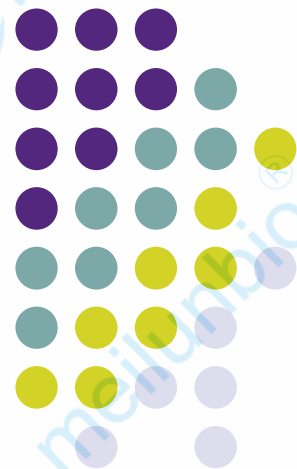


信号通路研究方法 基础知识





信号蛋白表达水平分析

蛋白印迹 (Western blot)

酶联免疫吸附反应 (ELISA)

信号蛋白表达水平分析

1、蛋白印迹 (Western blot)

蛋白质经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后转移（电转）至膜性支持物上(NC膜)，再与溶液中的抗体相互结合的技术。用于检测样品中特异性蛋白质的存在、细胞中特异蛋白质的半定量分析、蛋白质化学修饰（磷酸化），以及蛋白质分子间的相互作用研究等。

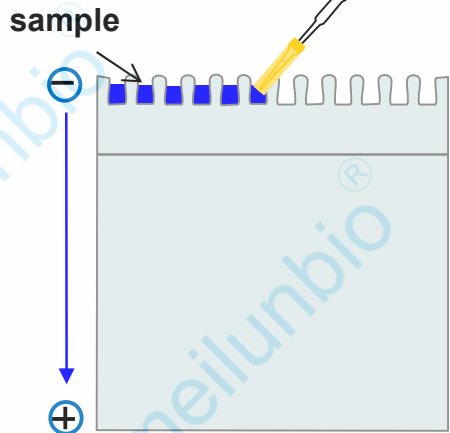


Western blot 常用试剂:

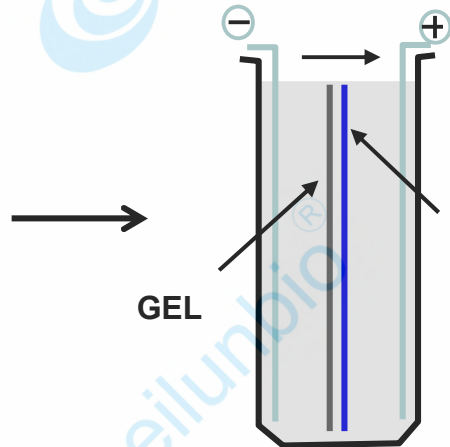
详见 Meilunbio® Western blot 试剂产品选购指南

图1: BIO-RAD电泳仪、湿式转印槽、垂直电泳槽

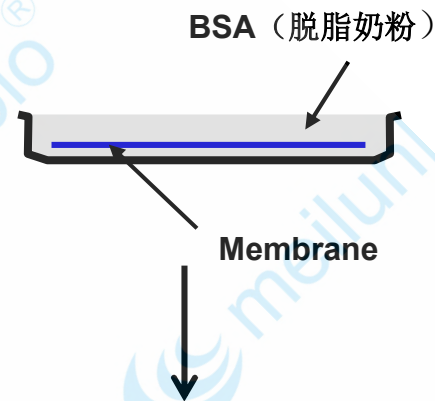
1、提取细胞（组织）蛋白，进行聚丙烯凝胶电泳



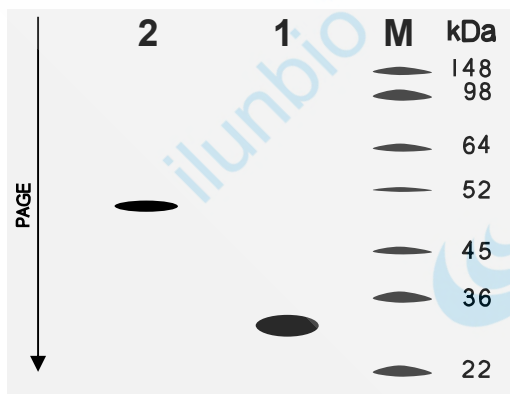
2、转膜，将凝胶上的蛋白转移到NC膜上



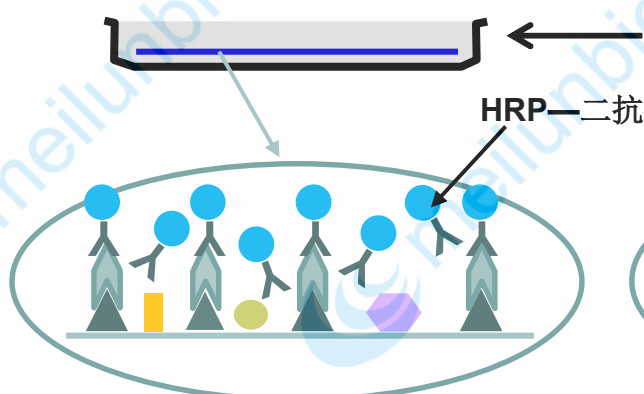
3、封闭



6、DAB显色，拍照，分析



5、孵育HRP标记的特异结合一抗的二抗



4、孵育特异性抗体（一抗）

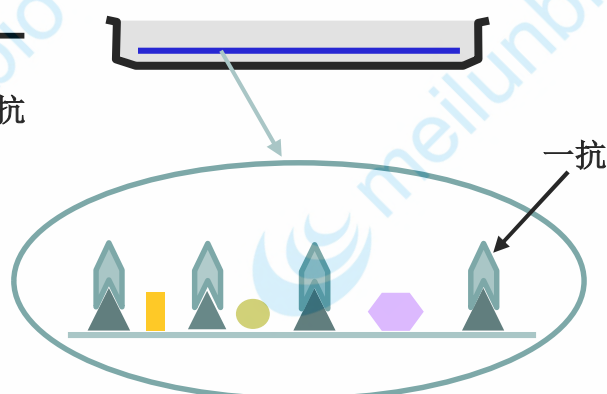


图2: Western blot 操作流程

2、酶联免疫吸附反应（ELISA）

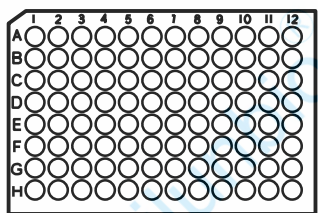
将可溶性的抗原或抗体结合到聚苯乙烯等固相载体上，利用抗原抗体特异性结合进行免疫反应的定性和定量检测方法。具有高度特异性、高灵敏度、定性定量检测的特点。



ELISA 常用试剂：

详见 Meilunbio® ELISA 试剂产品选购指南

图3：Thermo 全自动酶标仪



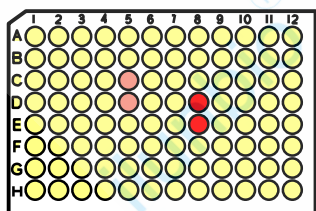
1. 包被特异性抗体A



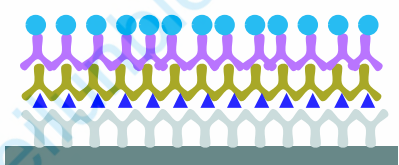
2. 加入待检抗原



5. 加入底物显色



4. 加入酶标抗 B 抗体 C



3. 加入特异性抗体B

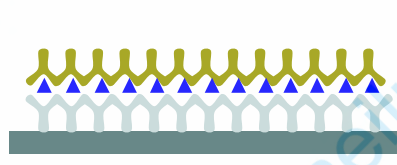


图4： 双抗体夹心ELISA操作流程

ELISA操作要点

- a. 样品制备和保存：血清样品或细胞培养上清，4℃保存，5天内测定；可-80℃保存；
- b. 试剂的准备：试剂最好现用现配，冰箱存放的试剂使用前平衡至室温；
- c. 固相载体：最常用的是聚苯乙烯，对蛋白质有较强的吸附能力；
- d. 包被：4℃过夜包被或37℃孵育2小时包被，包被浓度需要通过实验调节；
- e. 封闭：常用封闭液为2%牛血清白蛋白、5%脱脂奶粉；
- f. 加样：加样时应将所加物加在ELISA板孔的地步，避免加到壁上或产生气泡；可使用多道移液器；
- g. 孵育：为了避免蒸发，可以用封口膜或者保鲜膜封板。
- h. 洗涤：甩干液体，在吸水纸上尽量拍干；
- i. 显色和比色：把握终止反应，防止反应过度。



图5：Eppendorf 8道移液器



信号蛋白在细胞内定位

免疫组化 (Immunohistochemistry, IHC)

免疫荧光 (Immunofluorescence, IF)

