycine), 盐酸(HCl), 十二水合磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$), 磷酸二氢钾(KH_2PO_4), 氯化钠(NaCl), 氯化钾(KCl)购自国药集团化学试剂, 6× SDS 上样缓冲液、BSA 牛血清白蛋白购自中国碧云天公司, 蛋白质分子量预染 Marker 购自美国 Thermo Fisher 公司; PVDF 膜(孔径 0.2 μm), 小型垂直电泳槽, 半干转

印仪, 小型 Mini Trans-Blot 转印槽, ChemiDoc XRS 凝胶成像系统均购自美国 Bio-Rad 公司; 实验室 pH 计购自瑞士 Mettler Toledo 公司, 干式恒温器(DTH-100)购自中国杭州米欧仪器公司。

肌球蛋白轻链抗体(Myosin Light Chain, 货号 #8505s)、肌球蛋白轻链磷酸化抗体 (Phospho-Myosin Light Chain, 货号 #3674s)、 β -肌动蛋白(β -Actin, 货号 #4970s)、抗兔 IgG(Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody, 货号 #7074s) 购自美国赛信通 (CST) 公司; 肌球蛋白轻链磷酸化抗体 (Phospho-Myosin light chain, 货号 #ab2480) 购自英国艾博抗(Abcam)公司, 显影试剂 (SuperSignal™ West Dura Extended Duproportionn Substrate#34075) 购自美国赛默飞世尔(Thermo fisher)公司。

1.2 溶液配制

1.2.1 分离胶、浓缩胶缓冲液的配制 按照下表(表 1)配制分离胶、浓缩胶缓冲液, 利用实验室 pH 计将溶液 pH 值调至相应值, 并用去离子水(ddH_2O)定容至 100 mL, 棕色瓶 4℃ 保存备用。

表 1 分离胶、浓缩胶缓冲液的配制

Table 1 Preparation of Buffers of Resolving/Stacking Gel

Solution name	Tris	ddH_2O	pH
Separating gel Buffer	18.05 g	100 mL	8.8
Stacking gel Buffer	6.0 5g	100 mL	6.8

1.2.2 Tris-SDS-PAGE 电泳凝胶的配制 根据实验所需胶浓度配制如下溶液(表 2), 混匀后用 1 mL 加样枪将分离胶均匀灌入组装好的电泳玻璃胶架中, 每板 3 mL, 后加入双蒸水依次封闭各层胶面, 当胶与水出现清晰界限表明聚合已经完成, 待胶聚合后用滤纸吸干上层的水分, 继续浓缩胶的灌制, 并即刻垂直插入梳子, 室温聚合。

表 2 Tris-SDS-PAGE 电泳凝胶的配制

Table 2 Preparation of Tris-SDS-PAGE Gel

Solution name	Separating gel (12%)	Stacking gel (5%)
ddH_2O	4.8 mL	5.5 mL
Separating gel Buffer	3.8 mL	-
Stacking gel Buffer	-	1 mL
Acrylamide	6 mL	1.3 mL
10% SDS	0.15 mL	0.1 mL
10% APS	0.15 mL	0.1 mL
TEMED	15 μL	10 μL

1.2.3 Tris-甘氨酸转移缓冲液的配制 按照表 3 配制转移缓冲液, 并用去离子水(ddH_2O)加至总体积 1 L, 混匀后室温保存备用。

表 3 Tris-甘氨酸转移缓冲液配制

Table 3 Preparation of Tris-glycine transfer buffer

Compositions	Content
Glycine	14.4 g
Tris	3.02 g
Methanol	200 mL
ddH_2O	Add total volume 1L

1.2.4 10× PBS 溶液配制 按照表 4 配制 10× PBS 溶液配

制, 实验室 pH 计将溶液 pH 值调至 7.2, 去离子水(ddH_2O)定容至 1 L, 稀释成 1× PBS 使用, 并加入 1 mL 吐温 20, 即为 PBST 溶液, 混匀后室温保存备用。

表 4 10× PBS 溶液配制

Table 4 Preparation of 10× PBS

Compositions	Content
NaCl	80.0 g
KCl	2.0 g
KH_2PO_4	2.4 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	36.0 g

