

血清刺激诱导 A549 细胞 p44/42 MAPK 磷酸化的 Western blot 检测

张家赫^{1*}

^{1*} 第一临床医学院, 天津医科大学, 中国.

Abstract

p44/42 mitogen-activated protein kinase (MAPK), 即 ERK1/2, 是 Ras-Raf-MEK-ERK 信号轴的核心效应激酶, 其活化主要表现为特定位点磷酸化水平升高。本实验以 A549 人肺腺癌细胞为对象, 通过无血清培养降低基础 ERK1/2 磷酸化背景, 再以 5% fetal bovine serum (FBS) 短时刺激 15 min, 采用 SDS-PAGE、PVDF 半干转膜、特异性抗体孵育及 ECL 化学发光检测磷酸化 p44/42 MAPK, 并以约 40 kDa 的内参蛋白作为上样与转膜参照。课堂采用两组共用一块胶、同一样品平行重复上样的布局, 使同一块胶转膜后可分别检测 phospho-p44/42 MAPK 与内参。实际曝光图显示, 两块胶中均可观察到与 Control/FBS 交替上样顺序相符的信号差异: FBS 对应泳道的磷酸化 p44/42 MAPK 信号明显强于相邻无血清 Control 泳道, 而内参条带整体较为一致。较长曝光能够显示弱信号, 但伴有明显过曝、背景升高及非特异条带; 较短曝光条带边界更清楚, 但低丰度磷酸化信号较弱。结果支持 5% FBS 短时刺激可迅速增强 A549 细胞 p44/42 MAPK/ERK1/2 磷酸化, 提示 ERK 通路被快速激活。由于现有结果为课堂成像屏幕照片, 缺少原始 TIFF、明确的软件泳道标注及灰度定量, 本实验仅作定性判读, 不计算倍数变化和统计学差异。

Keywords: A549; p44/42 MAPK; ERK1/2; 血清刺激; 蛋白磷酸化; Western blot

实验信息

学号 2024193112

年级 2024 级

院系 第一临床医学院

专业 临床医学 (儿科学, “5+3” 一体化)

实验时间 2026 年 9 月 23 日—2026 年 9 月 24 日

1 引言

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) 通路能够把细胞外生长因子、细胞因子和其他促有丝分裂刺激转化为细胞内磷酸化级联反应。经典 Ras-Raf-MEK-ERK 通路中, MEK1/2 可磷酸化并激活 ERK1/2; ERK1 与 ERK2 的表观分子量约为 44 kDa 和 42 kDa, 因此也常称为 p44/42 MAPK。活化后的 ERK1/2 可作用于多种胞质和核内底物, 参与增殖、存活、迁移、分化和转录调控等过程。[2] [3]

与检测总 ERK 蛋白含量相比, 检测 phospho-ERK 更适合反映短时间尺度上的通路活化。细胞经过 serum starvation 后, 外源生长因子刺激减少, 基础 ERK 磷酸化通常下降; 随后给予血清或其他 mitogen 刺激, 可在分钟级快速诱导 ERK 磷酸化。因此, “无血清预处理—短时刺激—检测 phospho-ERK” 是研究快速细胞信号转导的经典实验设计。已有 A549 细胞研究也常在 serum starvation 后给予短时刺激并以 Western blot 检测 ERK 磷酸化。[2] [4]

Western blot 的基本逻辑包括三个连续层次: 首先通过 SDS-PAGE 按分子量分离蛋白, 其次把凝胶中的蛋白电转移至 PVDF 等固相膜, 最后利用一抗识别目标蛋白、HRP 标记二抗与 ECL 底物产生化学发光信号, 从而显示特异性条带。内参蛋白用于判断各泳道上样量和转膜情况是否大致可比; 对于 phospho-protein 检测, 只有在上样与转膜基本一致的前提下, 处理组与对照组信号强弱才具有合理的比较意义。[5] [6]

本实验旨在通过 5% FBS 短时刺激 A549 细胞, 利用 Western blot 观察 p44/42 MAPK 磷酸化水平变化, 理解 serum starvation、平行上样、PVDF 转膜、抗体特异性识别和 ECL 曝光等关键步骤, 并根据真实课堂结果判断血清刺激是否能够快速激活 ERK1/2 信号通路。[1]