信号蛋白在细胞内定位

1、免疫组化（Immunohistochemistry, IHC）

应用抗原与抗体特异性结合的原理，通过化学反应使标记抗体的显色剂（荧光素、酶、金属离子、同位素）显色来确定组织细胞内抗原（多肽和蛋白质），对其表达进行定位及相对定量的检测和分析。

免疫组化的常用固定液为中性缓冲福尔马林。组织可以通过脱水、包埋后保存。不同的样品和检测指标有不同的保定、包埋、切片方法。



免疫组化 常用试剂：

详见 Meilunbio® 免疫组化 试剂产品选购指南

免疫组化操作流程

1. 脱蜡/复水

- 将切片放入二甲苯的洗液中孵育 3 次，每次 5 分钟；
- 将切片放入 100% 乙醇中孵育 2 次，每次 10 分钟；
- 将切片放入 95% 乙醇中孵育 2 次，每次 10 分钟；
- 将切片放入 dH₂O 中清洗两次，每次 5 分钟。

2、抗原修复

将切片在 10 mM 的柠檬酸盐缓冲液 (pH 6.0) 中煮沸，亚沸状态 10 分钟，重复 2 次；冷却至室温。

3、染色

- 在 dH₂O 中清洗切片 3 次，每次 5 分钟；
- 切片放入 3% 过氧化氢水溶液中，孵育 10 分钟；
- 用 dH₂O 清洗切片 5 分钟；
- 用 PBS 缓冲液清洗切片 两次，每次 5 分钟；
- 在每个切片上滴加 100–400 μ l 封闭液，在室温下封闭 1 小时；
- 清除封闭液，每个切片上加入用稀释好的抗体 100–400 μ l，4 $^{\circ}$ C 孵育过夜；
- 清除抗体溶液，用 PBS 液清洗切片 3 次，每次 5 分钟；
- 每个切片上加入稀释好的二抗 100-400 μ l，室温 30 分钟到 1 小时；
- 用 PBS 缓冲液清洗切片 3 次，每次 5 分钟。
- 加入 1 滴 稀释后的 DAB 显色液，使用前充分混合，观察显色进程，切片浸入水中终止反应。
- 用苏木素染色液对切片进行复染。
- 用 dH₂O 清洗切片两次，每次 5 分钟。

4、脱水封片

- 将切片放入 95% 乙醇中孵育 2 次，每次 10 秒。
- 将切片放入 100% 乙醇中孵育 2 次，每次 10 秒。
- 将切片放入二甲苯中孵育 2 次，每次 10 秒。
- 树胶封片，可长期保存

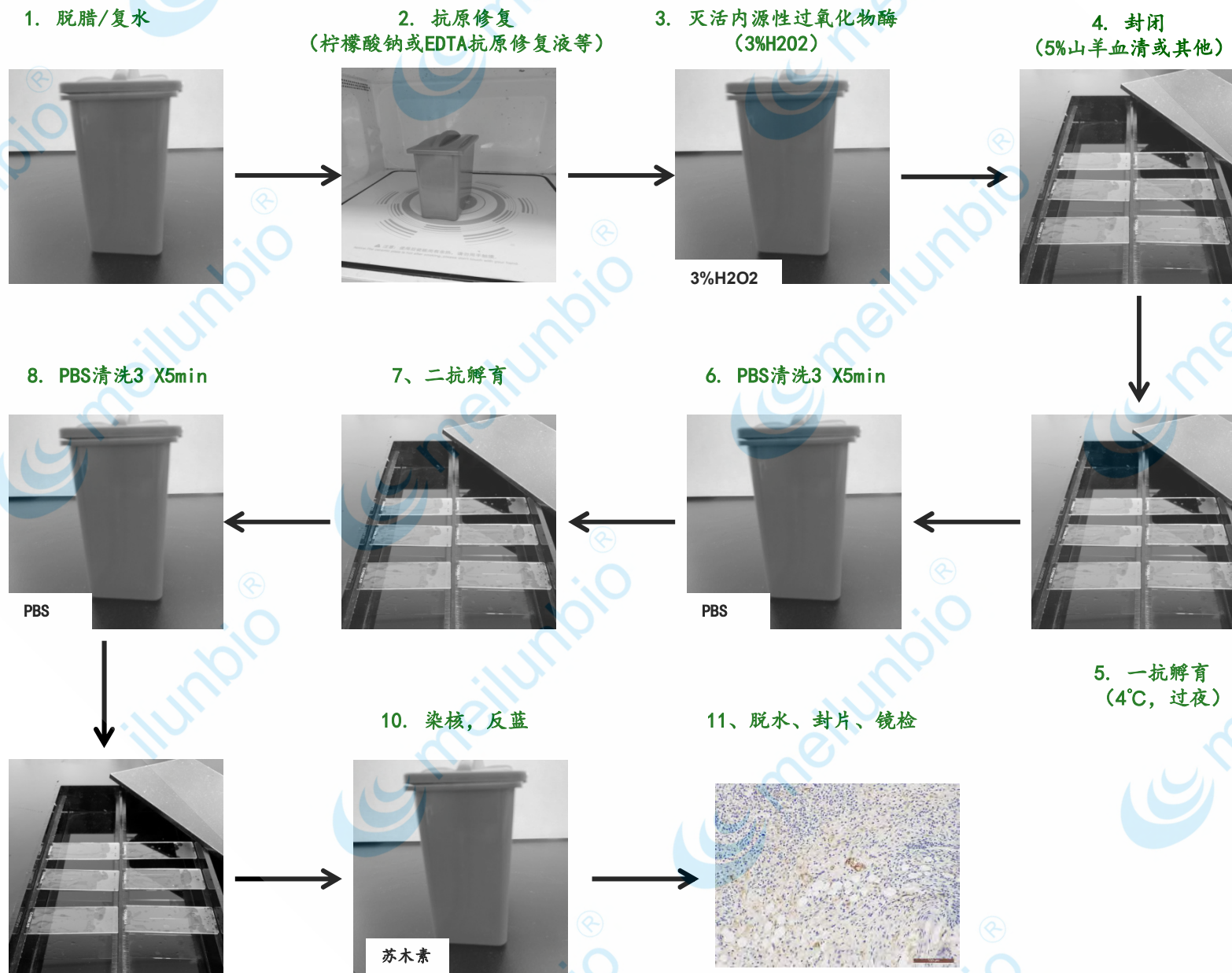
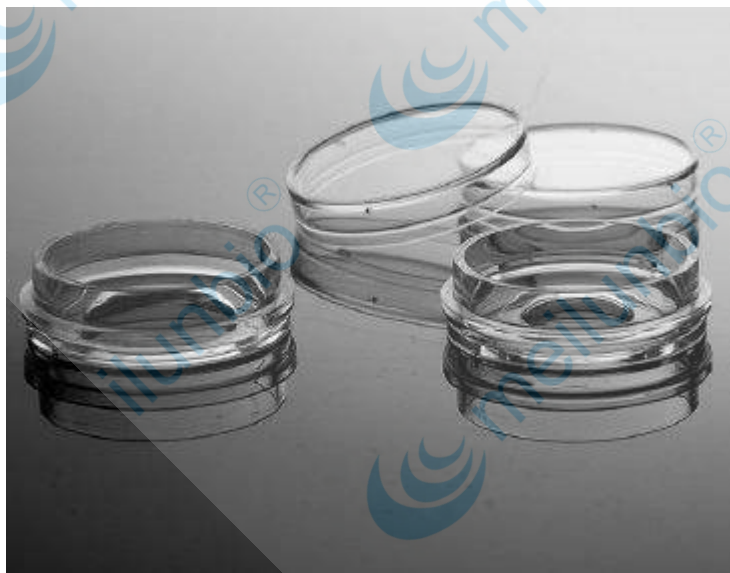