1.3 样品制备及凝胶电泳

在蛋白样品中以 5:1 比例加入 6× SDS 上样缓冲液, 均匀混合样品, 使用干式恒温器 100℃ 煮沸 5 min, 使蛋白质氨基酸侧链与 SDS 充分结合 (100℃ 下可提高 DTT 和 SDS 蛋白变性效率)。安装电泳装置, 加入 1× 电泳缓冲液, 使电泳缓冲液覆盖电极丝。将预染 Marker 和变性后蛋白样品分别加入凝胶的点样孔中, 设置恒压 80 V, 开始电泳, 待指示带跑入分离胶时, 更换为 130 V 恒定电压, 直至溴酚蓝跑至凝胶底部, 结束电泳。

1.4 转膜

1.4.1 根据目的蛋白分子量切胶, 并剪取两块和 PAGE 胶相同大小的厚滤纸和孔径为 0.2 μm 的 PVDF 膜, 将 PAGE 胶、滤纸、海绵浸泡于转移缓冲液约 20 min。PVDF 膜需在甲醇中激活 2 min, 然后于转移缓冲液中平衡约 5 min。

1.4.2 半干转印 转膜装置从下至上依次按阳极碳板、滤纸、PVDF 膜、凝胶、滤纸、阴极碳板的顺序放好, 滤纸、凝胶、PVDF 膜精确对齐, 每一步用玻璃棒去除气泡, 用滤纸将碳板上多余液体吸干, 盖上电转装置盖子。设置半干转膜参数, 恒压

16V, 转印 30 min。

1.4.3 湿转 转印夹黑色面(负极)放置预先经转移缓冲液浸泡的海绵垫、滤纸、凝胶、PVDF 膜、滤纸、海绵垫, 每层之间用玻璃棒去除气泡, 组装好转印夹(注意正负极顺序)。将转移夹放入转印槽, 加入预冷的转移缓冲液, 将凝胶面与负极相连, PVDF 膜与正极相连。盖上电极盖, 接通电源, 开始转膜。设置湿转转膜参数, 恒压 130 V, 转印 1 h。

1.5 封闭、抗体孵育

将 PVDF 膜放入含有 5%BSA 的 PBST 中, 室温摇床孵育 20 min, 封闭膜上剩余的疏水结合位点。加入用含有 5%BSA 的 PBST 稀释的合适比例的一抗, 24℃ 摇床孵育 2 h, 使目的蛋白与一抗特异性结合。PBST 漂洗 4 次, 5 min/ 次, 洗去未结合的一抗。加入用含有 5%BSA 的 PBST 稀释的辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗兔二抗 (1:2000 稀释), 室温摇床孵育 1 h, 使 HRP 标记的二抗与一抗充分结合。PBST 漂洗 4 次, 5 min/ 次, 洗去未结合的二抗。

1.6 ECL 发光法

本实验体系所使用的显影试剂 (Super Signal™ West Dura Extended Duproportionn Substrate) 是一种基于鲁米诺的增强型化学发光(ECL)HRP 底物, 可检测飞克级别(fg, 10-15)的抗原抗体反应, 加强信号强度及缩短化学发光时间。该显影试剂含有 A、B 液, 使用时将其以 1:1 混合, 使用 1 mL 加样枪将混合液均匀滴到 PVDF 膜上, 放入 Chemi Doc XRS 凝胶成像仪中进行凝胶显影, 设置曝光时间为 10 min, 60 张。

2 结果

2.1 不同转膜方式对 Western blot 检测蛋白结果的影响

分析比较半干转和湿转对 MLC 和 p-MLC 蛋白表达的影响。半干转设置恒压 16V, 转印 30 min; 湿转设置恒压 130V, 转印 1 h, 结果发现: 半干转 β -actin 信号不连续, 平均灰度值为 20924; MLC 出现断续信号, 平均灰度值为 20216(图 1A)。而利用湿转条件, 同样样品检测结果发现: β -actin 信号连续, 平均灰度值 43928, 为干转样品的 2.1 倍; MLC 信号较强且连续, 平均灰度值为 44033, 为干转样品的 2.2 倍(图 1B)。

