



蛋白质印迹技术升级版 (WB 2.0) 的概念与设想*

张柳 史佳楠 刘国振**

(河北农业大学生命科学学院, 保定 071001)

摘要 蛋白质印迹技术 (Western blot, WB) 基于抗体的特异性了解蛋白质的表达特征. 该技术已经成为生命科学基础与应用研究的最常用技术之一. 但目前 WB 手工操作多、实验流程难规范、一般只能用于同一 WB 分析内不同样品中目标蛋白质丰度的定性或相对定量, 难以在不同实验室内进行 WB 数据比较. 本文简要回顾了 WB 发展的历程, 提出了升级版蛋白质印迹 (WB 2.0) 的概念, 介绍了包括数字化、标准化、自动化、微量化、通量化以及基于内参的归一化建立数据库等为核心内容的设想. 展望了 WB 2.0 的应用前景, 提出在 WB 2.0 技术大规模应用的基础上, 逐步建立开放的蛋白质表达特征数据库, 成为继基因组、转录组等数据库之后生命科学领域的又一支撑平台.

关键词 蛋白质印迹, WB 2.0, 抗体, 蛋白质表达特征, 蛋白质组学

中图分类号 Q51, Q503

DOI: 10.16476/j.pibb.2019.0140

蛋白质印迹 (Western blot, WB) 是生物学领域最重要的支撑技术之一, 其主要借助抗体的特异性调查蛋白质的表达丰度特征. 蛋白质是生物学功能的主要执行者, 对蛋白质特征的了解是基础和应用生物学研究的重要内容, 在基础研究和应用领域有极为广泛的应用, 但传统的 WB 技术手工操作多、实验流程难规范、只能用于同一 WB 分析内不同样品中目标蛋白质丰度的定性或相对定量分析, 难以在不同实验室内进行 WB 数据的比较, 数据也难以让研究同行直接分享和引用. 生命科学尤其是“组”学的飞速发展, 对蛋白质分析提出了更高的要求, 也给蛋白质分析提供了更大的舞台. 提升 WB 技术体系具有重要的理论意义和应用价值. 本文简要回顾了 WB 发展的历史, 提出了升级版蛋白质印迹 (WB 2.0) 的概念, 介绍了数字化、标准化、自动化、微量化、通量化以及基于内参的归一化、建立数据库等体系建立的设想, 展望了 WB 2.0 的应用前景, 提出在 WB 2.0 技术大规模应用的基础上, 逐步建立开放的蛋白质表达特征数据库, 有可能成为继基因组、转录组等生物信息数据库之后的又一支撑平台.

1 蛋白质印迹技术的发展历程

对生物大分子的分离鉴定技术是生物学研究的基石, 核酸和蛋白质是两类最重要的生物大分子. 1975 年, Southern^[1] 将凝胶分离的 DNA 片段转移到硝化纤维素上, 与放射性标记的互补核酸分子杂交, 通过自显影检测杂交复合物, 由此获得了目标 DNA 有无及片段大小的信息. 两年后, 报道了将电泳分离的 RNA 转移到重氮苄氧甲基 (diazobenzylxymethyl, DBM) 滤纸上的方法, 与 DBM 共价结合的 RNA 可与互补的标记探针杂交, 实现了对 RNA 的检测^[2]. 该技术与 Southern 建立的 DNA 转印技术非常相似, 只是转印的分子为 RNA, 所以把前者称为 Southern blot, 后者称为 Northern blot^[3]. 随后, 将凝胶分离的蛋白质转移到 DBM 纸上, 对蛋白质进行免疫学检测^[4], 此方

* 国家自然科学基金(31171528), 高等学校博士学科点专项科研基金(20131302110006)和河北省植物生理与病理生物学重点实验室资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 0312-7528787, E-mail: gzhliu@hebau.edu.cn

收稿日期: 2019-07-04, 接受日期: 2019-07-23

法被称为 Western blot 而沿用至今^[3].至此,具有里程碑意义的三大转印技术依次登场,30多年来它们在生命科学的舞台上扮演了重要角色.

