

目录

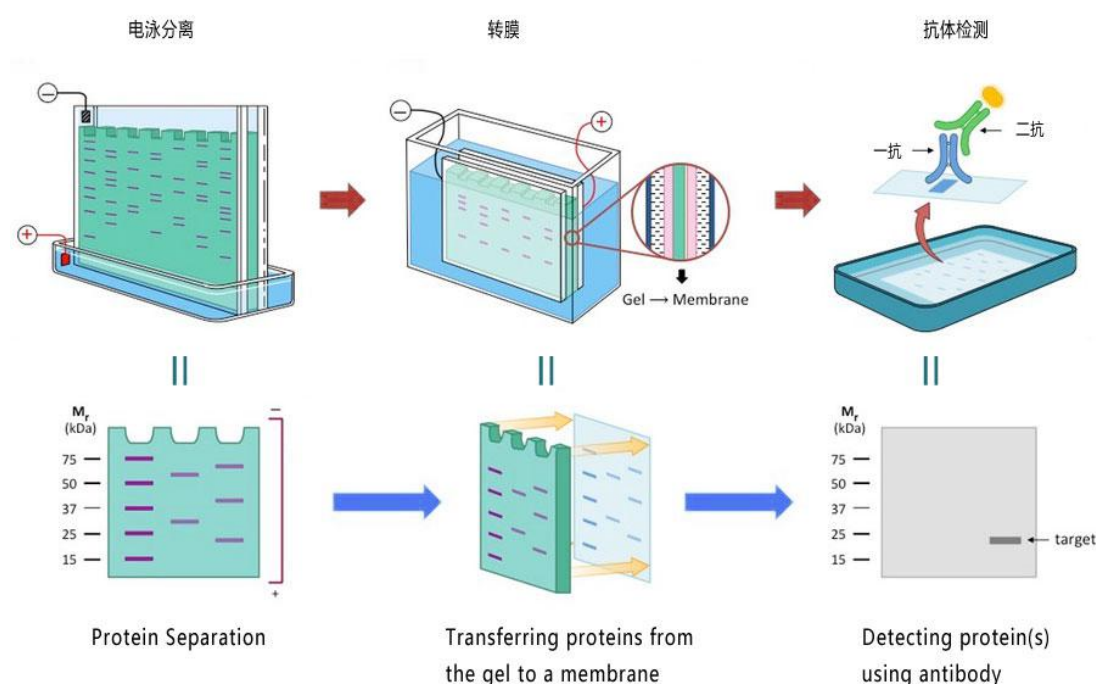
第一章：蛋白质印迹法原理.....	3
电泳.....	3
转膜.....	4
抗原抗体反应.....	5
第二章：标准操作流程.....	7
一、蛋白样品制备.....	8
二、配胶.....	9
三、电泳.....	10
四、转膜.....	10
五、免疫反应.....	11
六、发光鉴定.....	11
七、增强敏感性.....	12
第三章 问题讨论和注意事项.....	13
一、膜的特点和选择.....	13
二、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS - PAGE）.....	14
三、转移.....	14
四、封闭（block）.....	16
五、孵育一抗.....	16
六、洗涤.....	17
七、孵育二抗.....	17
八、洗涤.....	17
九、显色（HRP 酶）.....	17
注意事项：.....	17

关于内参.....	18
试剂配方:	19
第四章: 常见问题的分析和解决办法.....	21
第五章: 专业词汇.....	24



第一章：蛋白质印迹法原理

蛋白质印迹法（免疫印迹试验）即 Western Blot。它是分子生物学、生物化学和免疫遗传学中常用的一种实验方法。其基本原理是通过特异性抗体对凝胶电泳处理过的细胞或生物组织样品进行着色。通过分析着色的位置和着色深度获得特定蛋白质在所分析的细胞或组织中表达情况的信息。



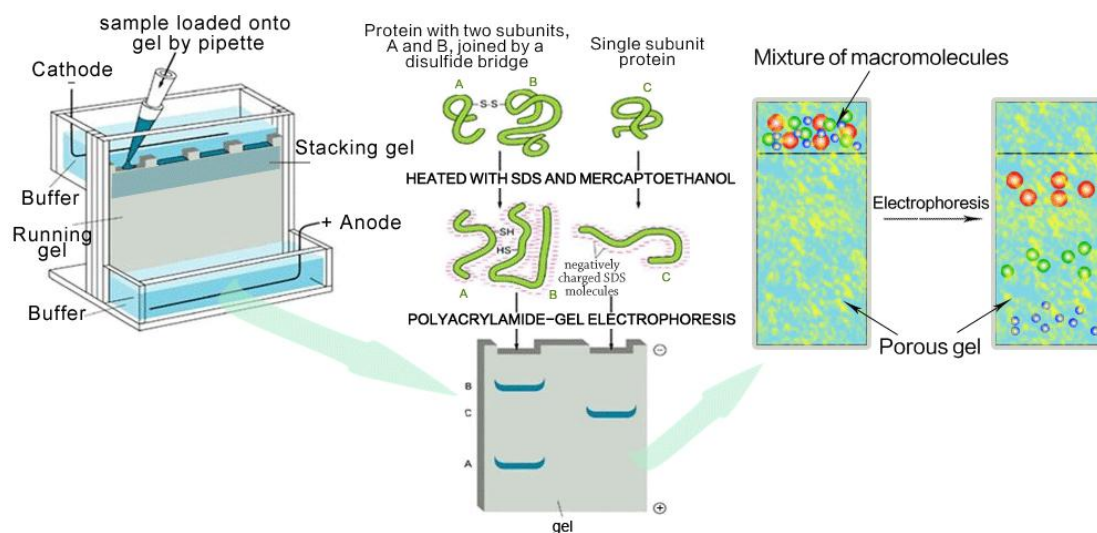
电泳

聚丙烯酰胺凝胶几乎适用于所有蛋白质电泳分析，而实验中要确保蛋白质解离成单个多肽亚基并尽可能减少其相互间的聚集。最常用的方法是将强阴离子去污剂 SDS（十二烷基硫酸钠）与某一还原剂并用，并通过加热使蛋白质解离，消除高级结构，再加样于电泳凝胶上。变性的多肽与 SDS 结合并因此而带负电荷。由于多肽结合 SDS 的量几乎总是与多肽的分子量成正比而与其序列无关，所以 SDS-多肽复合物在聚丙烯酰胺凝胶电泳中的迁移只与多肽的大小相关。