2 材料与方法

2.1 实验设计与样品处理

实验使用 A549 人肺腺癌细胞。蛋白样品由教师在课前完成细胞处理与提取, 本次课堂主要完成 Western blot 后续流程。Control 组细胞采用无血清培养约 4 h; FBS 组在无血清处理后加入 5% FBS, 继续刺激 15 min。蛋白样品加入上样缓冲液后于 95°C 加热约 10 min。课堂上样时蛋白样品约 20 μ L/孔, protein marker 约 10 μ L/孔。[1]

2.2 SDS-PAGE 与平行泳道设计

将蛋白样品加入聚丙烯酰胺凝胶进行 SDS-PAGE 分离。课堂共使用 4 块胶, 其中男生组和女生组各使用 2 块; 每块胶由两个学生实验组共同使用, 但两个学生组各自占据独立的 Control/FBS 泳道。

由于本实验需要分别检测 phospho-p44/42 MAPK 和一个分子量同样位于约 40 kDa 区域的内参蛋白, 教师采用平行重复上样设计。每块胶的基本泳道顺序为:

组 1 Control $\rightarrow$ 组 1 FBS $\rightarrow$ 组 2 Control $\rightarrow$ 组 2 FBS $\rightarrow$ Marker $\rightarrow$ Marker $\rightarrow$ 组 1 Control $\rightarrow$ 组 1 FBS $\rightarrow$ 组 2 Control $\rightarrow$ 组 2 FBS。

因此, 同一学生组的 Control/FBS 样品在同一块胶上各出现两套; 两套样品并非独立生物学重复, 而是为了转膜后分别孵育不同一抗。[1]

2.3 PVDF 半干转膜与裁膜

电泳结束后去除凝胶无关边缘，并通过切角对不同凝胶作身份标记。PVDF 膜先经甲醇活化，再与滤纸、凝胶共同在 transfer buffer 中平衡。按照课堂“滤纸—PVDF 膜—凝胶—滤纸”的半干转膜夹层顺序组装，25 V 转膜 30 min。转膜后依据预染 protein marker 判断转膜是否基本成功。 [1]

PVDF 经 5% 脱脂奶粉封闭约 1 h 后，先沿分子量方向裁去目标区段之外的膜，仅保留约 30/35–50/65 kDa 范围；随后从凝胶中央两个 marker 泳道之间纵向裁开，使左右两套相同的样品分别形成独立膜条。一侧用于检测 phospho-p44/42 MAPK，另一侧用于检测约 40 kDa 的 loading control。由于本次保存的课堂 ASR 对内参具体名称识别不稳定，本文在未获得清晰原始标签前统一写作“内参蛋白/loading control”，不擅自补写具体名称。

2.4 抗体孵育与 ECL 化学发光

封闭后的膜条分别加入 phospho-p44/42 MAPK 特异性一抗和内参一抗孵育。洗膜后加入与一抗种属相匹配的 HRP 标记二抗，再次充分洗膜。显影时加入 ECL 化学发光底物，使 HRP 催化产生可被成像仪记录的发光信号。Western blot 的目标条带强度反映相应抗原在当前曝光条件下的相对信号水平。 [5]

课堂成像过程中保存了两张不同显示强度的曝光屏幕照片，以及一张 4 条裁剪后 PVDF 膜片的实物照片。现有照片用于定性判读；由于没有成像仪导出的原始数据文件、完整曝光参数和可追溯的软件 lane 标注，本报告不进行 densitometry、fold change 或统计学检验。

3 结果

3.1 转膜及裁膜结果

课堂实际照片中可见 4 条已裁剪的 PVDF 膜片，膜边缘保留 35、50 kDa 等 marker 位置标记，部分膜片可见“MAPK”等手写检测目标标记。4 条膜片的数量与男生组两块胶经中央 marker 纵向裁开后形成“2 块胶 × 2 个检测目标”的实验设计相符，说明电泳、转膜和后续分膜流程已实际完成。