近年来,由于PCR^[5]及高通量DNA测序技术的发展^[6-8],DNA印迹(Southern blot)的主要用途被逐渐替代,Southern blot一词逐步成为仅存于教科书中的经典.同样地,基于实时定量PCR和测序技术的转录分析具有更高的灵敏度和准确性^[9],也替代了大部分需要进行RNA印迹(Northern blot)的工作.但对蛋白质印迹(Western blot)而言,至今没有真正可替代的技术,随着蛋白质分析需求的增加,在可见的将来,Western blot必将发挥更大的作用.实际上,自WB技术的基本流程提出以来,人们在样品的分离、转印、转印膜的选择、抗体标记、信号放大与检测技术等方面一直在进行持续的改进,使这项技术成为许多生物学实验室的日常操作,并在许多科研文献中大量采用WB数据.近年来,商品化的全自动WB分析仪也已经面世,为WB的升级应用奠定了关键的技术基础.

2 传统WB的局限性

在生命科学文献中,有大量的基于传统WB的图片数据,说明其存在的价值和重要性.但作为一种检测技术,传统WB的局限性仍然十分明显:WB数据一般都是图片展示,是模拟信号,而不是数字信号,不同实验室间WB数据不能直接比较,甚至同一实验室、同一操作者的不同WB间数据也难以直接比较,WB分析人工操作多、流程无统一标准;依据模拟WB信号进行相对比较,大都靠人工判断;数据难以形成研究群体共同接受的、同行可检索查询的数据库等.在过去的20年中,全自动测序仪的快速进步拉动了基因组学甚至整个生物学科的发展,为大规模全景式蛋白质分析奠定了基础,也对蛋白质分析提出更高的要求,所以蛋白质分析技术的改进是今后一段时间必须要解决的关键问题.

3 WB 2.0技术体系的核心内容

要适应生物学发展的需求,就要在发挥WB特点的基础上,对已有的WB进行升级,克服传统WB的局限性.升级版的WB主要内容应该包括:数字化、标准化、自动化、微量化以及基于内参的归一化等,还要能够适应基于WB的数据库建设的需求等.为了与传统的WB进行区分,本文把升级

版的蛋白质印迹体系称为WB2.0.

3.1 数字化

作为一种检测技术,信号的数字化将大大提高其贮存、分享、比较的效率和准确性.WB的检测信号首先来自抗体与抗原的结合,然后是抗体标记、信号放大与检测系统,传统WB获得的信号一般是用X光片检测,获得图片,肉眼判断比较不同泳道的信号值高低或采集X光片上的信号进行量化,所以传统WB数据是一种模拟信号.近年来随着数字成像技术的快速发展,通过电荷耦合器件(charge coupled device, CCD)采集信号^[10],其灵敏度、特异性、线性范围等主要指标均达到或超过了X光片,借助CCD的信号采集过程可以自动进行、也可以重复采集、信号值可以累积并进行背景去除等处理,信号可自动保存和分享.目前,基于CCD的非X光片的信号采集系统已经广泛应用,实现了WB后期信号采集过程的数字化.但是,WB前期抗体与抗原的结合过程仍然是一个非数字化的过程,抗体标记及信号放大也是一个难以数字化的过程,这是由于WB本身特征决定的.虽然整个WB过程难以全流程数字化,但信号采集过程的数字化对数据保存及定量比较仍具有重要的意义,可以实现后期WB检测数据的分享与贮存.

3.2 标准化

传统WB操作流程难以规范,不同实验室间、甚至同一操作者的不同WB实验的结果也难以比较,对关键指标的描述也往往不具体,难以进行重复实验.自动化仪器的出现将有助于此问题的解决.对WB实验的描述中应该包括多项关键的指标,如清晰的样品来源、样品制备方式、上样量、一抗的来源、株号、稀释倍数、二抗来源、数据采集的参数等.Gilda等^[11]提出了关于WB的最基本的信息要求(Western blotting minimal reporting standard, WBMRS)的概念,认为应采用规范的WB报告格式.Uhlen等^[12]也提出了对抗体质量进行验证的具体策略.另外,为了避免误读,发表的WB报告应提供全图,而不仅仅是局部,或者将全图作为附件提供给读者.