SDS-PAGE 电泳大多在不连续缓冲系统中进行，其电泳槽缓冲液的 pH 值与离子强度不同于配胶缓冲液，当两电极间接通电流后，凝胶中形成移动界面，并带动加入凝胶的样品中所含的 SDS-多肽复合物向前推进。样品通过高度多孔性的积层胶（或称浓缩胶）后，复合物在分离胶表面聚集成一条很薄的区带（或称积层）。由于不连续缓冲系统可以把样品中的复合物全部浓缩于极小体积的能力，故大大提高了 SDS-PAGE 的分辨率。

样品和积层胶中含 Tris-HCl (pH 6.8)，上下槽缓冲液含 Tris-Gly (pH 8.3)，分离胶中含 Tris-HCl (pH 8.8) 的。系统中所有组分都含有 0.1% 的 SDS，样品和积层胶中的 Cl⁻ 形成移动界面的先导边界而 Gly 分子则组成尾随边界，在移动界面的两边界之间是一电导较低而电位滴度较陡的区域，它推动样品中的多肽前移并在分离胶前沿积聚，此处 pH 值较高，有利于 Gly 的离子化，所形成的甘氨酸离子穿过堆集的多肽并紧随 Cl⁻ 之后，沿分

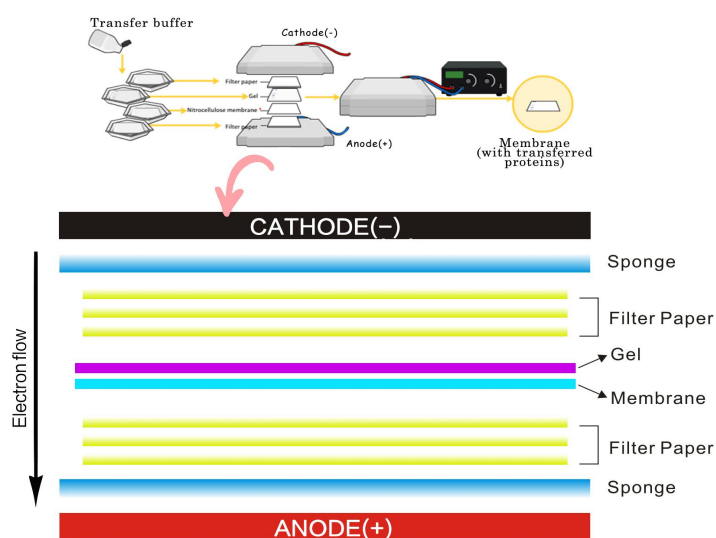
离胶泳动。从移动界面中解脱后，SDS 多肽复合物成一电位和 pH 值均匀的区带泳动穿过分离胶，并被筛分而依各自的分子力大小得到分离。



SDS-PAGE 分离蛋白示意图

转膜

Western Blotting 实验中首先是要将电泳后分离的蛋白从凝胶中转移到固相载体上，常用的固相载体有 NC 膜和 PVDF 膜。电泳印迹可以实现快速有效的转移，这种方法是用有孔的塑料和有机玻璃板将凝胶和膜夹成“三明治”（sandwich）形状，而后浸入两个平行电极中间的缓冲液中进行电泳，选择适当的电泳方向就可以使蛋白质在电场力的作用下离开凝胶结合到膜上。



蛋白转膜示意图

常用的电泳转移方法有湿转和半干转。两者的原理完全相同，只是用于固定胶/膜叠层和施加电场的机械装置不同。湿转将胶和膜叠层浸入缓冲液槽然后加电压，需要大体积缓冲液且只用一种缓冲液，方法有效但较慢。半干转，用浸透缓冲液的多层滤纸代替缓冲液槽。与湿转相比，半干转要快 15~45 分钟。



如图：Bio-Rad 公司的 Mini-Trans Blot. (用于湿转)

包括：1.转膜槽和盖子；2.夹子；3.电极系统；4.冷却系统



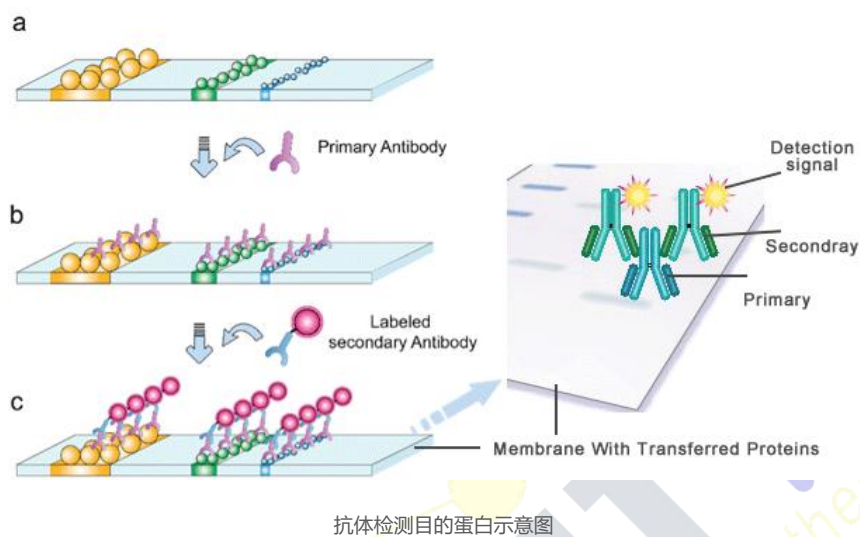
Bio-Rad 公司的 The Trans-Blot SD cell. (用于半干转)

包括：1.盖子；2.阴极板；3.阳极板

抗原抗体反应

转移后的膜就称为一个印迹 (blot) ,用于对目的蛋白 (target protein) 的进一步检测。印迹首先用蛋白溶液 (如 5% 的 BSA 或脱脂奶粉溶液) 处理以封闭膜上剩余的疏水结合位点，而后用所要研究的蛋白质的抗体，即一抗 (primary antibody) 处理，印迹中只有目的蛋白与一抗特异结合形成抗原抗体复合物，而其它的蛋白质不能与一抗结合，这样清洗除去未结合的一抗后，印迹中只有待研究的蛋白质的位置上结合着一抗。处理过的印迹进一步用适当标记的二抗 (secondary antibody) 处理，二抗是指结合一抗的抗体，如一抗是从鼠中获得的，则二抗就是抗鼠 IgG 的抗体。目前有结合各种标记物的抗体特定 IgG 的抗体中最常用的一种是酶连的二抗，印迹用酶连二抗处理后，再用适当的底物溶液处理，当酶催化底物生成有颜色的产物时，就会产生可见的区带，指示所要检测的蛋白位置。