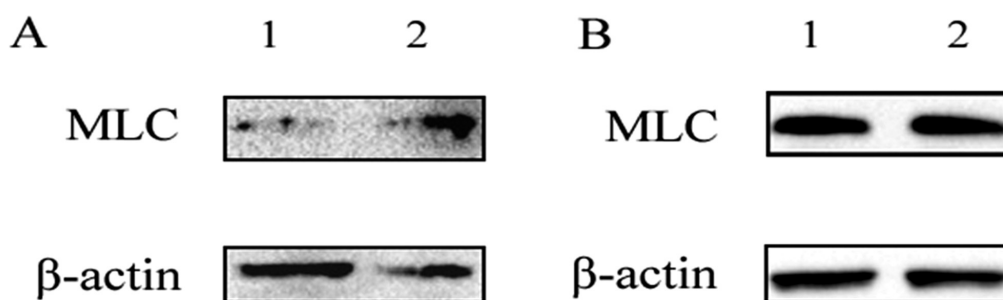


图 1 半干转和湿转 MLC 蛋白检测结果比较

Fig.1 The comparison of the semi-dry and wet transfer results of MLC

A: MLC semi-dry B: MLC wet transfer, lanes 1 and 2 were rat airway smooth muscle cell

再次利用上述半干转和湿转条件检测 p-MLC 信号, 结果发现: 半干转 MLC 磷酸化无信号, β -actin 信号正常, 平均灰度值为 68321(图 2A); 而利用湿转条件, 同样样品检测结果发现:

β -actin 平均灰度值基本持平的情况下, p-MLC 磷酸化出现条带, 且信号较强, 平均灰度值达到 64384(图 2B)。

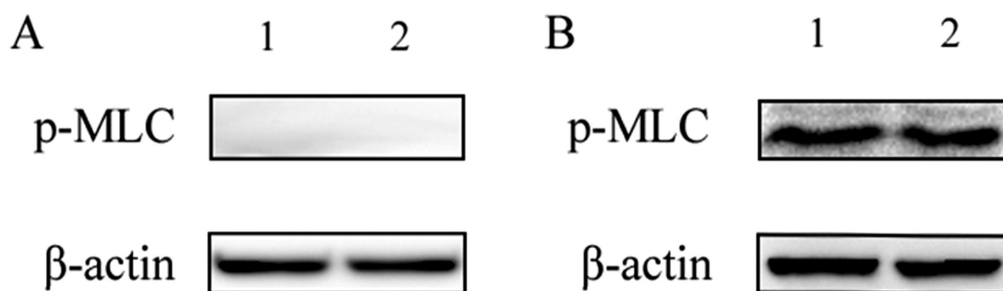


图 2 半干转和湿转 p-MLC 蛋白检测结果比较

Fig.2 The comparison of the semi-dry and wet transfer results of p-MLC

A: p-MLC semi-dry B: p-MLC wet transfer, lanes 1 and 2 were rat airway smooth muscle cell

2.2 比较不同抗体稀释比例对 MLC 蛋白磷酸化表达检测效果

选用小鼠气管平滑肌细胞, 上样蛋白量为 60 μ g, 抗体选用 p-MLC (ab2480), 一抗稀释比例分别为 1:3000, 1:5000, 1:10000, 采用湿转转膜方式, 结果发现: 抗体稀释比为 1:3000 时, 出现非特异性条带, 分子量为 25kD(图 3A); 降低抗体稀释比为 1:5000 时, 无非特异性条带, 且蛋白信号效果较好, 平均灰度值为 59563(图 3B); 抗体稀释比为 1:10000 时同样无非特

异性条带, 但条带出现弥散且背景较高, 平均灰度值为 50387(图 3C)。

3 讨论

自 1981 年尼尔伯奈特首次将蛋白免疫印迹法称为 Western blot 以来, 该实验技术被广泛用于生物化学、分子生物学等研究领域^[10-12]。近几年关于 Western blot 实验技术的仪器层出不