3.3 自动化

传统WB主要靠手工完成制胶、上样、转膜、抗体孵育漂洗、显色及信号采集等步骤,一个完整的流程至少需要十几个小时的时间.人为因素的存在,很难保证实验的精确度和准确性.自20世纪80年代前后WB建立,到2010年的30年中,有多项

阶段性的自动化或效率提高的改进, 如预制胶的广泛采用、快速电转膜仪的出现、抗体孵育过程自动化仪器等, 这些技术提高了普通实验室进行WB检测的效率. 2011年, 美国Protein Simple公司发展了基于毛细管SDS-PAGE的全自动蛋白质印迹技术并研发了商业化的仪器. 第一个版本的全自动WB分析仪称为Simon^[13]. 这台机器将WB过程全部自动化, 无需人工制胶跑胶、无需转膜, 全自动完成样品分离、转印、抗体孵育、洗涤以及信号检测和定量, 分析时间也缩短到3~5 h. 另外, 与传统WB相比, Simon的信噪比和线性范围均显著提高, 上样量也大大减少^[14]. 随后几年, Protein Simple公司又发展了可容纳25个样品的Wes版本^[15], 以及容纳96个样品的Sally和Peggy. Sally是基于蛋白质大小进行分离的, Peggy既可根据蛋白质的大小也可根据电荷量进行分离. 接下来, 该公司又推出了改进版的Sally Sue和Peggy Sue, 新的版本使蛋白质分离的分子质量相对标准误差小于2%, 相对定量的丰度相对标准误差小于15%, 而传统WB的相对定量误差一般大于30%^[16]. 此外, Protein Simple公司还有一款专门基于电荷分离蛋白质的版本Nanopro 1000, 该仪器可在14 h内完成96个样品的分析, 而传统的等电聚焦仪分析12个样品就需要2 d, 该技术对蛋白质翻译后修饰的检测具有强大的功能^[17-19].

全自动WB分析仪的出现开始了“一键WB”时代, 相信在不远的将来即可与全自动的上样系统及数据处理系统相配合, 这样可以极大地提高WB的通量、精度和标准化程度. 毫无疑问, 全自动WB仪的广泛应用将催生WB数据库的建设.

3.4 微量化

传统WB一般要对微克级的蛋白质进行分析, 随着生物学分析中对精密度要求的提高, 尤其是对某些难以获得的样品而言, 微量化具有特别重要的意义. 上述Protein Simple公司的自动化仪器可较传统的手工操作减少上样量, 提高分析的灵敏度. 目前, 单细胞基因组和转录组技术都取得了实质性进展并开展了应用^[20-22], 而蛋白质组学技术还相对滞后, 但近年来也取得了一些进展, 利用WB实现了对1 000个以上蛋白质分子的检测, 可以说WB也开始进入单细胞时代.

3.5 通量化

后基因组时代为蛋白质分析提供了广阔的舞台, 也提出了更高的要求. 人类有2万多个蛋白质,

如果考虑不同的修饰和不同的拼接体, 则需要检测的蛋白质数量有多个数量级的增加. 蛋白质组学的目标就是了解所有蛋白质的信息, 就像全基因组测序和转录组分析一样, 对高通量蛋白质分析的需求会越来越大. 传统WB每次只能分析10~15个样品, 需要花费十几个小时的时间, 这样的通量显然难以适应“组”学时代发展的要求. 阶段性的自动化分析, 如预制胶、转膜仪等能部分地提高WB的通量, 减轻人力成本, 但也很难实现真正的高通量分析. 只有在全自动化技术的基础上才能真正实现高通量. 正是因为实现了高通量, DNA测序和转录组目前已经成为生物学研究中比较常规的技术, 蛋白质分析的对象远较DNA和转录信息更为丰富, 改进技术、提升WB的通量是非常必要的.