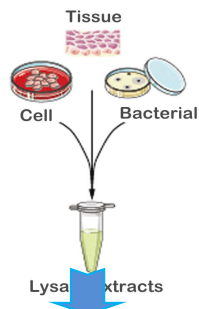
在酶连二抗中使用的酶通常是碱性磷酸酶（AP）或辣根过氧化物酶（HRP）。碱性磷酸酶可以将无色的底物 5-溴-4-氯吲哚磷酸盐（BCIP）转化为蓝色的产物；使用 ECL(增强化学发光法)检测 HRP，HRP 在 H_2O_2 存在下，氧化化学发光物质鲁米诺并发光，通过将印迹放在照相底片上感光就可以检测出 HRP 的存在，即显示目标蛋白的存在。



第二章：标准操作流程

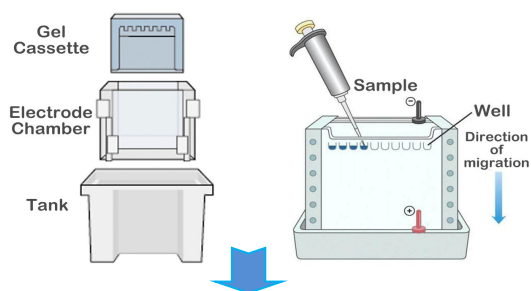
蛋白样品制备

从细胞或组织中提取总蛋白，检测蛋白浓度，变性处理，加入样品缓冲液。



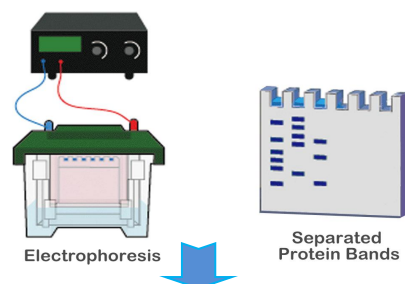
配胶上样

配置浓缩胶和分离胶。根据要检测的靶蛋白的分子量大小，计算出胶的浓度，并算出分离胶各组分的用量。每孔加样 20-30ug 蛋白提取物。



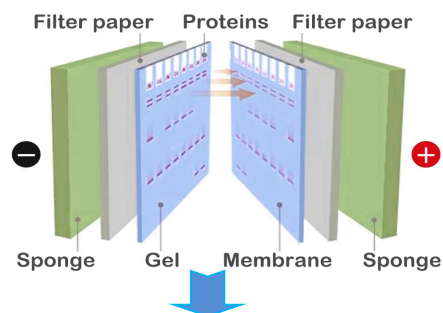
电泳

依据分子量大小选择合适的电压/电流以及电泳时间



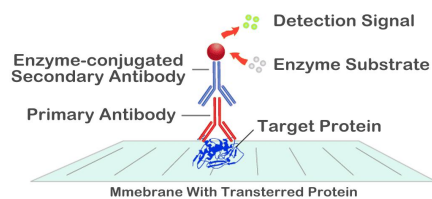
蛋白转膜

将凝胶上的蛋白转移到 PVDF 或 NC 膜，以便于后续抗原抗体。转膜结束后可用丽春红或考马斯亮蓝染色观察转膜效果。



免疫反应

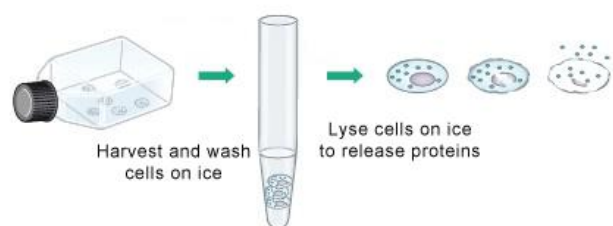
封闭液（如 5%脱脂牛奶）封闭非特异性蛋白结合位点，依次加入一抗、酶标二抗孵育，最后加底物检测目的蛋白。



一、蛋白样品制备

1) 单层贴壁细胞总蛋白的提取:

- 1、倒掉培养液，并将瓶倒扣在吸水纸上使吸水纸吸干培养液（或将瓶直立放置一会儿使残余培养液流到瓶底，然后再用移液器将其吸走）。
- 2、加入适量预冷的 PBS。平放轻轻摇动 1min 洗涤细胞，然后弃去洗液。重复以上操作两次，共洗涤细胞三次以洗去培养液。将 PBS 弃净后把培养瓶置于冰上。
- 3、按 1ml 裂解液加 10 μ L PMSF (100 mM) 和 10 μ L Cocktail 的比例，摇匀置于冰上（PMSF 要摇匀至无结晶时才可与裂解液混合）。
- 4、每瓶细胞加 400 μ L（6 孔板根据细胞的密度加入 100~200 μ L）含 PMSF 和的裂解液，于冰上裂解 30 分钟，为使细胞充分裂解培养瓶要经常来回摇动。
- 5、裂解完后，用干净的刮棒将细胞刮于培养瓶的一侧（动作要快），然后用移液器将细胞碎片和裂解液移至 1.5 mL 离心管中（整个操作应保持低温，尽量在冰上进行）。
- 6、于 4°C 下 14,000 rpm 离心 5 min。（提前开离心机预冷）。
- 7、将离心后的上清液分装转移倒干净的离心管中，并分装至少两份，放于 -80°C 低温保存。
- 8、取部分上清，加入上样 buffer，煮沸 10 min。缓慢恢复室温后，稍离心，放于 -20°C 保存。