图6: 免疫组化操作流程

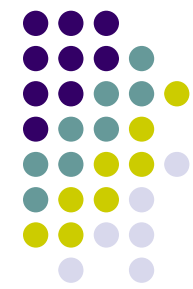
2、免疫荧光（Immunofluorescence, IF）

分为用荧光抗体示踪或检查相应抗原的方法称荧光抗体法和用已知的荧光抗原标记物示踪或检查相应抗体的方法称荧光抗原法两种方法。



免疫荧光 常用试剂：

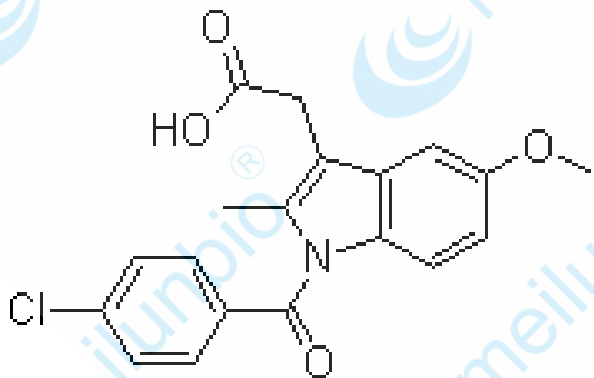
详见 Meilunbio® 荧光标记 试剂产品选购指南



关键信号分子抑制或增强

1、抑制剂

通过外源抑制剂的加入，检测相应下游信号蛋白的表达和磷酸化变化，明确研究药物或通路作用机制。



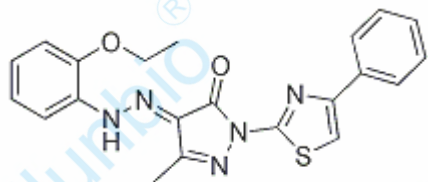
抑制剂 常用试剂:

详见 Meilunbio® 信号通路 试剂产品选购指南

图7: 吲哚美辛

3、激动剂

通过外源激动剂的加入，检测相应下游信号蛋白的表达和磷酸化变化，明确研究药物或通路作用机制。



激动剂 常用试剂:

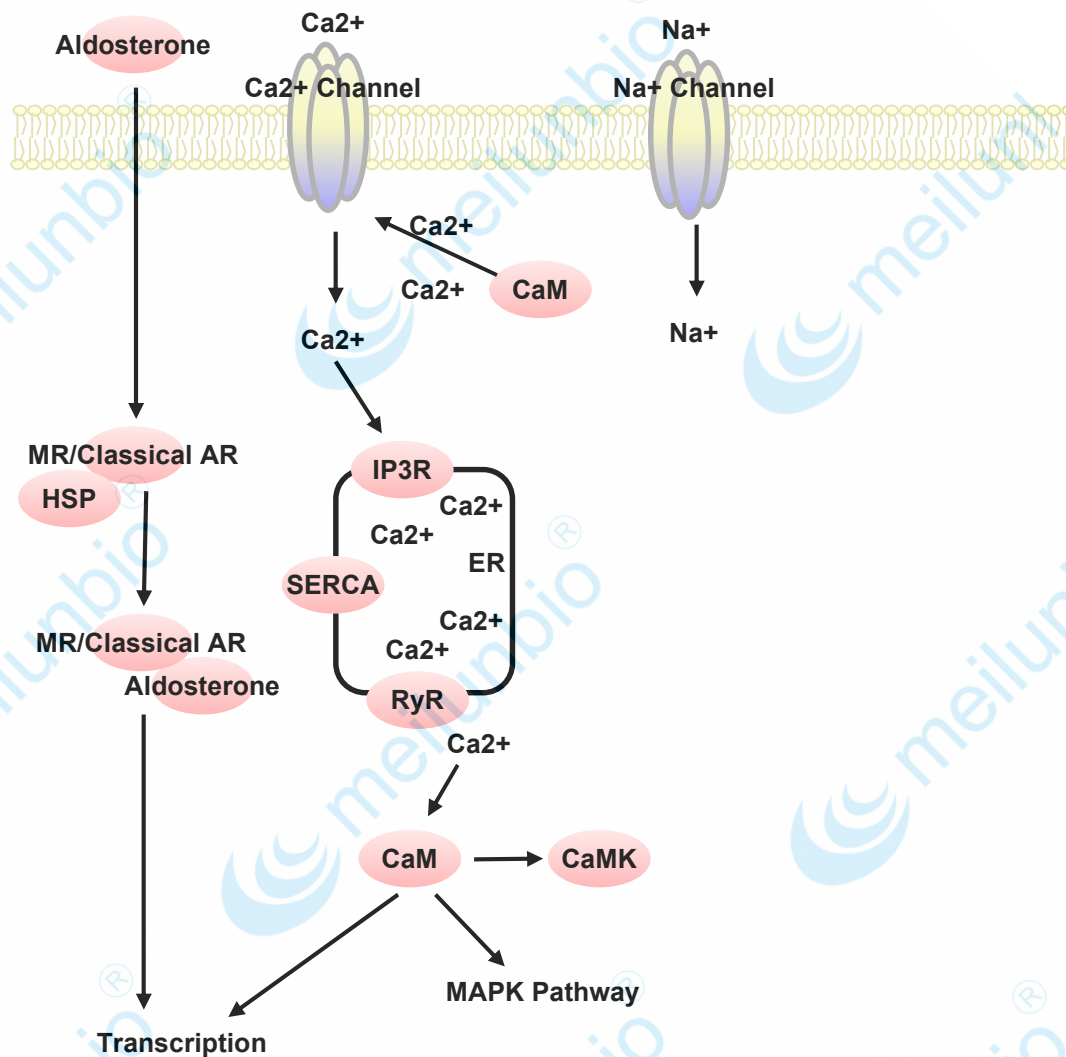
详见 Meilunbio® 信号通路 试剂产品选购指南

图8: BAM-7

Membrane Transporter

膜转运蛋白介导大部分分子进出细胞的过程，在细胞代谢、信号转导、离子平衡、免疫识别等生物学功能中发挥重要作用。膜转运蛋白和离子通道可作为药物靶点或作为促进药物向细胞或组织递送研究方向。

ATPase
Calcium Channel
CFTR
Chloride channel
CRM1
GABA Receptor
GluR
iGluR
NMDAR
P-gp
Potassium Channel
Proton Pump
SGLT
Sodium Channel



GPCR/G Protein

5-HT Receptor

Adenosine Receptor

Adrenergic Receptor

CaSR

E1 Activating

E2 conjugating

E3 Ligase

Endothelin Receptor

GHSR

Glucagon Receptor

Glucocorticoid Rec

GPCR19(TGR5)

GPR119

GPR

GPR40(FFAR1)