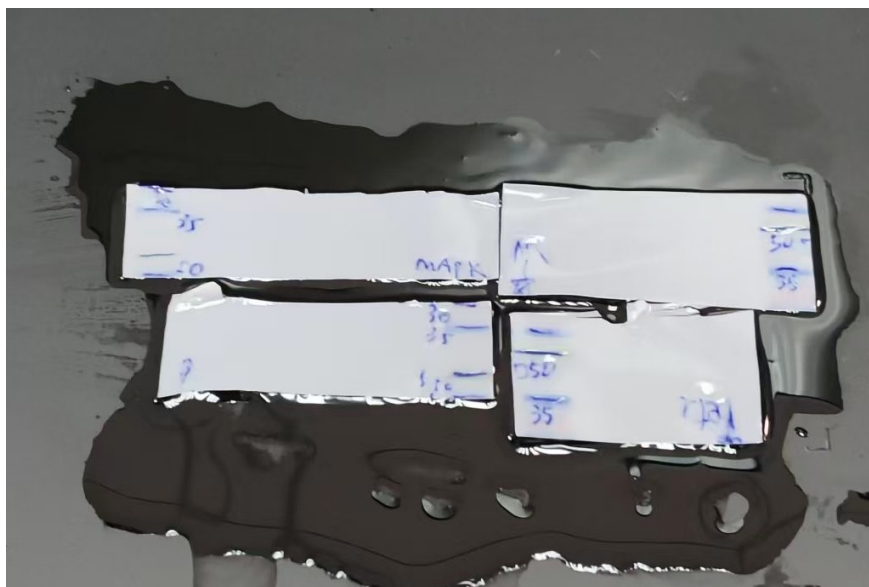


Fig. 1 SDS-PAGE 转膜并裁膜后的 PVDF 膜片。可见四条目标分子量区段膜片及手写 marker/检测目标标记；其数量与两块胶分别裁分为 phospho-p44/42 MAPK 检测膜和内参检测膜的课堂布局相符。

3.2 不同曝光条件下的 Western blot 条带

两张显影屏幕照片拍摄时间均为 2026-09-24 10:12。两张图中均可辨认左右两个 4 泳道区块，与男生组两块胶、每块胶包含两个学生组的课堂布局一致。结合既定上样顺序，每个 4 泳道区块应依次对应“组 A Control、组 A FBS、组 B Control、组 B FBS”。

较强曝光条件下，强信号区域出现明显增粗和饱和，右侧区块还可见较明显的背景及非特异性条带；与此同时，较弱的目标信号更容易被观察。较弱曝光条件下，强条带边界更清楚、整体背景较低，但低丰度条带明显变淡。两张照片的条带空间分布总体一致，因此更符合“同一批膜在不同曝光/显示强度下成像”的特征，而不是两套互不相关的实验结果。