单层贴壁细胞蛋白提取示意图

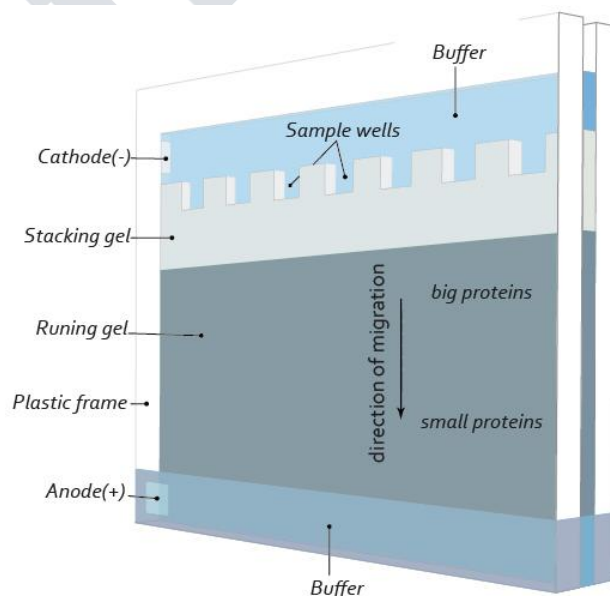
2) 组织中总蛋白的提取:

- 1、将 100mg 组织块置于匀浆器中球状部位，用干净的剪刀将组织块尽量剪碎。

- 2、加 500 μ L RIPA 裂解液裂（含 PMSF 和 Cocktail）于匀浆器中，进行匀浆此过程一直在冰上操作。重复碾压几次使组织尽量碾碎。
- 3、用移液器将裂解液移至 1.5mL 离心管中，冰上裂解 30 min，然后在 4°C 下 14,000 rpm 离心 10 min，取上清分装于 1.5 mL 离心管中并置于 - 80°C 保存。
- 4、取部分上清，加入上样 buffer，煮沸 10 min。缓慢恢复室温后，稍离心，放于 -20°C 保存。

二．配胶

1. 按将要检测的抗体对应的原始抗原的分子量大小，计算出胶的浓度，并算出分离胶各组分的用量。注意一定要将玻璃板洗净，最后用 dd H₂O 冲洗，将与胶接触的一面向下倾斜置于干净的纸巾晾干。
2. 分离胶及浓缩胶可事先配好（除 AP 及 TEMED 外），过滤后作为储存液避光存放于 4°C，可至少存放 1 个月，临用前取出室温平衡（否则凝胶过程产生的热量会使低温时溶解于储存液中的气体析出而导致气泡，有条件者可真空抽吸 3 分钟），加入 10% APS（0.7~0.8:100，分离胶浓度越高 APS 浓度越低，15% 的分离胶可用到 0.5:100）及 TEMED（分离胶用 0.4:1,000，15% 的可用到 0.3:1,000，浓缩胶用 0.8: 1,000）即可
3. 封胶：灌入 2/3 的分离胶后应立即封胶，胶浓度 < 10% 时可用 0.1% 的 SDS 封，浓度 > 10% 时用水饱和的异丁醇或异戊醇，也可以用 0.1% 的 SDS。封胶后切记，勿动。待胶凝后将封胶液倒掉，如用醇封胶需用大量清水及 dd H₂O 冲洗干净，然后加少量 0.1% 的 SDS，目的是通过降低张力清除残留水滴。
4. 灌好浓缩胶 1h 后拔除梳子，注意在拔除梳子时宜边加水边拔，以免有气泡进入梳孔使梳孔变形。拔出梳子后用 dd H₂O 冲洗胶孔两遍以去除残胶，随后用 0.1% 的 SDS 封胶。若上样孔有变形，可用适当粗细的针头拨正；若变形严重，可在去除残胶后用较薄的梳子再次插入梳孔后加水拔出。30 min 后即可上样，时间长有利于胶结构的形成。



三. 电泳

1. 上样前将胶板下的气泡赶走。
2. 所有蛋白样品调至等浓度后上样，样品两侧的泳道用等体积的 $1\times$ loading buffer 上样，Marker 也用 $1\times$ loading buffer 调整至与样品等体积。
3. 在目的蛋白泳动至距胶下缘 1cm 以上结束。

四. 转膜

1. 电泳结束前 20 分钟左右戴上手套开始准备：

湿转使用常规电转液：Tris 3.0 g, Gly 14.4 g, 甲醇 200 mL, 加去离子水至 1 L。干转则取电转液，每 50 mL 加入 10% SDS 180 μ L。

浸泡 NC 膜：将 NC 膜平铺于去离子水面，靠毛细作用自然吸水后再完全浸入水中 10 min 以排除气泡，随后浸泡入转移液中。PVDF 膜则必须在甲醇中浸泡 20 min 以上后转入转移液中。将滤纸也浸入转移液中。

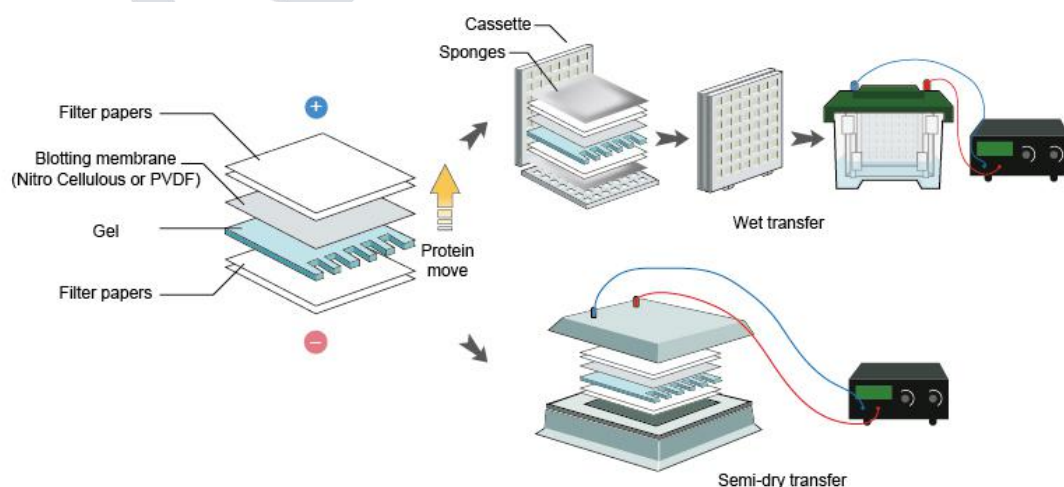
2. 取胶：

将胶卸下，保留 30~100 kD 或分子量范围更广些的胶（以便以后杂其他感兴趣的蛋白），左上切角，在转移液中稍稍浸泡一下，置于洁净玻璃板上，按顺序铺上膜与每侧一张（干转每侧三张）滤纸。注意用玻棒逐出气泡，剪去滤纸与膜的过多部分。干转时，注意防止短路。