LPA Receptor

OX Receptor

Protease-activated R

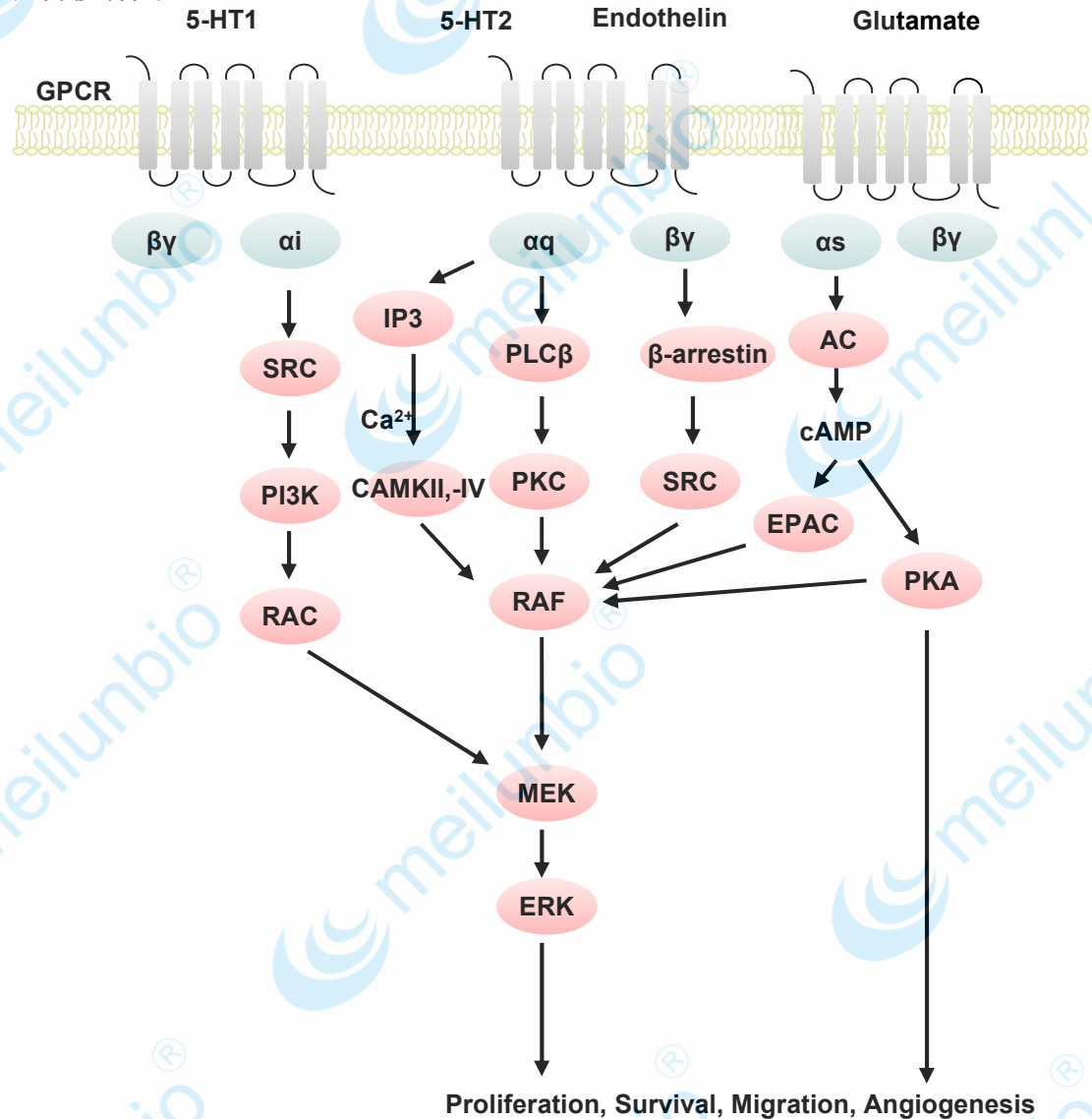
Rac

Ras

Rho

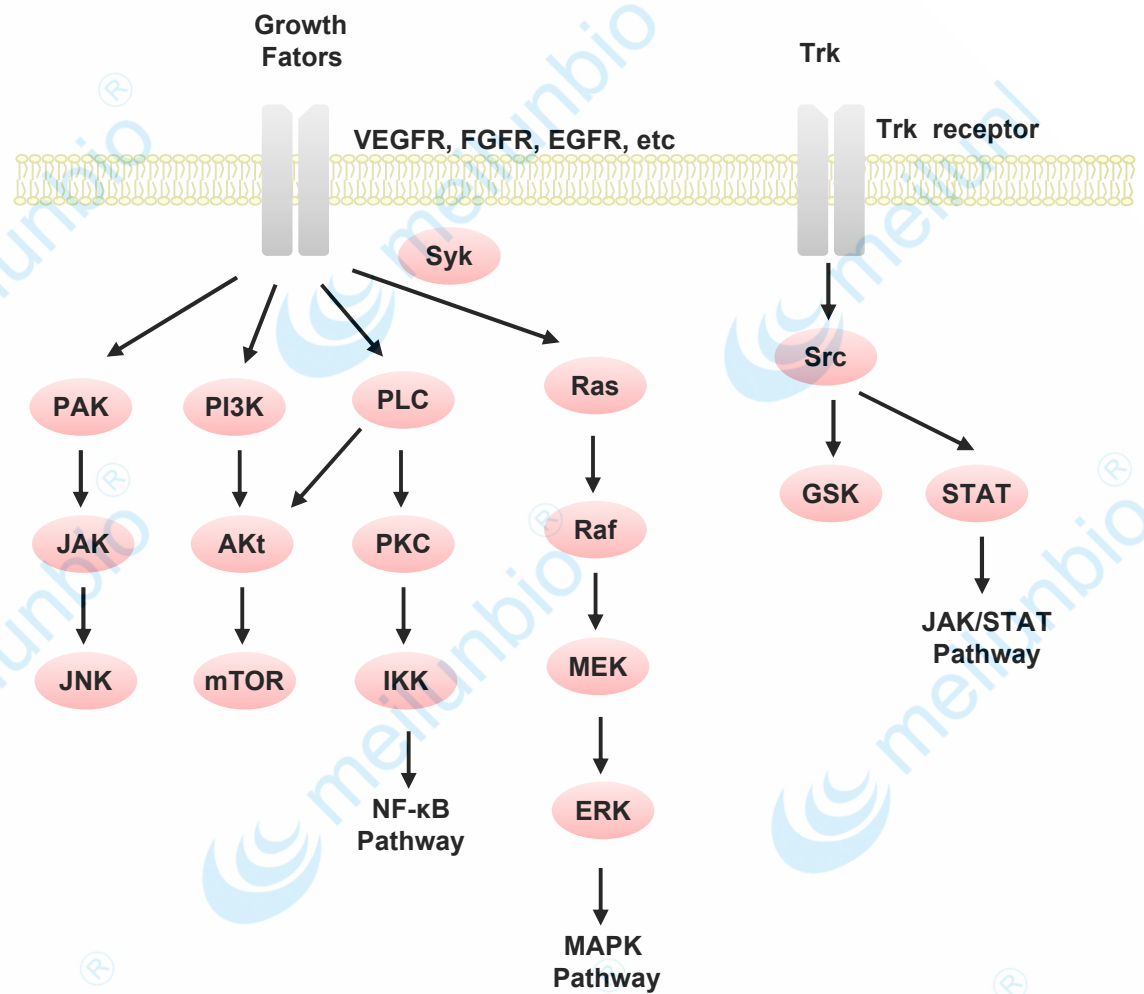
S1P Receptor

G 蛋白偶联受体 (GPCR) 是细胞表面受体中最大的多样性家族, G 蛋白将 GDP 转换为 GTP, α 和 β/γ 亚单位解离, 信号级联放大。G 蛋白偶联受体介导的信号通路包括: 激活离子通道; 激活或抑制腺苷酸环化酶(AC), 以环腺苷酸 (cAMP) 为第二信使; 激活磷脂酶 C(PLC), 以 1,4,5-三磷酸肌醇 (IP₃) 和二酰甘油 (DAG) 作为双信使。GPCR 异常与肿瘤发生和转移有关。



Protein Tyrosine Kinase/RTK

蛋白质酪氨酸激酶家族（PTKs）是调控细胞增殖、分化、迁移和代谢的关键激酶。PTKs分为受体酪氨酸激酶家族（RTKs）和非受体酪氨酸激酶家族（NRTKs）。RTKs包括胰岛素和多种生长因子受体，如EGF、FGF、PDGF、VEGF和NGF等。RTK是糖尿病性视网膜病变、动脉粥样硬化、癌症等疾病研究中的重要靶点。