3.6 基于内参的归一化

由于WB分析过程的相对定量特性, 要比较不同WB分析间的信号只能通过设置内参进行比较. 根据不同的目的, 应该有3种类型的内参: a. 上样内参 (loading reference, LR) 用来标定上样量, 比较同一WB内不同样品间的信号. 在传统WB分析中, 不同泳道信号值的相对比较往往是建立在总蛋白质上样量一致基础上的, 所以需要通过对染或上样内参标定上样量. 但实际上, 对多种处理条件的样品而言, 不同批次提取的蛋白质样品以及不同实验者、不同实验室提取的蛋白质样品, 上样量的一致性是很难实现的过程. 此时上样内参就能发挥一个标尺作用, 好的上样内参应该与总蛋白质质量具有线性相关性, 且在多种组织中都稳定性表达. 这样可根据上样内参标定总蛋白质, 此时的WB不必再追求总蛋白质质量的一致性, 可根据内参的信号值计算拉平总蛋白质上样量或标定总蛋白质上样量. 本实验室几年前鉴定到一个水稻的内参蛋白质HSP82^[23], 已经在水稻甚至其他植物蛋白质分析中都得到了广泛的应用, 方便了同行的研究工作^[24-26]. 最近, 本实验室又报道了莱茵衣藻在多种胁迫处理条件下的内参蛋白质^[27]. b. 共同内参 (common reference, CR), 置于每个不同的WB分析中, 用于比较不同WB分析间样品的信号, 共同内参是一个特定的蛋白质样品, 由于每次WB分析中都有共同内参的信号, 其信号值就可用于标定其他样品的信号值. 共同内参选择的一般原则应为: 样品容易获得、样品制备条件比较容易重复、样品容易被研究同行广泛接受、样品中表达的蛋白质种类比较多等. 本实验室在水稻蛋白质研究中用幼苗

期总蛋白质作为共同内参, 较好地实现了设计目标^[28]. c. 目标蛋白质的标准参照样品 (standard reference, SR), 可用于对特定蛋白质进行绝对定量分析. 通过参照品的WB绘制标准曲线, 从而对目标蛋白质在总蛋白质中的含量进行定量分析, 进而获得目标蛋白质在总蛋白质中所占比例的信息. 本实验室以大肠杆菌表达的目标蛋白质为标准品, 依据建立的标准曲线, 测定了HSP82^[23]、CAS9^[29]、PMI^[30]和CP4-EPSPS^[31]、NPT-II^[32]等蛋白质在水稻样品中的含量.

3.7 数据共享和数据库

按照WB 2.0的理念, 在数字化、标准化的基础上, 经内参系统归一化的WB数据就可以按标准格式存储、共享, 随着数据的积累, 基于WB的数据库就会像DNA数据库和转录数据库一样, 方便同行查阅、比较, 并逐步丰富成为基于表达特征的图集. 要建立这样一个基于WB的数据库, 需要大量的抗体资源和生物样品. 目前, 针对人的蛋白质抗体资源已经有丰富的积累, Uhlen教授实验室^[33]已经系统地制备了18 000个人蛋白质抗体, 并利用多种人的病理样本, 建立了免疫组化数据库. 在其他模式动物中也有大量的抗体积累, 甚至对某些重要的蛋白质有多个不同用途的抗体. 在植物中, 本

实验室2011年提出了水稻抗体资源库的理念, 并开展了高通量制备水稻蛋白质特异抗体的实践, 现在已经完成了1 700个水稻蛋白质抗体. 美国PhytoAB公司中也积累了约3 000种拟南芥蛋白质的抗体 (<http://www.phytoab.com>), 在其他植物中也有一些抗体资源积累的工作. 目前人们对生物样品资源积累越来越重视, 只有可靠的样品, 才可能有可靠的结果, 只有足够多可靠的样品, 才有可能获得有价值的结果. 我们以苗期水稻为材料, 建立了非生物胁迫的样品资源库RiceS-A300^[28]. 在此基础上, 可以逐步丰富资源库的内容. 2017年, 美国及多国科学家联合启动的“人类细胞图谱计划”(human cell atlas, HCA), 设想系统地描绘人体中每种细胞的图谱, 并由此应用于疾病诊断、监测和治疗, 其中需要大量可靠的样品^[34]. Facebook创始人马克·扎克伯格出资支持这项计划, 并将其与“人类基因组计划”媲美^[35]. 2018年, 浙江大学医学院郭国骥教授团队^[36]报道了对小鼠50种器官40余万个细胞进行了系统性的单细胞转录组分析, 构建了哺乳动物细胞图谱. 该项目中, 分离单细胞并保证样品的可靠性是关键技术.