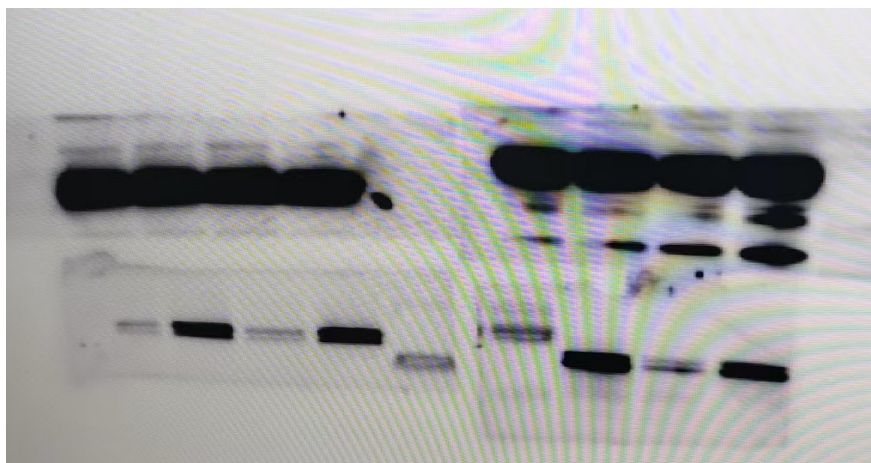


Fig. 2 Western blot 较强曝光条件下的课堂实际成像结果。强信号区域存在一定程度的饱和，弱信号更易观察，同时伴随较高背景和非特异性信号。

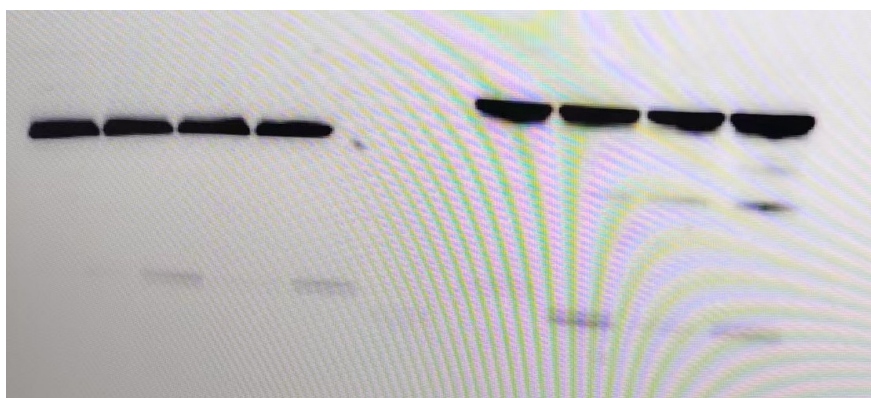


Fig. 3 Western blot 较弱曝光条件下的课堂实际成像结果。强条带边界较清楚，背景相对降低，但弱信号显示不足。

3.3 FBS 刺激后 phospho-p44/42 MAPK 信号增强

结合课堂规定的 Control/FBS 交替上样顺序和两种曝光条件，可见两个 4 泳道区块中均存在“相邻 FBS 泳道信号高于对应 Control 泳道”的重复趋势。在较弱曝光图中，这种差异尤其表现为每一对 Control/FBS 中主要由 FBS 对应泳道保留可辨认的目标信号，而 Control 对应泳道明显较弱；较强曝光图则进一步显示低水平背景信号，但 FBS 对应泳道仍整体更强。

与之相比，作为上样参照的强条带在各泳道间总体相对均一，尤其在较弱曝光条件下可见 8 个主要泳道均存在较完整的条带，未出现与 phospho-p44/42 MAPK 相同程度的 Control/FBS 交替性变化。该结果支持各泳道蛋白上样和转膜总体具有可比性，因此 phospho-p44/42 MAPK 的组间差异更可能反映磷酸化水平变化，而非单纯由上样量差异造成。

由于现有图像为手机拍摄成像屏幕，且强曝光图存在饱和、部分膜片存在背景和非特异条带，同时 p44 与 p42 两条相近分子量条带在照片中不能在所有泳道中稳定分辨，因此本报告仅得出定性结论：**5% FBS 刺激 15 min 后，A549 细胞 phospho-p44/42 MAPK 信号较无血清 Control 组增强**。不进一步报告具体倍数变化。

4 讨论

本实验最重要的观察是，短时 FBS 刺激后 phospho-p44/42 MAPK 信号增强，而内参信号整体未呈现相同的交替性变化。这一结果与经典 ERK1/2 信号转导机制一致。ERK1/2 位于 Ras-Raf-MEK-ERK 级联下游，其活化依赖关键 Thr/Tyr 位点磷酸化；血清中含有多种生长因子和其他促有丝分裂成分，可在较短时间内通过受体和上游激酶迅速激活 ERK。ERK1/2 的双磷酸化是快速翻译后调控，而不是等待大量新蛋白合成，因此 15 min 的刺激时间更适合解释为“通路活化增强”，而不能写成“ERK 总蛋白表达量明显增加”。[2] [3]

serum starvation 是本实验设计中的关键控制步骤。其目的不是使细胞“没有任何信号”，而是尽量降低血清生长因子持续刺激造成的基础磷酸化背景，使后续短时 FBS refeeding 产生更清晰的动态差异。标准化 ERK phosphorylation 实验中常采用数小时 serum starvation 以降低 basal ERK1/2 phosphorylation，再给予配体或生长因子刺激。A549 细胞的相关研究也表明，serum-starved 细胞在受到短时刺激后可出现快速 ERK 磷酸化变化。[4]