3. 转膜：

湿转：电转槽用去离子水淋洗晾干，加入 1,000 mL 电转液。将胶平铺于海绵上，滴加少许电转液再次驱赶气泡，封紧后放入电转槽，注意膜在正极一侧。降温，将电泳槽置于冰水混合物中。恒流 100 mA 过夜，或 400 mA, 4h。不同蛋白的转膜条件有所不同。

干转：用电转液淋洗石墨电极，滤纸吸干，铺上胶，再滴少许电转液，以 1.5 mA/cm^2 凝胶面积转移 1~2 小时。负载电压不宜超过 1 V/cm^2 胶面积。



免疫印迹膜转移示意图

五. 免疫反应

1. 封闭:

将膜从电转槽中取出, 去离子水与 PBST 或 TTBS 稍加漂洗, 浸没于封闭液中缓慢摇荡一小时。必要时可先用丽春红染色 (2 % 乙酸, 0.5 % 丽春红的水溶液) 观察蛋白条带, 再用去离子水和 TBST 将丽春红洗脱后封闭, 如用蛋白 marker 则可省略此步。

2. 结合一抗:

一抗的准备: 使用反贴法时每张 $3 \times 9 \text{ cm}^2$ 膜约需 2 mL 一抗稀释液。

3. 洗涤:

一抗孵育结束后, 用 PBST 或 TBST 漂洗膜后再浸洗三次, 每次 5~10 min。

4. 结合二抗:

根据一抗来源选择合适的二抗, 根据鉴定方法选择 HRP 或 AP 标记的抗体, 按相应比例稀释, 室温轻摇一小时。

5. 洗涤:

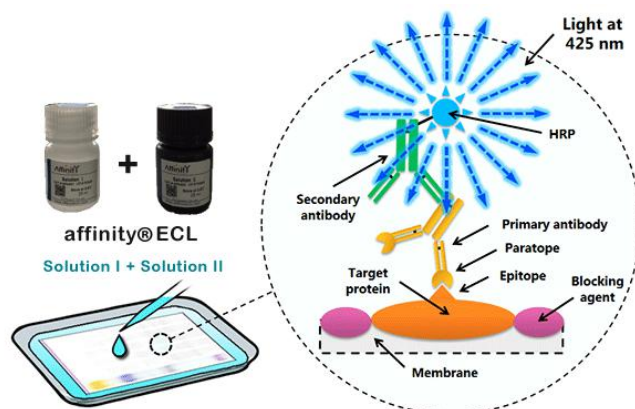
二抗孵育结束后, 用 PBST 或 TBST 漂洗膜后再浸洗三次, 每次 5~10 min。

六. 发光鉴定

一般使用辣根过氧化物酶 HRP-ECL 发光法或碱性磷酸酶 AP-NBT/BICP 显色法。

1. HRP-ECL 发光法:

将 A、B 发光液按 1:1 比例稀释混合。膜用去离子水稍加漂洗, 滤纸贴角吸干, 用移液器滴加 A、B 混合液覆盖膜的表面, 关灯至可见淡绿色荧光条带 (5 min 左右) 后滤纸贴角吸干, 置于保鲜膜内固定于片盒中, 迅速盖上胶片, 关闭胶盒, 根据所见荧光强度曝光。打开红光灯, 取出胶片立即完全浸入显影液中 1~2 min, 清水漂洗一下后放在定影液中至底片完全定影, 清水冲净晾干, 标定 Marker, 进行分析与扫描。

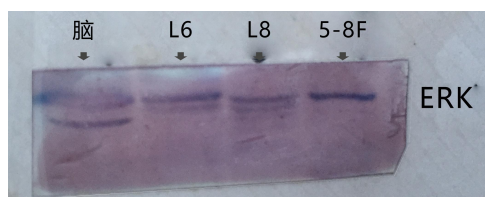


HRP-ECL 发光法示意图

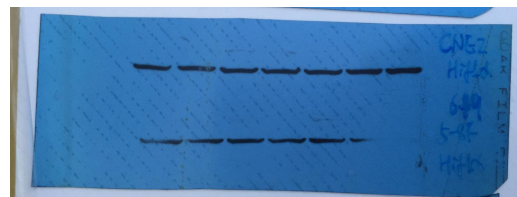
2. AP-NBT/BICP 显色法:

每片 NBT/BICP 可溶解于 30ml 水中, 使用前将一片分装在 30 个 EP 管中, 每张 3×9 cm 的膜取一管配成 1ml 即可。将 PBST 或 TTBS 洗涤过的膜用去离子水稍加漂洗, 滤纸贴角吸干, 反贴法覆于 NBT/BICP 溶液液滴上, 并用不透明物体 (如报纸) 遮挡光线, 显色 20s 后每 10s 观察一次, 至条带明显或有本底出现时将膜揭起置去离子水中漂洗后放滤纸上晾干即可观察与扫描。

如图: 左图为使用 AP-NBT/BICP 显色法 WB 的抗体检测; 右图为使用 HRP-ECL 发光法 WB 的抗体检测



Western blot analysis using AP-NBT/BICP coloration method



Western blot analysis using HRP-ECL Luminescence

七. 增强敏感性

若目的条带未出现, 或很淡, 可试用以下方法增强发光强度:

1. 用清水漂洗膜数分钟, 重加发光液进行曝光, 可延长曝光时间。
2. 将膜在 PBST 或 TBST 中洗涤 30min 或更长, 期间至少换 2 次液。
3. 封闭 40~60min
4. 一抗杂交, 室温 1h。37°C 1h 会更强, 但可能增加非特异条带。
5. PBST 或 TBST 洗膜 20min, 期间换 2 次液。
6. 二抗杂交, 37°C 1h。
7. PBST 或 TTBS 洗膜 20min, 期间换 2 次液。
8. 发光鉴定。
9. 若条带仍未出现或很淡, 可以再用 PBST 或 TTBS 洗涤膜 20min, 期间换 2 次液。
10. PBST 或 TBST 洗涤膜 20min, 期间换液 2 次。
11. 发光鉴定。