为清晰起见, 表1中对传统WB的局限性和WB 2.0的提升进行了对比罗列.

Table 1 Comparison of key features between conventional WB and WB 2.0

表1 传统WB和WB 2.0的比较

传统WB的局限性	WB 2.0的提升
数字化 一般只进行定性比较.	采集信号强度, 进行定量比较.
标准化 流程由操作人员自定, 重要参数不一定描述.	需要提供所有的重要参数, 采用规范的报告格式, 展示全图.
自动化 完全手工操作, 一个流程需要十几个小时的时间.	有阶段性和全自动化的WB相关仪器, “一键WB”是未来的方向.
微量化 一般需要微克级的总蛋白质进行分析.	需要的样品量少, 甚至可实现对数千个蛋白质分子的检测.
通量化 每个流程只能分析10~15个样品, 通量低.	自动化可大大提高通量, 通量化才能加快数据积累的速度.
基于内参 一般只展示等量上样的证据, 但往往不是同一组样品的数据, 也不进行基于内参信号的数据比较.	设立3种内参: a. 上样内参, 标定不同泳道间的上样量; b. 共同内参, 标定不同WB间的信号强度; c. 目标蛋白质的标准参照样品, 通过绘制标准曲线对目标蛋白质进行定量分析.
数据共享 不同实验室间的数据难以比较, 共享的只是结果.	数据经过了校准和归一化, 数据间可以比较, 数据可以共享.
数据库 没有相应的数据库.	建立公共数据库, 供同行及相关方分析和参考.

4 WB 2.0的应用展望

传统的WB是蛋白质研究中最基础的检测技术之一, 升级版WB 2.0的核心仍是基于蛋白质分离

后的免疫学反应, 升级后数据的规范性、适用性、共享性、可读性都有显著提高. 所以, 升级版蛋白质印迹WB 2.0具有更为重要的理论意义和应用价值. 以下简要说明几个可能的应用方向.

4.1 目标蛋白质在大范围样品中的丰度分析及比较

与传统 WB 的少数样品结果不同, 在 WB2.0 体系中, 通过对大量不同时空条件下蛋白质样品的分析, 利用内参对数据进行归一化计算, 可以对不同样品中的特定蛋白质丰度进行分析及比较, 了解目标蛋白质在不同组织部位、不同发育时期、不同处理条件下的丰度变化, 而丰度及其变化的信息与蛋白质功能具有密切的相关性。

4.2 不同蛋白质的丰度及表达特征的相关性分析

对不同蛋白质在同一组蛋白质样品中的表达特征进行分析, 可以分析蛋白质间的相关性, 蛋白质表达的相关性对了解不同蛋白质之间的功能相关性具有很重要的参考价值, 也能为蛋白质-蛋白质相互作用分析提供重要的线索。

4.3 数据库建设与数据挖掘

大量的、规范的 WB 数据会催生相应的数据库建设, 这样的数据库可供同行参考、引用, 可能成为与基因组、转录组数据库比肩的又一生命科学基础与应用研究的支撑平台。这个数据库涵盖多种蛋白质、多种蛋白质样品的 WB 数据, 并会不断地丰富, 从中可以挖掘大量有价值的信息。在此基础上, 开发应用软件, 对 WB 数据进行深度分析挖掘, 如根据条带位置的变化推测可能的修饰和降解、根据条带的数目推测不同蛋白质拼接体的存在和功能、根据等电点的变化推测修饰等。由于蛋白质修饰、降解、以及不同拼接体等原因, WB 分析获得的表观分子质量经常与蛋白质的理论分子质量不符, 但表观分子质量特征仍然是一个非常重要的蛋白质特征。蛋白质翻译后修饰决定着多种功能, 修饰过程往往会发生分子质量的变化, 通过提高 WB 的分辨率可以获得蛋白质修饰的证据, 甚至通过修饰特异抗体进行 WB 分析, 可以直接检测蛋白质修饰。在基因的转录过程中, 往往一个基因有多种转录本, 它们是选择性拼接的结果, 相应地, 基于这些不同的转录本也会形成不同的蛋白质的选择性拼接体^[37]。不同的拼接体可能出现在不同的时空条件下, 并发挥不同的功能。通过 WB 了解蛋白质的拼接体, 了解拼接体的表达特征。蛋白质经常通过被剪切而发挥功能, 蛋白质的存在丰度是合成与降解达到平衡的结果, 对剪切及降解过程的监测也是蛋白质表达特征的重要内容。