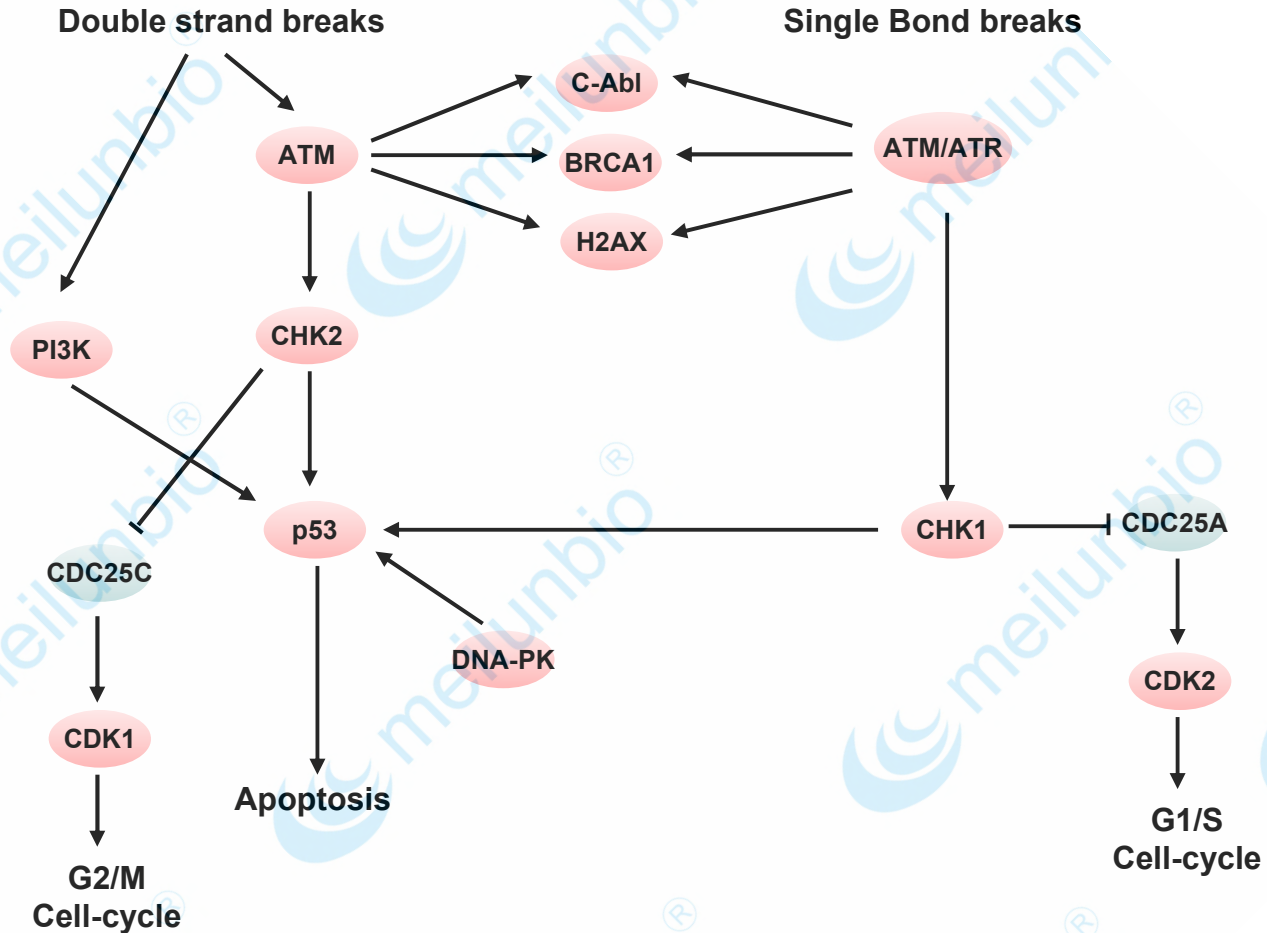


- ACK
- ALK
- Axl
- Bcr-Abl
- BTK
- cAMP(PKA)
- c-Kit
- c-Met
- CSF-1R
- DYRK
- EGFR
- Ephrin receptor
- FAK
- FGFR
- FLT3
- HER2
- IGF-1R
- MET
- PDGFR
- PKA

Cell Cycle/DNA Damage

细胞周期分为G1/S/G2/M期.在癌细胞中,细胞周期和DNA损伤途径相关元件使其能够不断自我复制,促进肿瘤发展,直接调节细胞周期进程相关的蛋白及检查点激酶是疾病治疗中的重要方向。

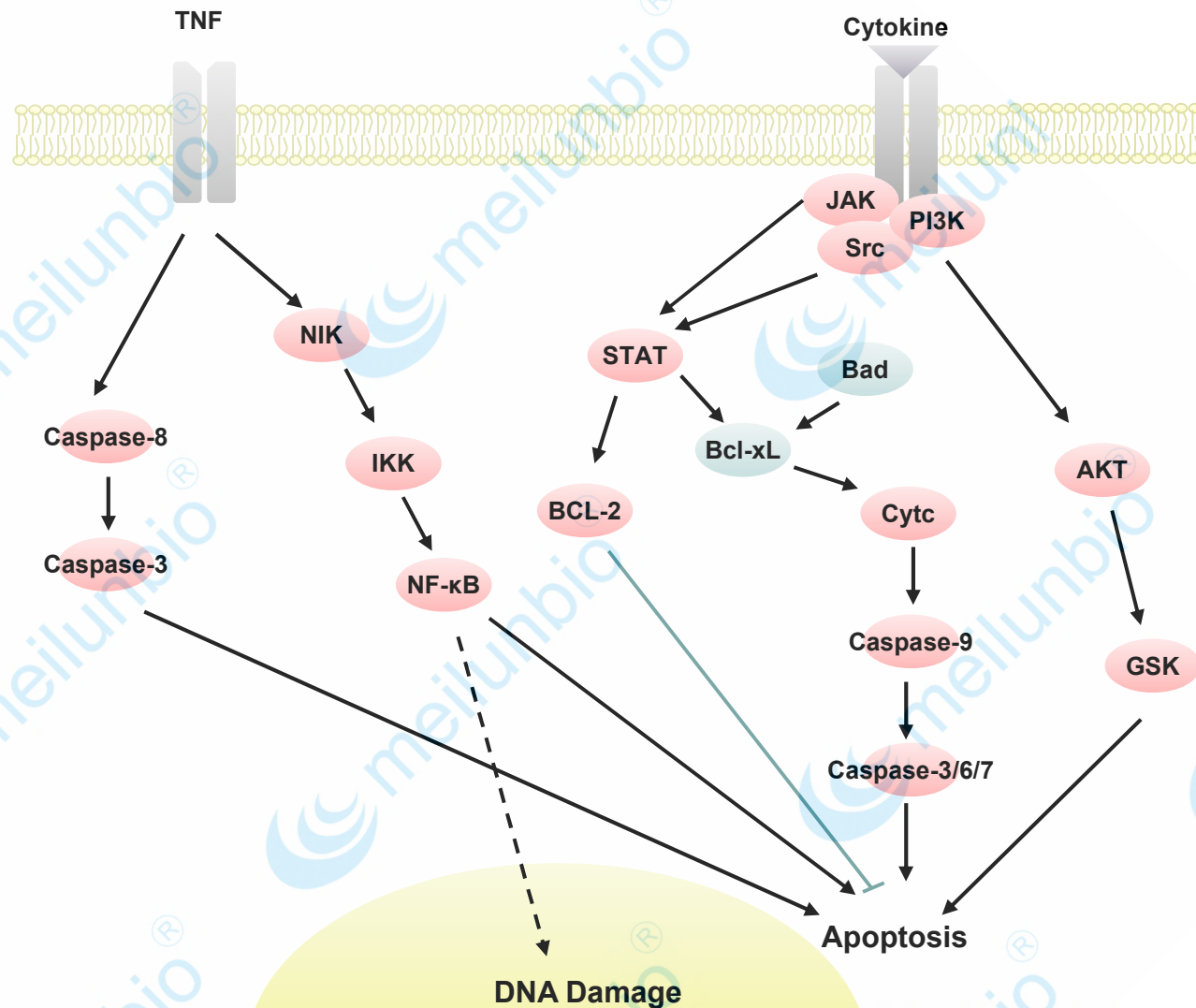
APC
ATM/ATR
Aurora Kinase
Casein Kinase
CDK
Chk
DHFR
DNA alkylator
DUB
HDAC
HSP
Kinesin
Microtubule Associat
p97
PAK
PERK
PLK
PPAR
ROCK



Apoptosis

Caspase是半胱氨酸蛋白酶的一族，是细胞凋亡的关键调节分子。caspase2/8/9等激活后会剪切并激活下游caspase3/6/7等，进而执行凋亡。Bcl-2家族的抑制凋亡因子Bcl-xL和Bcl-2等保护线粒体完整性，防止细胞色素C的释放，阻止其引发的凋亡。TNF- α 可以激活促凋亡通路也可激活抑制凋亡通路。