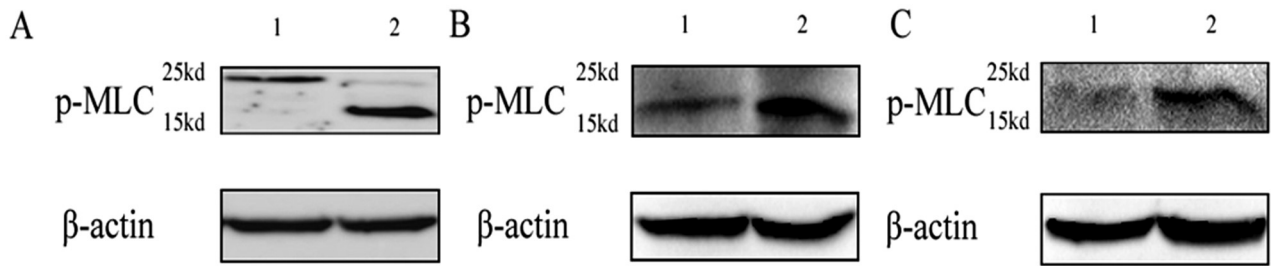


图 3 不同抗体稀释比例对 p-MLC 蛋白表达检测结果比较

Fig.3 The results of different antigen-antibody dilution proportion of p-MLC

A: proportion of primary antibody 1:3000 B: proportion of primary antibody 1:5000

C: proportion of primary antibody 1:10000, lanes 1 and 2 were mouse airway smooth muscle cell

穷,包括毛细管电泳技术^[13,14]、微流控芯片技术^[15,16]等,对于 Western blot 发展及推广具有积极作用^[17,18]。Western blot 实验步骤繁杂,变异因素较多,各个实验步骤的质控至关重要。实验方案需要根据目的蛋白特性进行优化,包括不同 SDS-PAGE 凝胶浓度、转印膜、不同转膜体系、抗原抗体比例、二抗比例及显色液选择等^[19,20]。

Western blot 半干转和湿转转膜方式各有优缺点。在液体的实用上:一次半干转需要转移缓冲液 0.1 L,而湿转需要 1 L,二者相比,半干转方法可以节省 9 倍液体;在时间上:半干转转印时间为 30 min,湿转转印时间为 1 h,二者相比,半干转方法比湿转节省 1 倍时间;在蛋白转印效果上:半干转转印时整个系统没有完全浸泡在转移缓冲液中,可能会出现液体分布不均匀情况,而致转膜效果出现异常,湿转转印整个过程均在液体中,转印系统稳定性较好;在仪器依赖性上:半干转方式依赖仪器,对于仪器使用年限及日常维护要求较高,湿转方式对仪器要求较低。湿转方式在适用目标蛋白分子量上有争议,有研究表明湿转适用于大分子蛋白的转印^[9]。

基于前期研究结果,本研究首先比较了半干转和湿转对 β-actin、MLC 表达效果,半干转印参数:恒压 16 v, 30 min;湿转参数:130 v, 1 h,结果半干转蛋白信号断续;而利用湿转条件,同样样品检测结果发现:蛋白信号连续且强度是半干转 2.1 倍;对于磷酸化蛋白,半干转磷酸化蛋白无信号;而利用湿转条件,同样的样品检测结果发现:磷酸化蛋白出现连续信号。在此研究系统中对于 MLC 及其磷酸化蛋白检测湿转优于半干转。Western blot 技术中抗体对抗原的识别本质是抗原抗体反应,而抗原与抗体发生可见反应遵循一定量比关系,只有当二者浓度比例适当时才出现最大可见反应^[9]。本次研究中 p-MLC 抗体浓度为 1 mg/mL,基于前期研究数据,研究设定了 1:3000, 1:5000, 1:10000 共 3 个参数,比较特定抗原量不同抗体浓度对于 p-MLC 检测效果影响。结果发现:采用湿转转膜方式,抗体稀释比为 1:3000 时,出现非特异性条带;降低抗体稀释比为 1:5000 时无非特异性条带,且蛋白信号效果较好;抗体稀释比为 1:10000 时条带出现弥散且背景较高。本研究认为对于特定抗原量 1:5000 是最适合抗体比例。