第三章 问题讨论和注意事项

- 1、为了让实验更加严谨有说服力都要设计对照实验，对照分为：阳性对照（最好有标准品（比如 β -actin, GAPDH）或阳性血清）；阴性对照（测血时用相应小鼠未免疫血清（即正常血）；空白对照（不加一抗，用PBS代替）；无关对照（用无关抗体）
- 2、一抗、二抗的浓度一般要参照抗体说明书选择最适当的比例，一抗，二抗的选择直接影响实验结果以及背景
- 3、凝胶的质量直接影响以后的实验结果，要特别注意：
 - a. 凝胶要均一没有气泡；
 - b. 积层胶与分离胶界面要水平；
 - c. AP 和 TEMED 的量不能过多，太多会导致胶易脆裂；
 - d. 拔梳子时要快，尽量保证点样孔平整。
- 4、电泳、转膜时特别要注意正负极，电压电流都不能过高；注意转膜时“三明治”的叠放次序，同时要防止产生气泡；尽量让电转温度保持在 10°C 以下，冰浴为宜。
- 5、封闭时一般在室温下 2h 就够了，但是要注意如果是生物素标记的二抗就不宜用牛奶，因为牛奶中含有生物素，用 BSA 效果更好。
- 6、加一抗二抗要严格保证反应时间，洗膜要注意尽可能地将一抗，二抗洗净，有利于降低背景。
- 7、过硫酸铵（APS）一定要保证不变质，配好后应保存在 -20°C。超过 2 周的，或已经反复打开使用多次的 APS 都不要使用。

电泳结果检查：

考马斯亮蓝使用简便快速，可以分辨 1 μ g 左右的条带，可是由于考马斯亮蓝染色或者银染经过固定不可逆结合，会干扰后面的 Western Blot 实验。所以也可以使用丽春红 S，直接染色转移膜，检测转膜效果，充分脱色后不干扰 Western 结果。丽春红的检测灵敏度和考马斯亮蓝差不多。

转膜：

经过 PAGE 电泳分离后的蛋白质样品需要经过“转膜”步骤——从 PAGE 胶转移到膜上固定，才能用各种方法进行 Western Blot 的检测和显色，而且为了防止没有电场的情况下已经分离的蛋白条带扩散，转移要尽快进行转膜的首要选膜。

一、膜的特点和选择

Western Blot 印迹常用的转移膜主要是硝酸纤维素膜（Nitrocellulose Blotting Membranes, NC）和 PVDF 膜，此外也有用尼龙膜、DEAE 纤维素膜做蛋白印迹。选择的根据主要有：a. 膜与目的蛋白分子的结合能力（也就是单位面积的膜能结合蛋白的载量），以及膜的孔径（也就是拦截蛋白的大小）；b. 不影响后续的显色检测

(也就是适和用于所选的显色方法, 信噪比好); c.如果后继实验有其他要求, 比如要做蛋白测序或者质谱分析, 还要根据不同目的来挑选不同的转移膜。

以下是各种常用膜的优缺点比较:

	NC 膜	尼龙膜	PVDF 膜
灵敏度和分辨率	高	高	高
背景	低	较高	低
SDS 下与蛋白的结合能力	80~110 ug/cm ²	>400 ug/cm ²	125~200 ug/cm ²
材料质地	干的 NC 膜易脆	软而结实	机械强度高
溶剂耐受性	无	无	有
操作程序	缓冲液润湿, 避免气泡	缓冲液润湿	使用前 100% 甲醇润湿
价格	便宜	较便宜	较贵

二、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS - PAGE)

注意事项及常遇到的问题

- 1) 分离胶不要倒的太满, 需要有一定的浓缩胶空间, 否则起不到浓缩效果。
- 2) 上样蛋白量不应超过 30 ug/mm² (载荷面积: 如果胶槽是 5 mm×1 mm, 则载荷面为: 1 mm×5 mm=5 mm²)。
- 3) Gel 通常在 0.5~1 h 内凝集最好, 过快表示 TEMED、APS 用量过多, 此时胶太硬易裂, 缺乏韧性, 并且电泳时容易烧胶。太慢则说明两种试剂用量不够或者试剂不纯甚至失效。

4) 混合搅拌速度太快产生气泡影响聚合, 导致电泳带畸形。太慢不均匀, 特别是甘油。

5) 电泳中常出现的一些现象:

∪ 条带呈笑脸状, 原因: 凝胶不均匀冷却, 中间冷却不好。

∩ 条带呈皱眉状, 可能是由于装置不合适, 特别可能是凝胶和玻璃挡板底部有气泡, 或者两边聚合不完全。

拖尾: 样品溶解不好。

纹理 (纵向条纹): 样品中含有不溶性颗粒。

条带偏斜: 电极不平衡或者加样位置偏斜。

条带两边扩散: 加样量过多。

三、转移

在电流的作用下, 使蛋白质从胶转移至固相载体 (膜) 上。

A 半干法

即将凝胶夹层组合放在吸有转印缓冲液的滤纸之间，通过滤纸上吸附的缓冲液传导电流，起到转移的效果。因为电流直接作用在膜胶上，所以其转膜条件比较苛刻，但是其转移时间短，效率高。

1 实验条件的选择

电流 1 mA-2 mA/cm²，我们通常 100 mA/膜，按照目的蛋白分子大小、胶浓度选择转移时间。

目的蛋白分子大小 (kD)	胶浓度	转膜时间 (hour)
80~140	8%	1.5~2.0
25~80	10%	1.5
15~40	12%	0.75
<20	15%	0.5