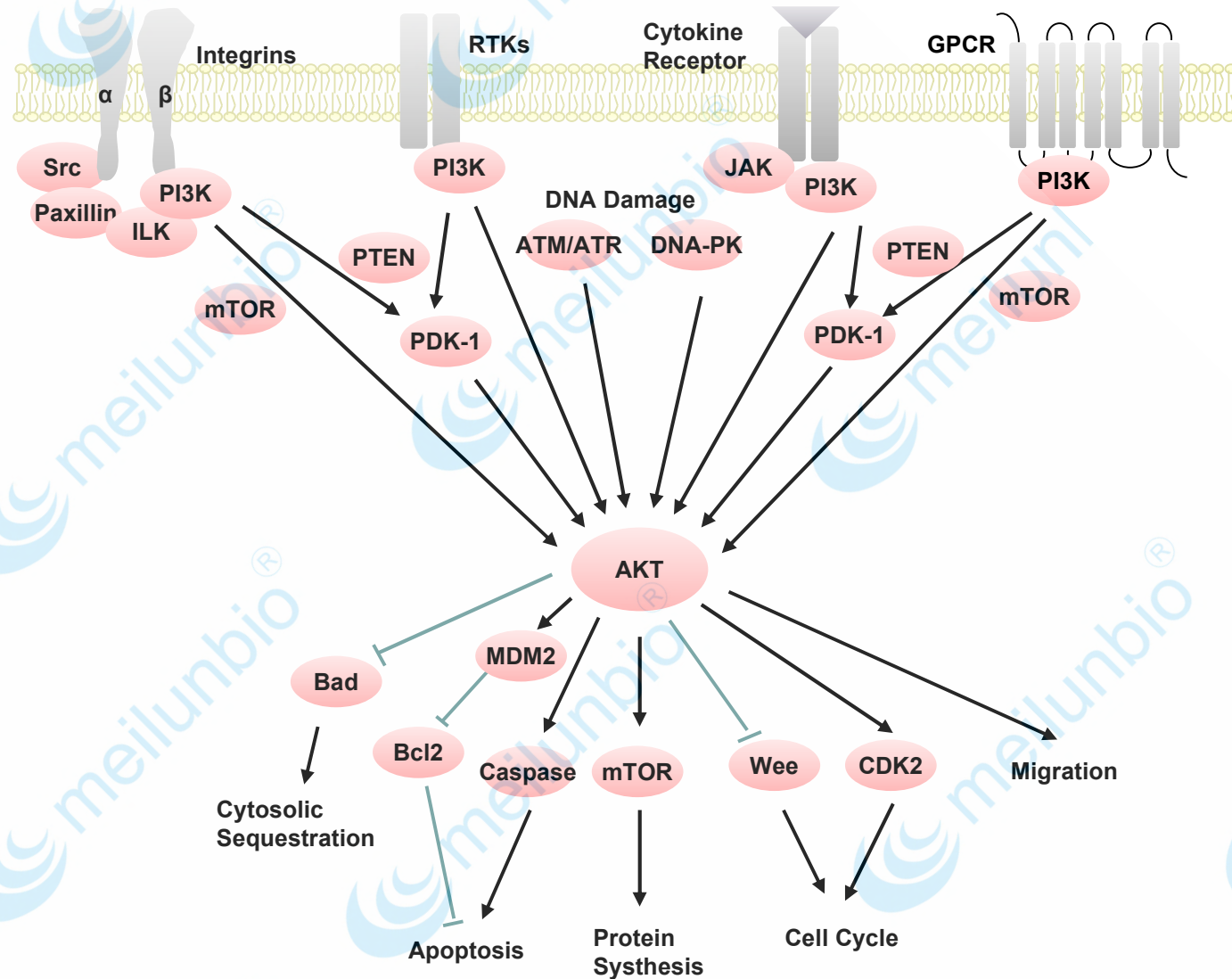
Apoptosis
Bcl-2
Caspase
Ferroptosis
Mdm2
p53
Survivin
TNF-alpha



PI3K/Akt/mTOR

PI3K / Akt / mTOR信号通路对于细胞生长和存活的许多方面都至关重要。受体酪氨酸激酶、整合素、B 细胞和 T 细胞受体、细胞因子受体、G 蛋白偶联受体等能够激活AKT信号途径。PDK 则是AKT的上游激活剂。PTEN 通过去磷酸化 PIP3 抑制 Akt 活性。AKT作为细胞信号通路的主开关与多种疾病（包括癌症、糖尿病、神经退行性疾病）相关。AKT是基础研究和药物开发中的研究热点之一。PI3K/Akt信号途径是一条经典的信号途径。

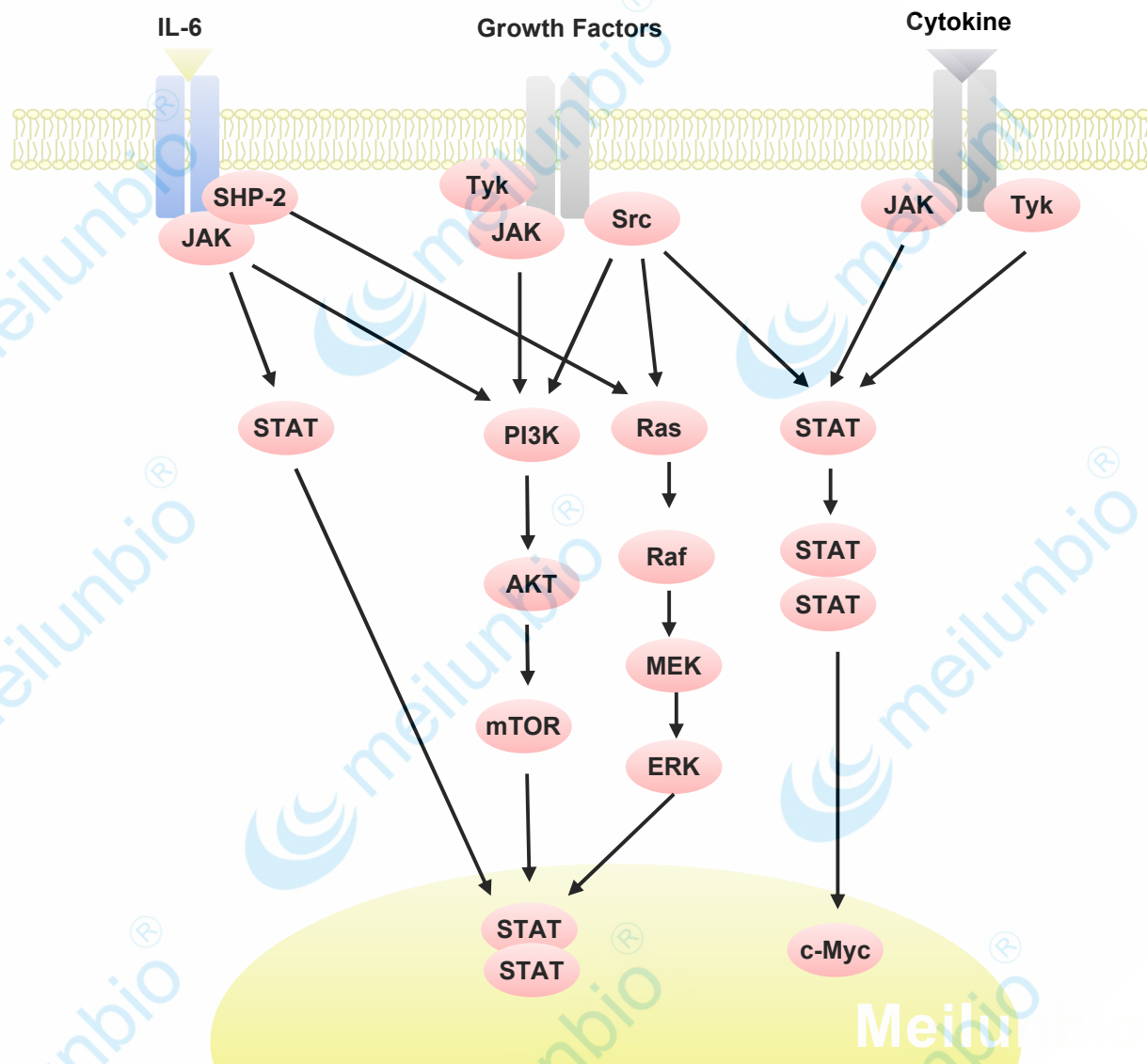
Akt
MELK
mTOR
PDK-1
PI3K
PTEN



JAK-STAT/IL6

JAK家族包括TYK2、JAK1、JAK2和JAK3。IFN- γ R1亚单位与JAK1相关，IFN- γ R2与JAK2相关。在与配体结合后，受体二聚化激活JAK，STAT磷酸化并形成二聚体，STAT进入核内调节靶基因的转录。JAK-STAT信号通路参与调节细胞增殖、分化、凋亡等多种生物学活性。IL6受体家族，可以协同调控B细胞分化、浆细胞发生等反应。临床上JAK抑制剂主要用于筛选血液系统疾病、肿瘤、类风湿性关节炎及银屑病等治疗药物。