本实验采用“同一组样品在一块胶上重复上样两套”的平行设计，主要是为了解决 phospho-p44/42 MAPK 与约 40 kDa 内参分子量接近的问题。若只同一套泳道上按分子量横向切膜，两种抗体的目标区域可能重叠；本实验通过左右重复上样，再从中央两个 marker 之间纵向裁开，使一半膜孵 phospho-p44/42 MAPK 抗体，另一半膜孵内参抗体。这样既节省凝胶和转膜材料，又保留了每个学生组独立的 Control/FBS 泳道。需要强调的是，左右重复上样属于检测用途的技术复制，并不构成独立生物学重复，因此不能把同一批样品的多个学生泳道直接当作独立 n 值进行统计学推断。

两张曝光照片也提示了 Western blot 成像中“曝光不足—线性区—过曝饱和”的问题。较强曝光能揭示弱信号，但强条带已经明显增粗、发黑甚至接近饱和；在饱和状态下，图像灰度不再与蛋白信号保持良好比例关系，因此不能用于可靠的定量比较。较弱曝光中强条带边界更清楚，更适合判断上样一致性，但部分低丰度 phospho-p44/42 MAPK 条带接近检测下限。理想做法应保留原始成像文件，并选择位于动态线性范围内的曝光时间进行 densitometry；若需要正式定量，还应以 phospho-ERK 相对于 total ERK 或经过验证的 loading control 进行归一化，并设置真正独立的生物学重复。[5]

本次课堂结果还存在若干限制。首先，现有证据主要是手机拍摄的成像屏幕照片，缺少原始 TIFF、曝光时间和软件 lane annotation，因此无法进行可信的灰度定量。其次，较强曝光图中可见背景和额外条带，可能与曝光过长、抗体浓度、封闭或洗膜不足、非特异结合以及局部转膜不均等因素有关。再次，照片清晰度有限，虽然 phospho-p44/42 MAPK 理论上对应约 44/42 kDa 的 ERK1/2 双带，但本次照片不足以在每个泳道中稳定分辨两条相邻条带，因此不宜强行逐条标注 p44 与 p42。最后，现有课堂 ASR 对内参具体名称的识别不清晰；正式提交前若能从原始膜标签、抗体记录或教师课件进一步确认，应补充具体名称，否则保持“内参/loading control”的中性表述更符合真实记录原则。

综合以上结果，现有课堂 Western blot 能够支持实验的主要结论：**无血清预处理后的 A549 细胞经 5% FBS 刺激 15 min 后，p44/42 MAPK/ERK1/2 磷酸化**

信号增强，提示 ERK 信号通路发生快速激活。该结论与实验设计和 ERK 信号通路机制相符，但目前证据属于定性或半定量层级；若进行正式科研验证，应补充原始成像数据、total ERK 或明确 loading control、线性曝光条件、灰度归一化以及独立生物学重复。

致谢。感谢细胞与分子生物学实验课程教师对实验流程和结果分析方法的指导。

声明

- 资金支持：不适用。
- 利益冲突：作者声明不存在利益冲突。
- 伦理批准：本课程实验按照教学要求和实验室指导完成。
- 数据可得性：本文讨论的数据均包含在正文与图表中。

参考文献

- [1] 天津医科大学《基础医学探究实验》课程资料. **p44/42 MAPK (ERK1/2) 课前案例及课堂实验指导**. 2026.
- [2] Roskoski R Jr. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res.* 2012;66(2):105-143. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.04.005>
- [3] Busca R, Pouyssegur J, Lenormand P. ERK1 and ERK2 Map Kinases: Specific Roles or Functional Redundancy? *Front Cell Dev Biol.* 2016;4:53. <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00053>
- [4] Quintero Barceinas RS, García-Regalado A, Aréchaga-Ocampo E, Villegas-Sepúlveda N, González-De la Rosa CH. All-Trans Retinoic Acid Induces Proliferation, Survival, and Migration in A549 Lung Cancer Cells by Activating the ERK Signaling Pathway through a Transcription-Independent Mechanism. *Biomed Res Int.* 2015;2015:404368. <https://doi.org/10.1155/2015/404368>
- [5] Mahmood T, Yang PC. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci.* 2012;4(9):429-434. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>
- [6] Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76(9):4350-4354. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>