综上,本研究体系最适合的 Western blot 对 18kD MLC 蛋白及其磷酸化表达的最优化检测参数是:湿转转膜方式(130 V, 1 h), p-MLC 抗体稀释比 1:5000。

参考文献(References)

[1] Towbin H. Origins of protein blotting. In: Kurien BT, Scofield RH

- (Eds.), Protein Blotting and Detection: Methods and Protocols[M]. Springer, New York, 2015: 1-3
- [2] Mahmood T, Yang P C. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting[J]. N Am J Med Sci, 2012, 4(9): 429
- [3] Uhl J, Newton R C. Quantitation of related proteins by Western blot analysis[J]. J Immunol Methods, 1988, 110(1): 79
- [4] Rybicki E P, von Wechmar M B. Enzyme-assisted immune detection of plant virus proteins electroblotted onto nitrocellulose paper [J]. J Virol Methods, 1982, 5(5-6): 267
- [5] Kurien B T, Scofield R H. Western blotting [J]. Methods, 2006, 38(4): 283
- [6] Schnell F, Donoghue C, Dworzak J, et al. Development of a validated western blot method for quantification of human dystrophin protein [J]. Neuromuscular Disorders, 2016, 26: S160-S
- [7] Eaton S L, Hurtado M L, Oldknow K J, et al. A Guide to Modern Quantitative Fluorescent Western Blotting with Troubleshooting Strategies[J]. J Vis Exp, 2014, (93)
- [8] De Abreu Almeida M, Pizzini CV, Damasceno LS, et al. Validation of western blot for Histoplasma capsulatum antibody detection assay[J]. BMC Infect Dis, 2016, 16(1): 1
- [9] De Wildt R M, Mundy C R, Gorick B D, et al. Antibody arrays for high-throughput screening of antibody-antigen interactions [J]. Nat Biotechnol, 2000, 18(9): 989
- [10] Lewis C W, Taylor R G, Kubara P M, et al. A western blot assay to measure cyclin dependent kinase activity in cells or in vitro without the use of radioisotopes[J]. FEBS Lett, 2013, 587(18): 3089
- [11] Jørgensen M E, Nour-Eldin H H, Halkier B A. A Western Blot Protocol for Detection of Proteins Heterologously Expressed in Xenopus laevis Oocytes[J]. Methods Mol Biol, 2016, 1405: 99
- [12] Moussa A. Electrophoresis and Western Blot Can Detect the Interaction of Ion Ligand with the Pathogenic Prion Protein [J]. J Chromatogr Sep Tech, 2016, 7: e133
- [13] Volpi N, Maccari F. Capillary Blotting of Glycosaminoglycans on Nitrocellulose Membranes After Agarose Gel Electrophoresis Separation. In: Kurien BT, Scofield RH (Eds.), Protein Blotting and Detection: Methods and Protocols [M]. Springer, New York, 2015: 95-102
- [14] Ziegler K, Kerimi A, Poquet L, et al. Butyric acid increases transepithelial transport of ferulic acid through upregulation of the monocarboxylate transporters SLC16A1 (MCT1) and SLC16A3 (MCT4)[J]. Arch Biochem Biophys, 2016, 599: 3 (下转第 4037 页)

表 2 不同稀释度病毒 DNA 进行 qPCR 和 RAPD-qPCR Ct 值的比较
($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of PCR and RAPD-qPCR Ct values for different dilutions of viral DNA($\bar{x} \pm s$)

HSV DNADilution	qPCR	RAPD-qPCR
1:10 ²	26.76± 0.17	5.50± 0.46
1:10 ³	30.10± 0.13	8.61± 0.07
1:10 ⁴	32.52± 0.09	11.97± 1.15
1:10 ⁵	--	18.52± 0.00
1:10 ⁶	--	20.86± 0.00
1:10 ⁷	--	--
HCMV DNADilution	qPCR	RAPD-qPCR
1:10 ²	29.70± 0.30	4.23± 0.09
1:10 ³	37.49± 1.68	8.72± 0.14
1:10 ⁴	--	10.75± 0.01
1:10 ⁵	--	17.11± 0.90
1:10 ⁶	--	--
VZV DNADilution	q-PCR	RAPD-qPCR
1:10 ²	27.94± 0.91	9.49± 0.06
1:10 ³	31.76± 0.31	10.35± 0.12
1:10 ⁴	35.43± 1.40	15.33± 0.07
1:10 ⁵	--	22.96± 0.81
1:10 ⁶	--	36.7± 0.92
1:10 ⁷	--	--