JAK
STAT
IL-6

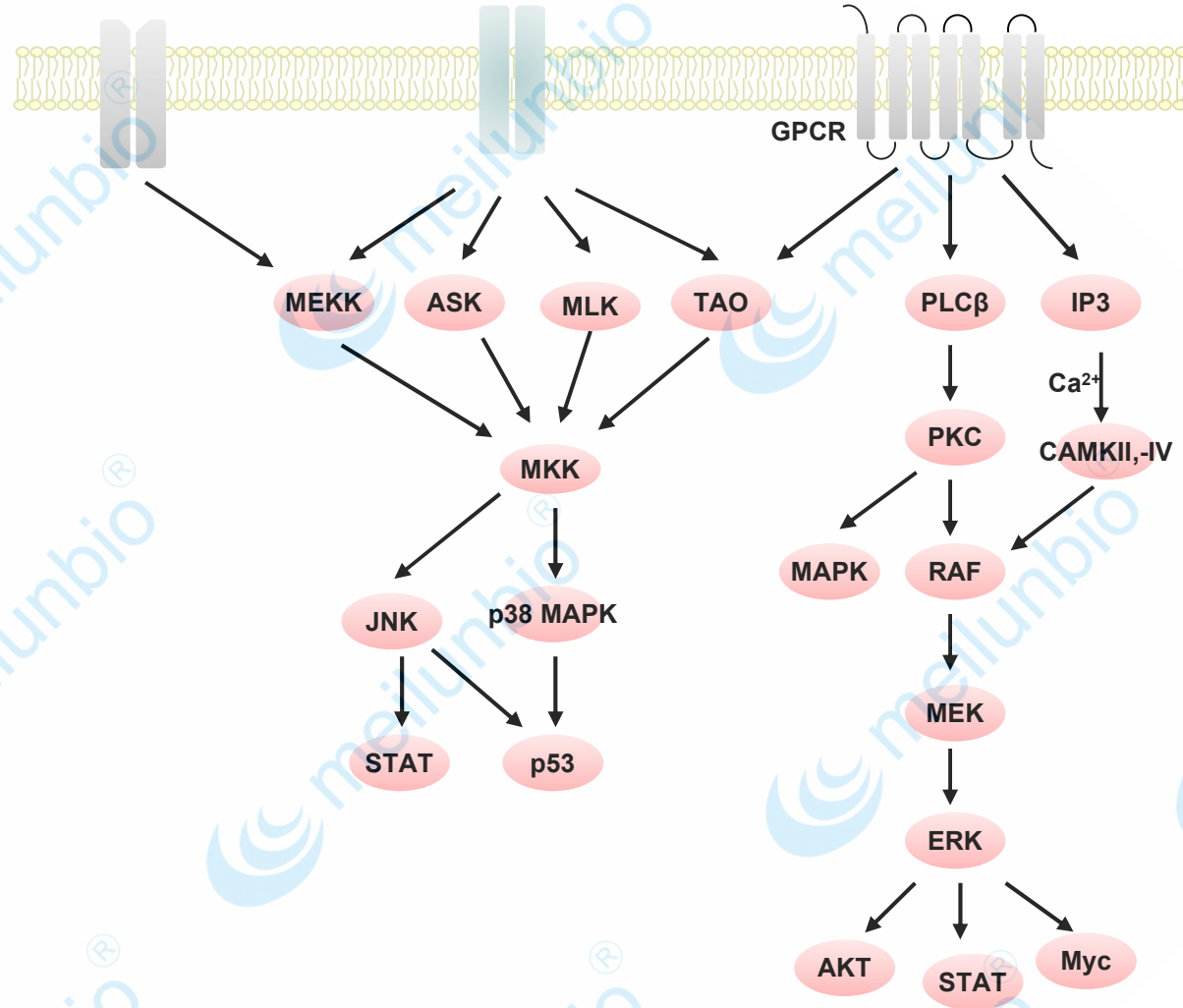


MAPK/ERK

MAPK信号通路介导进入细胞核的细胞外信号，激活包括ERK、JNK和p38激酶在内多个信号转导通路。生长因子、细胞因子和激素等多种因子可以激活MAPK途径。ERK途径中，RTK诱导激活的Raf激活MEK1/2，进而激活ERK1/2。MAPK信号通路在调节包括炎症、细胞分化、细胞增殖和死亡在内的许多细胞过程起着关键作用。选择性抑制MAPK信号通路的小分子药物是治疗癌症和神经退行性疾病的重要研究方向。

TNF

DNA Damage, H2O2, UV, LPS



p38MAPK

JNK

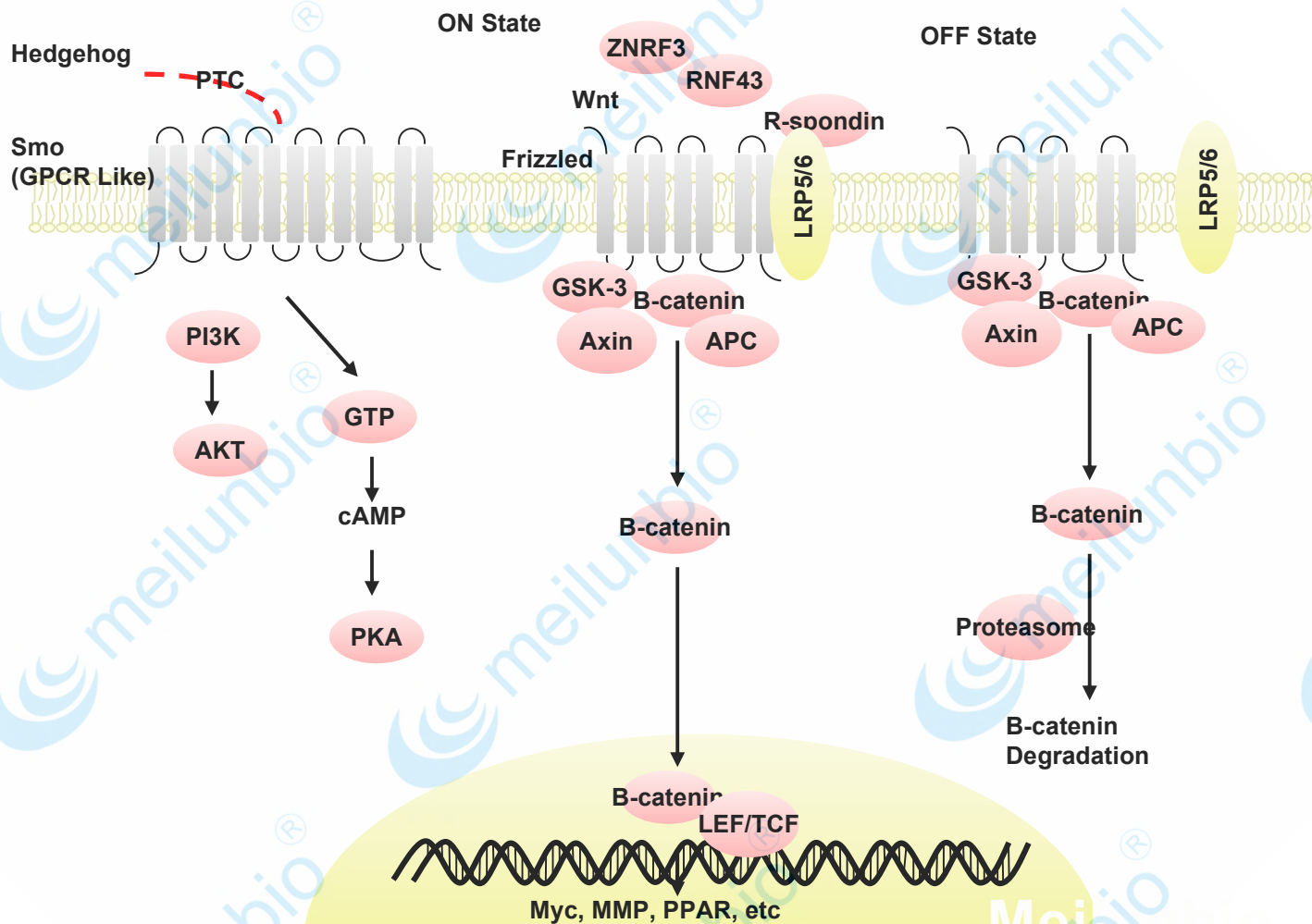
ErbB2

ERK

Stem Cell /Wnt

干细胞是组织器官内重要的特殊细胞。实验证明JAK / STAT、Hedgehog、Wnt、Notch、PI3K 以及 NK- κ B等信号通路可以介导干细胞相关调节，包括例如自我更新、增殖和分化等。Wnt家族包括多种分泌糖蛋白， β -catenin是Wnt信号通路的关键下游效应因子，Wnt/ β -catenin的经典靶标包括CD44、细胞周期蛋白D1、c-Jun、c-Myc、Met和MMP等。