4.4 基于WB的靶向蛋白质组分析

靶向蛋白质组是对特定功能、结构或代谢途径

相关的一类蛋白质分析的技术。基于质谱的靶向蛋白质组策略, 如 MRM 等也已经提出并开展了应用^[38]。与基于质谱的靶向蛋白质组学技术相比, 在 WB2.0 基础上对靶向蛋白质的蛋白质印迹分析是一种简捷、有效、直观的策略。不同的靶向蛋白质策略可以相互参照印证, 从不同的角度了解特定蛋白质的功能、了解具体生命过程的机理。

4.5 蛋白质对胁迫反应的应答分析

从胁迫应答的角度来看, 不同的胁迫处理间既有重叠的蛋白质, 也涉及特异的蛋白质, 同一蛋白质在不同胁迫处理间表达特征的区别暗示其功能的不同, 基于 WB 2.0 的分析将为胁迫反应应答机理研究提供一种强有力的手段。

4.6 用于疾病诊断和标志物挖掘

传统 WB 虽然大量应用于基础研究中, 由于操作流程不标准, 数据难以进行横向比较, 很难直接用于疾病的诊断。建立在 WB2.0 基础上的数据, 可以在很大程度上解决这些问题, 有望应用于疾病诊断和标志物的挖掘工作。

综上所述, 生命科学的发展对蛋白质分析提出了更高的要求, 与基于质谱的蛋白质组学分析相比, 基于抗体的 WB 分析靶向性强、灵敏度高、结果直观、操作简便、不需要昂贵的质谱仪, 抗体还可用于免疫沉淀、免疫组化、CHIP 等实验, 并可比较方便地转化为 ELISA 试剂盒用于临床诊断等。WB 2.0 是对传统 WB 技术的提升, 但一些源自 WB 的限制因素并不能靠 WB 2.0 加以克服。a. 可靠的 WB 需要质量和可供应性都可靠的抗体, 可靠的抗体又需要建立在对大量抗体进行筛选鉴定的基础; b. WB 2.0 的数字化是后期数据阶段的数字化, 但前期抗体与抗原的结合过程是一个非数字化的过程, 只有全流程的数字化才是真正的数字化; c. 通量化需要大量稳定的蛋白质样品, 由于蛋白质本身的特性, 任何分装、冻融过程都会影响蛋白质的稳定, 蛋白质的稳定性理论上很难做到, 所以标准化也是相对的; d. 建立在 WB 2.0 基础上的蛋白质表达数据库建设是一个长期的、艰巨的工作, 即使依靠目前自动化的 WB 分析仪器仍然需要大量的人力物力, 只能是阶段性的持续推进的过程, 需要新一代更高通量仪器才能实现数据量级的提升, 其中, WB 自动分析仪的国产化则是中国科技人员需要面对和克服的挑战。

本文从 WB 和生命科学发展的角度, 结合本实验室的工作积累和思考, 系统地提出了升级版蛋白

质印迹的概念, 阐述了核心内容, 并初步提出了其应用的前景, 全自动蛋白质印迹分析仪的问世初步奠定了WB 2.0的技术基础和可能, 技术进步将不断回应学科发展的需求. 相信WB这棵“老树”、“大树”能适应更高的需求, 结出新的硕果, 为生命科学发展做出更大的贡献. WB系出名门, 历经40年从未淡出, 无可替代, 未来更将不可限量.