Polymerase Chain Reaction and Direct Fluorescent Antibody Test for Diagnosis of Genital Herpes[J]. J Lab Physicians, 2017, 9(1): 53-56

- [14] Raymond F, Carbonneau J, Boucher N, et al. Comparison of automated microarray detection with real-time PCR assays for detection of respiratory viruses in specimens obtained from children [J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(3): 743-750

- [15] Junlian Liu, Yong Yi, Wei Chen, et al. Development and evaluation of the quantitative real-time PCR assay in detection and typing of herpes simplex virus in swab specimens from patients with genital herpes [J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(10): 18758-18764
- [16] Mazyar ZA, AlborziA, Borhani H, et al. Diagnosis and quantitative detection of HSV DNA in samples from patients with suspected herpes simplex encephalitis [J]. Med Virol, 2010, 82: 1911-1916
- [17] Julien Poissy, Karen Champenois, Anny Dewilde, et al. Impact of Herpes simplex virus load and red blood cells in cerebrospinal fluid upon herpes simplex meningo-encephalitis outcome [J]. BMC Infectious Diseases, 2012, 12: 256
- [18] Christianson, SaraWolfe, Joyce Soualhine,et al. Comparison of repetitive-sequence-based polymerase chain reaction with random amplified polymorphic DNA analysis for rapid genotyping of nontuberculosis mycobacteria [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2012, 58(8): 953-964
- [19] 严玉娟, 邢益平, 施旭东, 等. 随机扩增多态性技术联合荧光定量 PCR 检测结核分枝杆菌方法的建立 [J]. 江苏医药, 2016, 42(11): 1209-1213
- Yan Yu-juan, Xing Yi-ping, Shi Xu-dong, et al. Establishment of random amplified polymorphic DNA combined with qPCR for detecting mycobacterium tuberculosis [J]. Jiangsu Medical Journal, 2016, 42(11): 1209-1213
- [20] 黄威, 邢益平, 严有德, 等. 一种随机引物联合多特异性 DNA 片段检测结核分支杆菌的新方法 [J]. 现代生物医学进展, 2014, 14: 5609-5616
- Huang Wei, Xing Yi-ping, Yan You-de, et al. Detection of Mycobacterium Tuberculosis by Random Combined Specific PCR [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2014, 14(29)
- [21] Aurelia G, Simona V, Latte MC, et al. Diagnosis of neurological herpesvirus infections:real time PCR in cerebral spinal fluid analysis [J]. New Microbiol, 2009, 32(4): 333-340
- [22] Tang JW, Lin M, Chiu L, et al. Viral loads of herpes simplex virus in clinical samples--a 5-year retrospective analysis[J]. Med. Virol, 2010, 82: 1911-1916

(上接第 4050 页)

- [15] Hughes A J, Herr A E. Microfluidic Western blotting [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(52): 21450
- [16] Pan W, Chen W, Jiang X. Microfluidic Western blot [J]. Anal Chem, 2010, 82(10): 3974
- [17] Jin S, Kennedy R T. New developments in Western blot technology [J]. Chin Chem Lett, 2015, 4: 006
- [18] Plotzki E, Keller M, Ivanusic D, Denner J. A new Western blot assay

for the detection of porcine cytomegalovirus (PCMV)[J]. Journal of Immunological Methods, 2016, 437: 37-42

- [19] Eaton S L, Hurtado M L, Oldknow K J, et al. A Guide to Modern Quantitative Fluorescent Western Blotting with Troubleshooting Strategies[J]. J Vis Exp, 2014, (93)
- [20] Kurien B T, Scofield R H. Protein blotting: a review [J]. J Immunol Methods, 2003, 274(1-2): 1