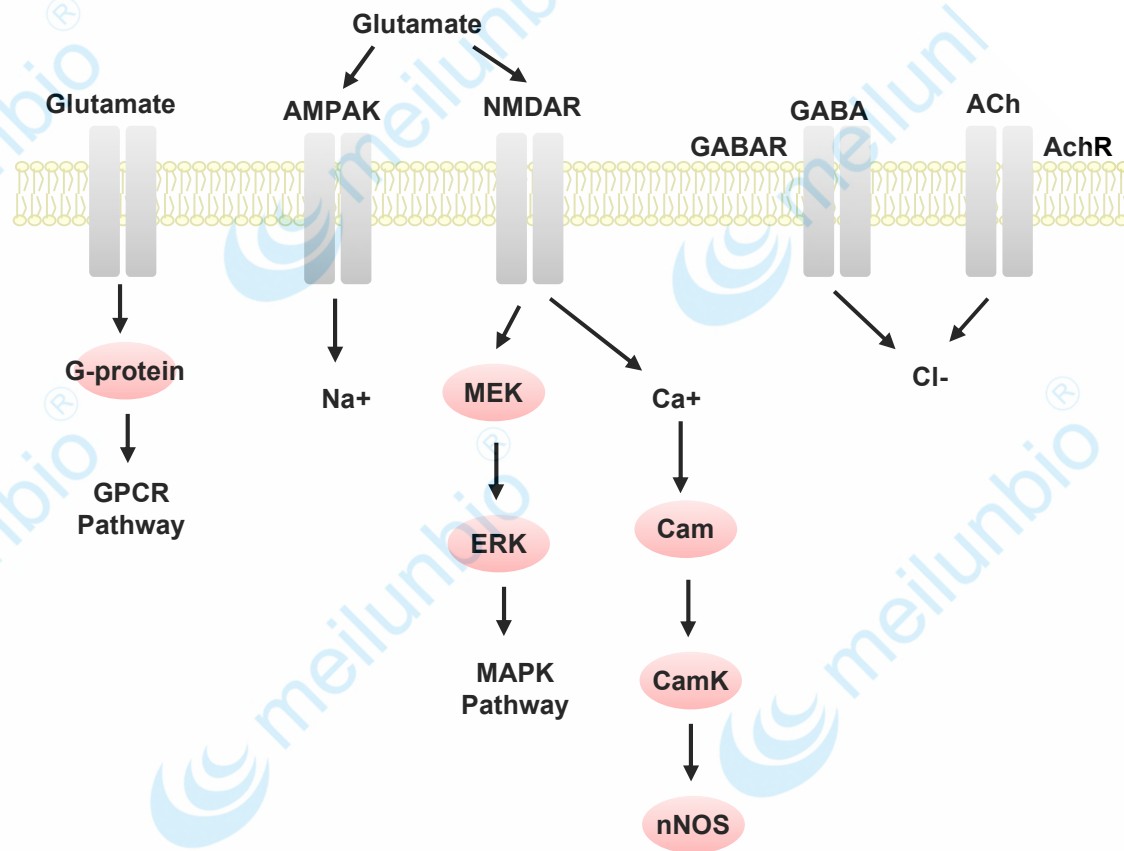
c-Jun
Hedgehog/Smoothened
Hippo pathway
Met
MMP
OCT
Wnt/ β -catenin



Neuronal Signaling

GPCR是神经元信号转导中的重要靶标，受体突变或环境影响引起的GPCR功能障碍导致许多神经疾病。神经元，神经胶质和神经干细胞中的Notch信号传导与中风、阿尔茨海默病等神经性疾病中相关。靶向神经元信号传导，可用于几种不同神经性疾病的治疗干预。

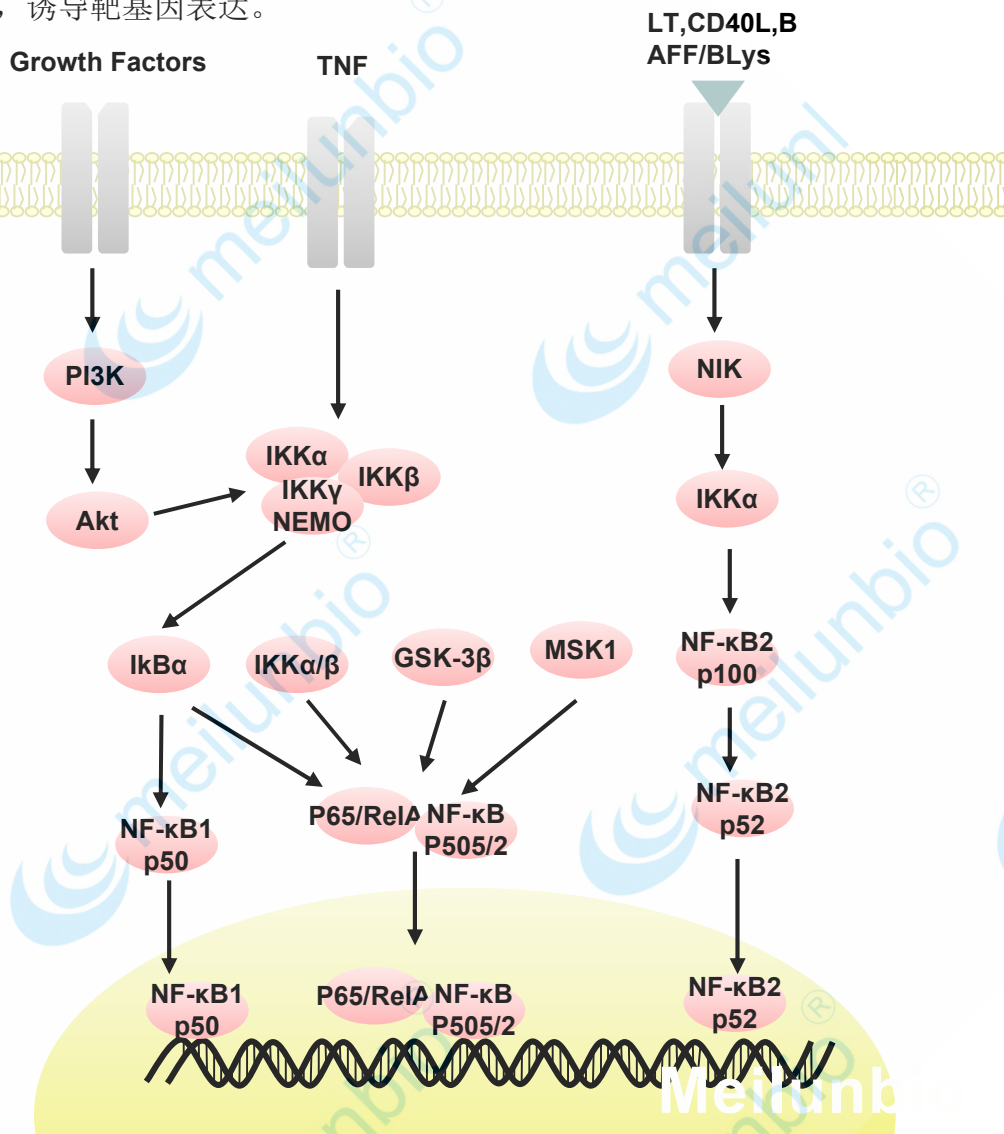
5-HT Receptor
AChR
BACE
Beta-secretase
Beta Amyloid
CaMK
CGRP Receptor
Dopamine Receptor
FAAH
Gamma-secretase
GlyT
iGluR
MAO
Opioid Receptor
Serotonin Transporter



NF-κB

在经典NF-κB信号通路中，生长因子、促炎细胞因子等配体激活IKK复合体，磷酸化与NF-κB/Rel蛋白结合的IκB蛋白，后者自身泛素化导致26S蛋白酶体降解活化NF-κB/Rel，经翻译后修饰转运进入细胞核，在核内单独或联合其他转录因子STAT等诱导靶基因表达。在非经典途径中，信号传导通过受体LTβR、CD40和BR3激活激酶NIK，进而激活IKKα复合体，使NF-κB2 p100的C端残基磷酸化导致自身泛素化，由蛋白酶加工转变为NF-κB2 p52，NF-κB p52/RelB复合体转运入核，诱导靶基因表达。

PKC
TNF-alpha
p38MAPK



TGF- β /Smad

TGF- β 超家族包括TGF- β 、骨形态发生蛋白（BMP）和活化素等相关蛋白，在细胞生长、分化和迁移调节中发挥重要作用。TGF- β 信号通路中配体诱导Ser/Thr受体激酶寡聚化和Smad家族（活化素通路中的Smad2/3和BMP通路中Smad1/5/9）的磷酸化，磷酸化后的Smads与Smad4结合，转运入核。激活的Smads与转录因子结合，调节靶基因转录，达到调节相关细胞生物学行为的目的。Smad6/7可以拮抗R-Smads的激活，作为负反馈调节部分。此外，TGF- β 信号转导还可以影响PI3K和MAPK通路。

PKC
TGF- β /Smad
Bcr-Abl
MEK
Ras