2 实验操作

(1) 滤纸和膜的准备 (在电泳结束前 20 分钟应开始准备工作)。

A. 将膜泡入甲醇中，约 1-2 分钟。再转入转膜缓冲液中。

B. 将合适的靠胶滤纸和靠膜滤纸分别泡入转膜缓冲液中。

(2) 转膜

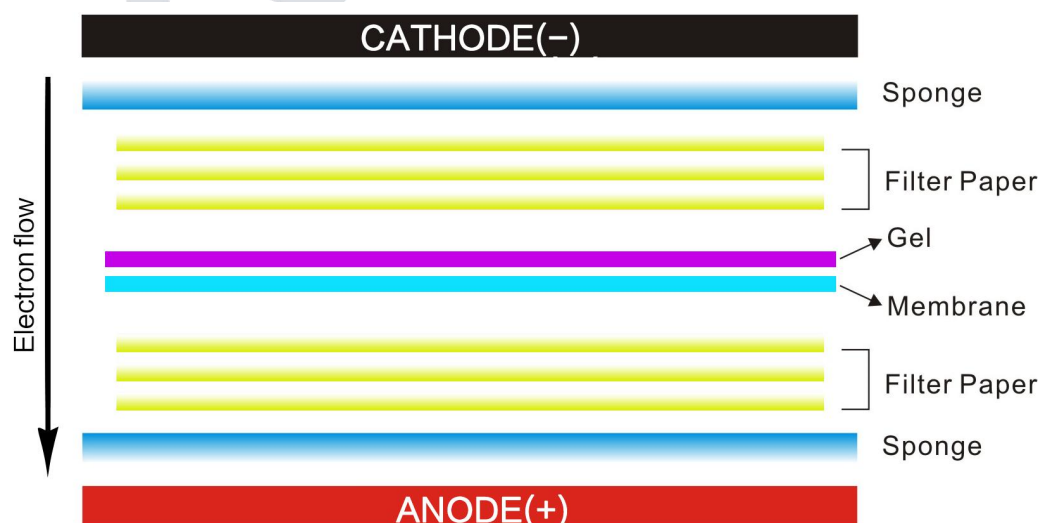
a. 将膜铺在靠膜滤纸上，注意和滤纸间不要有气泡，再倒一些 transfer buffer 到膜上，保持膜的湿润。

b. 将胶剥出，去掉 stacking gel，小心的移到膜上。

c. 剪去膜的左上角，在膜上用铅笔标记出胶的位置。

d. 将一张靠胶滤纸覆盖在胶上。倒上些 transfer buffer，再铺两张靠胶滤纸。

e. 转移过程中要随时观察电压的变化，如有异常应及时调整。



3 注意事项及常遇到的问题

- 1) 滤纸、胶、膜之间的大小，一般是滤纸 $\geq$ 膜 $\geq$ 胶。
- 2) 滤纸、胶、膜之间千万不能有气泡，气泡可能会造成短路。
- 3) 因为膜的疏水性，膜必须首先在甲醇中完全浸湿。而且在以后的操作中，膜也必须保持湿润。
- 4) 滤纸可以重复利用，上层滤纸（靠膜）内吸附有很多转移透过的蛋白质，所以上下滤纸一定不能弄混，在不能分辨的情况下，可以换新滤纸。
- 5) 转移时间一般为 1.5 小时，（1 mA $\sim$ 2 mA/cm²，10% gel），可根据分子量大小调整转移时间和电流大小。

转移后效果的鉴定

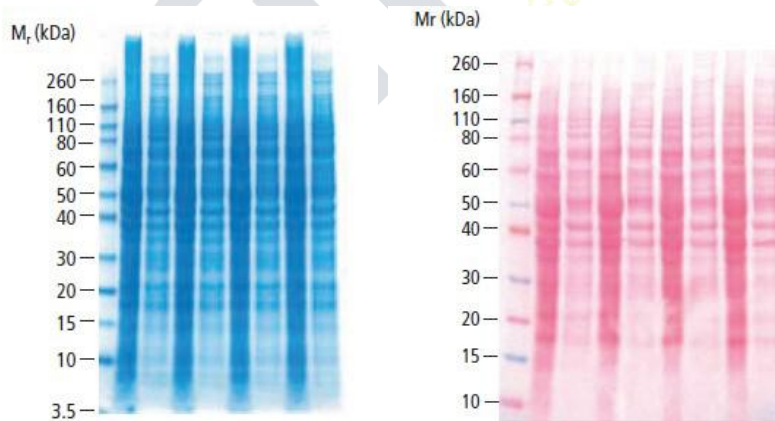
1. 染胶

用考马斯亮蓝染色经 destain 脱色后，看胶上是否还有蛋白来反映转移的效果。

2. 染膜

两类染液可供选择，可逆的和不可逆的。可逆的有 ponceau-s red（丽春红 S）、Fast green FC、CPTS 等，这类染料染色后，色素可以被洗掉，膜可以用做进一步的分析用。但是不可逆的染料，如考马斯亮兰、印度墨水等，染色之后膜就不能用于进一步的分析。

如下图所示：左为考马斯亮蓝染胶的效果图；右为丽春红 S 染膜的效果图。



左图：考马斯亮蓝染色效果 右图：丽春红 S 染色效果

四、封闭 (block)

封闭是为了使抗体仅仅只能跟特异的蛋白质结合而不是和膜结合，一般使用脱脂奶粉。在转移结束前配好 5% 的脱脂奶粉 (TBST 溶解)。转移结束后将膜放入脱脂奶粉中封闭(一定要放在干净的容器里，避免污染而且要足以覆盖膜)，并清洗整理好用过的滤纸，以便下次使用。4°C 封闭过夜，或室温下 1 小时。

五、孵育一抗

- A. 先将需要检测的抗体准备好, 并根据抗体 datasheet 选择抗体稀释度。
- B. 配好 5% 的脱脂奶粉(TBST 溶解), 按要求稀释好抗体。最好采用梯度稀释, 优化实验条件。
- C. 将稀释好的抗体和膜一起孵育。一般采用室温下孵育 2 小时, 也可根据抗体量和膜上抗原量适当延长或缩短时间。

六、洗涤

用 TBST 先快速洗三次, 把脱脂奶粉尽快掉。然后 5mins *5。

洗涤是为了洗去一抗与抗原的非特异性结合, 洗涤的效果直接影响结果背景的深浅。并且可以洗去一抗中可能残留的 NaN_3 , NaN_3 会影响 HRP 的活性, 导致白板。

七、孵育二抗

室温下孵育 1 小时。一般采用 HRP 标记的二抗, 稀释比例为 1:5,000。二抗的稀释比例不能太低, 否则容易导致非特异性的结合。二抗的选择有多种, 要根据一抗的类型来选择二抗, 例如一抗是兔抗人, 那么二抗相应可以选择羊抗兔。

八、洗涤

用 TBST 先快速洗三次, 把脱脂奶粉尽快洗掉。然后 5mins *5。洗涤是为了洗去二抗的非特异性结合, 洗涤的效果直接影响结果背景的深浅, 所以洗涤一定要干净。

九、显色 (HRP 酶)

1. 增强化学发光法(ECL)

