

## HIF-1 alpha

### Western Blot

<https://www.abcam.com/protocols/general-western-blot-protocol>

#### 靶标概述

HIF-1 alpha 只在含氧量低于 5%的情况下稳定表达。在正常含氧情况中，HIF-1 alpha 半衰期很短，并且在细胞核和胞质中 5-8 分钟内即被降解。因此，**合适的样本制备**对于 WB 实验的成功至关重要。如果样本制备方法不当则有可能在印记实验中出现无条带的结果。

#### 以下有一些小贴士，有助于获得理想的 WB 实验结果：

|      |   |
|------|---|
| 样本制备 | ● 添加足够量的 <b>蛋白酶抑制剂</b> （或对于磷酸化修饰蛋白添加足量磷酸酶抑制剂）以避免靶标蛋白降解。 |
|      | ● <b>超声破碎</b> 处理细胞以富集靶标蛋白。                              |
|      | ● 整个样本制备过程中，保持 <b>样本置于冰上</b> 。                          |
|      | ● 通过 Bradford 分析、Lowry 分析或 BCA 分析测定 <b>样本蛋白浓度</b> 。     |
| 电泳   | ● 对于分子量较大的靶标蛋白（如分子量>100 kDa），请使用 8%或更低浓度的分离胶进行电泳。       |
|      | ● 至少上样 <b>50µg 总蛋白</b> 进行电泳。                            |
|      | ● 我们强烈建议您在进行新的 WB 实验时使用 <b>阳性裂解液</b> 作为对照。              |
| 转膜   | ● 对于分子量较大的靶标蛋白，我们建议您在转膜液中加入 SDS 至终浓度为 0.1%。             |
|      | ● PVDF 膜激活完成后充分清洗， <b>完全去除甲醇</b> 。                      |
|      | ● 强烈建议转膜完成后使用 <b>丽春红染色</b> ，确定转膜是否成功。                   |

#### 以下有一些注意事项，有助于获得更好的 WB 实验结果：

- ✓ 可以通过使用**低氧培养箱**过夜培养细胞来诱导 HIF-1 alpha 高表达。
- ✓ 从低氧环境中取出的细胞需尽快（最好 2 分钟内）完成裂解操作。
- ✓ 实验过程中使用**阳性对照样本**，如 DFO or CoCl<sub>2</sub> 处理的细胞核裂解液。
- ✓ 一抗 **4°C 孵育过夜**也会有所帮助。
- ✓ 由于 HIF-1 alpha 的多种存在形式，在 WB 中检测到 93 kDa 以外的其他条带并不罕见，比如：
  - **40-80 kDa** -降解的 HIF-1 alpha
  - **110-130 kDa** -翻译后修饰的 HIF-1 alpha
  - **~200 kDa** - HIF-1 alpha 和 HIF-1 beta 形成的异二聚体

|      |   |
|------|---|
| 蛋白功能 | <p>HIF-1 alpha 是一种缺氧或者低氧适应反应的重要转录调控因子。在缺氧条件下，HIF-1 alpha 可以激活超过 40 个基因，这些基因的蛋白产物会提高氧气运输或者加强对缺氧环境的代谢适应性。</p> <p style="text-align: right;"><a href="#">SwissProt: Q16665</a></p>   |
| 组织表达 | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 大部分组织和细胞（缺氧状态下）</li> <li>- 肾脏和心脏中高表达</li> <li>- 在绝大多数肿瘤组织中过度表达</li> </ul> <p>由于在含氧量正常的情况下，HIF-1 alpha 无法被检测到。通常在测试前我们需要对大部分正常细胞和组织进行诱导缺氧。在大部分肿瘤组织，缺氧状态不需要被诱导，因为在肿瘤组织的微环境中缺氧很常见。</p> <p style="text-align: right;"><a href="#">PMID: 1850121</a> / <a href="#">PMID: 11689469</a></p> |
| 细胞定位 | <p>在含氧量正常的情况下，蛋白定位于胞质<br/>在缺氧环境下蛋白转移入细胞核</p> <p style="text-align: right;"><a href="#">PMID: 9822602</a></p>  |
| 异构体  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 异构体 1: 93 kDa（预测）</li> <li>- 异构体 2: 83 kDa（预测）</li> <li>- 异构体 3: 96 kDa（预测）</li> </ul> <p>由于 HIF-1 alpha 存在多种异构体，在 WB 中检测的条带大小并非正好是 93 kDa。</p>  |
| 修饰   | <p>S-亚硝基化，磷酸化，类泛素化修饰, 乙酰化，多泛素化，羟基化</p> <p>由于 HIF-1 alpha 存在多种转录后修饰，在 WB 中检测的条带大小并非正好是 93 kDa。</p>   |
| 阳性对照 | <p><b>WB:</b> 缺氧处理的样品，如 DFO（去铁胺）处理的 HeLa 全细胞裂解液 <a href="#">ab116322</a>。</p> <p>如需获得更强的信号，推荐使用 DFO 处理的细胞核裂解液 <a href="#">ab180880</a>。细胞组分分离试剂盒也可以独立购买 <a href="#">ab109719</a>。</p>   |
| 阴性对照 | <p>除了肾脏和心脏以外的含氧量正常的组织。</p>  |
| 处理   | <p>CoCl<sub>2</sub> 或者 DFO 诱导缺氧。 <span style="float: right;"><a href="#">PMID: 3217626</a></span></p> <p>蛋白酶抑制剂如 MG132 可以稳定 HIF-1 alpha。 <span style="float: right;"><a href="#">PMID: 19347037</a></span></p>  |