参 考 文 献

- [1] Southern E M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, 1975, **98**(3): 503-517
- [2] Alwine J C, Kemp D J, Stark G R. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, **74**(12): 5350-5354
- [3] Burnette W N. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*, 1981, **112**(2): 195-203
- [4] Renart J, Reiser J, Stark G R. Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, **76**(7): 3116-3120
- [5] Mullis K, Faloona F, Scharf S, *et al.* Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1986, **51**(Pt 1): 263-273
- [6] Green E D, Watson J D, Collins F S. Human genome project: twenty-five years of big biology. *Nature*, 2015, **526**(7571): 29-31
- [7] Moraes F, Goes A. A decade of human genome project conclusion: Scientific diffusion about our genome knowledge. *Biochem Mol Biol Educ*, 2016, **44**(3): 215-223
- [8] Boeke J D, Church G, Hessel A, *et al.* Genome engineering. The genome project-write. *Science*, 2016, **353**(6295): 126-127
- [9] Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*, 2009, **10**(1): 57-63
- [10] Strijkstra A, Trautwein K, Roesler S, *et al.* High performance CCD camera system for digitalisation of 2D DIGE gels. *Proteomics*, 2016, **16**(14): 1975-1979
- [11] Gilda J E, Ghosh R, Cheah J X, *et al.* Western blotting inaccuracies with unverified antibodies: need for a western blotting minimal reporting standard (WBMRs). *PLoS One*, 2015, **10**(8): e0135392
- [12] Uhlen M, Bandrowski A, Carr S, *et al.* A proposal for validation of antibodies. *Nat Methods*, 2016, **13**(10): 823-827
- [13] Nguyen U, Squaglia N, Boge A, *et al.* The simple western™: a gel-free, blot-free, hands-free western blotting reinvention. *Nat Methods*, 2011, **8**: 982-982
- [14] Rustandi R R, Loughney J W, Hamm M, *et al.* Qualitative and quantitative evaluation of Simon, a new CE-based automated Western blot system as applied to vaccine development. *Electrophoresis*, 2012, **33**(17): 2790-2797
- [15] Wang J, Valdez A, Chen Y. Evaluation of automated wes system as an analytical and characterization tool to support monoclonal antibody drug product development. *J Pharmaceut Biomed*, 2016, **139**: 263-268
- [16] Xu D, Mane S, Sosic Z. Characterization of a biopharmaceutical protein and evaluation of its purification process using automated capillary Western blot. *Electrophoresis*, 2015, **36**(2): 363-370
- [17] Harris V M. Protein detection by simple Western™ analysis. *Methods in Mol Biol*, 2015, **1312**: 465-468
- [18] Markely L R, Cheung L, Choi Y J, *et al.* A high-throughput capillary isoelectric focusing immunoassay for fingerprinting protein sialylation. *Biotechnol Prog*, 2016, **32**(1): 235-241
- [19] Siggers P, Carre G A, Bogani D, *et al.* A novel mouse Fgf2 mutant, hobbyhorse (hob), exhibits complete XY gonadal sex reversal. *PLoS One*, 2014, **9**(6): e100447
- [20] Kang C C, Yamauchi K A, Vlassakis J, *et al.* Single cell-resolution Western blotting. *Nat Protoc*, 2016, **11**(8): 1508-1530
- [21] Hughes A J, Spelke D P, Xu Z, *et al.* Single-cell Western blotting. *Nat Methods*, 2014, **11**(7): 749-755
- [22] Kang C C, Lin J M, Xu Z, *et al.* Single-cell Western blotting after whole-cell imaging to assess cancer chemotherapeutic response. *Anal Chem*, 2014, **86**(20): 10429-10436
- [23] Li X, Bai H, Wang X, *et al.* Identification and validation of rice reference proteins for Western blotting. *J Exp Bot*, 2011, **62**(14): 4763-4772
- [24] Zhou F, Lin Q, Zhu L, *et al.* D14-SCF(D3)-dependent degradation of D53 regulates strigolactone signalling. *Nature*, 2013, **504**(7480): 406-410
- [25] Tian X, Li X, Zhou W, *et al.* Transcription factor OsWRKY53 positively regulates brassinosteroid signaling and plant architecture. *Plant Physiol*, 2017, **175**(3): 1337-1349
- [26] Wu B, Zhang B, Dai Y, *et al.* Brittle culm15 encodes a membrane-associated chitinase-like protein required for cellulose biosynthesis in rice. *Plant Physiol*, 2012, **159**(4): 1440-1452
- [27] Shi J, Huang T, Chai S, *et al.* Identification of reference and biomarker proteins in chlamydomonas reinhardtii cultured under different stress conditions. *Int J Mol Sci*, 2017, **18**(8): 1808-1822
- [28] Zhang J S, Zhang T, Chen Y, *et al.* The establishment and application of rice protein sample library RiceS-A300. *Sci Agric Sinica*, 2018, **51**(19): 3625-363
- [29] Guo Y L, Shi J N, Zhang L, *et al.* Western blot detection of CAS9 protein in transgenic rice. *Sci Agric Sinica*, 2017, **50**(19): 3631-3639
- [30] Rong R J, Wu P C, Lan J P, *et al.* Western blot detection of PMI protein in transgenic rice. *J Intergr Agric*, 2016, **15**(4): 726-734
- [31] 柴帅杰, 武鹏程, 荣瑞娟, 等. 转基因水稻中CP4-EPSPS蛋白质的检测及其表达特征研究. *核农学报*, 2017, **31**(1): 44-50
Chai S J, Wu P C, Rong R J, *et al.* *J Nuclear Agric Sci*, 2017, **31**(1): 44-50
- [32] 兰金苹, 武鹏程, 郭美岑, 等. NPT II 蛋白质在转基因水稻中的

- 表达特征研究. 生物化学与生物物理进展, 2015, **42**(3): 268-276
- Lan J P, Wu P C, Guo M C, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2015, **42**(3): 268-276
- [33] Uhlen M, Oksvold P, Fagerberg L, *et al.* Towards a knowledge-based human protein atlas. Nat Biotechnol, 2010, **28**(12): 1248-1250
- [34] Rozenblatt-Rosen O, Stubbington M J T, Regev A, *et al.* The human cell atlas: from vision to reality. Nature, 2017, **550**(7677): 451-453
- [35] Regev A, Teichmann S A, Lander E S, *et al.* The human cell atlas. eLife, 2017, **6**: e27041
- [36] Han X, Wang R, Zhou Y, *et al.* Mapping the mouse cell atlas by microwell-seq. Cell, 2018, **172**(5): 1091-1107
- [37] Pang Z, Zhou Z, Yin D, *et al.* Transgenic rice plants overexpressing BBTI4 confer partial but broad-spectrum bacterial blight resistance. J of Plant Biol, 2013, **56**(6): 383-390
- [38] Addona T A, Abbatiello S E, Schilling B, *et al.* Multi-site assessment of the precision and reproducibility of multiple reaction monitoring-based measurements of proteins in plasma. Nat Biotechnol, 2009, **27**(7): 633-641

The Concept of an Advanced Version of Western Blot (WB 2.0) and Its Perspectives*

ZHANG Liu, SHI Jia-Nan, LIU Guo-Zhen**

(College of Life Sciences, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, China)

Abstract Western blot (WB) is widely used to investigate the expression profiling for target proteins, which depends on the specific binding with antibodies and it is a fundamental technique in basic and application field of life science. However, traditional WB technique involves many manual steps, it is difficult to set up standard operational protocols. In most of the cases, it is used only within same WB analysis for the abundance investigation of target proteins qualitatively or relative quantitatively, while problematic to carry out comparison among different laboratories. In the current paper, after a summarized historical review of WB development, the concept of advance version of WB (WB 2.0) was proposed. The key components for the design and practical steps including digitalization, standardization, automation, micro-quantification, high through-put, reference-based normalization and database establishment were presented. In perspective, the application of WB 2.0 will activate the establishment of a public accessible protein expression database, which will be another supporting platform for life science succeeding the recognized genome and transcriptome databases.

Key words Western blot, WB 2.0, antibody, protein expression profiling, proteomics

DOI: 10.16476/j.pibb.2019.0140

* This work was supported by The National Natural Science Foundation of China (31171528), Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education (20131302110006) and Key Laboratory of HebeiProvince for Molecular Plant-Microbe Interaction.

** Corresponding author.

Tel: 86-312-7528787, E-mail: gzhliu@hebau.edu.cn

Received: July 4, 2019 Accepted: July 23, 2019