Ecl 显色原理: 鲁米诺在免疫测定中既可用作标记物, 也可用作过氧化物酶的底物。在 Ecl 底物中, 含有 H_2O_2 和鲁米诺, 在 HRP (辣根过氧化物酶) 的作用下, 发出荧光来。要注意的是, 荧光在一段时间后会越来越弱。

实验步骤:

- 1) 将两种显色底物 A 液和 B 液 1: 1 等体积混合, 一般每张膜加 1 ml。
- 2) 将混合物覆盖在膜表面, 反应 1~2 分钟, 摇晃使均匀。
- 3) 用保鲜膜把膜包起来, 放入暗盒中。
- 4) 在暗室中将 X 光片, 覆盖在膜的上面, 夹好夹子, 曝光 1 min。
- 5) 显影、定影。
- 6) 根据结果调整曝光时间和曝光区域, 得到最佳结果。

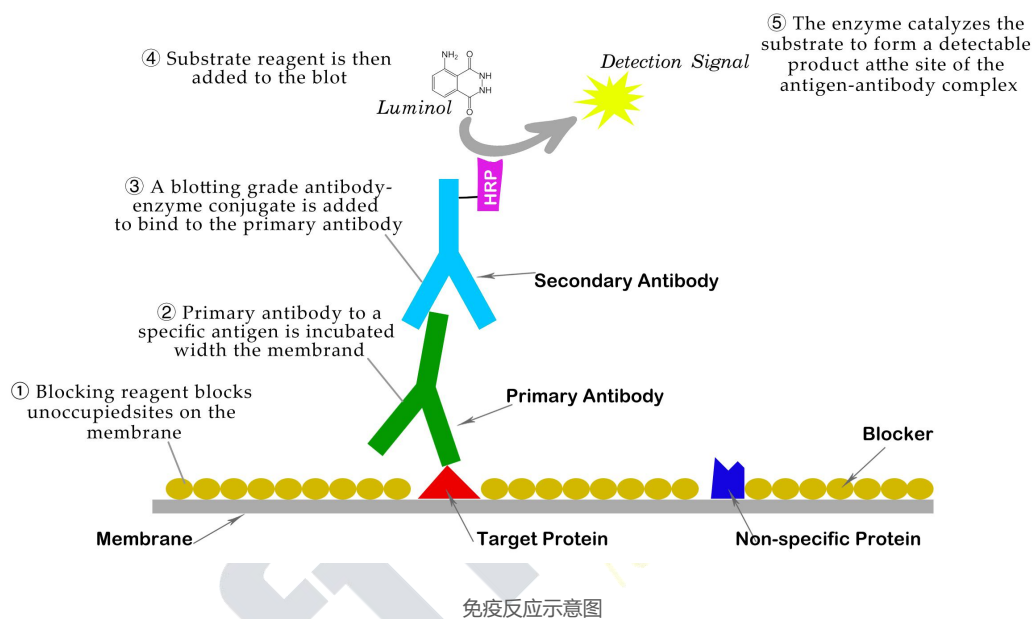
注意事项:

1.未聚合的丙烯酰胺具有神经毒性,操作时应该戴手套防护.梳子插入浓缩胶时,应确保没有气泡,可将梳子稍微倾斜插入以减少气泡的产生,梳子拔出来时应该小心,不要破坏加样孔,如有加样孔上的凝胶歪斜可用枕头插入加样孔中纠正但避免针头刺入胶内.

2.过夜封闭的时候要确保封闭液浸没了全部的膜。

3.洗膜的时候,最好将膜放在平皿中,置于水平的试验桌面上,不时用手晃动一下平皿,这样洗膜会比在脱色摇床上更完全。因为在脱色摇床上晃动,有时洗涤液不足以完全没过膜,在最后显色的时候,会发现液体流过的一道道痕迹,使背景值增加。

4.最后显色的时候,一旦目的条带出现了,就要马上对显色进行终止,否则杂带可能会出现。

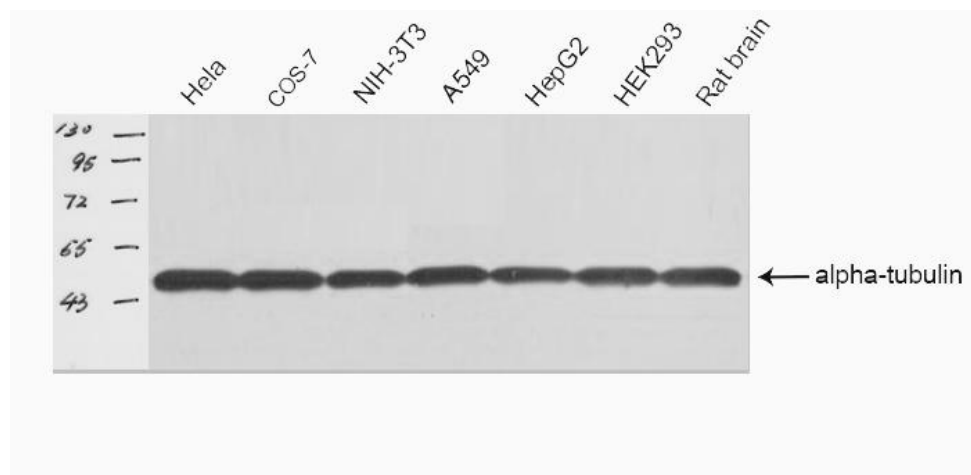


关于内参

要检测一个基因的表达产物是否正确,或者比较表达产物量的相对变化,首选方法是 Western Blot。因为 Western Blot 操作相对简单方便,既可以定性分析表达产物,同时还可以指示目的蛋白量的相对变化。所以,严谨的 Western Blot 实验设计中需要有良好的参照体系,对实验结果分析非常有用。特别是当实验出现问题时,借助参照体系很容易就可以查出问题所在。良好的参照体系通常包括分子量 Marker (用来确定蛋白条带对应的分子量大小),空白载体对照(如果是诱导表达体系还应该诱导前的对照),已知量标准产物的正对照;另外还有内参。

内参是最容易被忽略的一项。要用 Western Blot 比较不同条件下或者不同组织中,目的蛋白表达量的相对多少,前提条件是等量的细胞上样,才有比较的基础。特别表达量不高时,上样量的差别就很可能影响结果的分析。内参即是内部参照 (Internal Control),对于哺乳动物细胞表达来说一般是指由管家基因编码表达的蛋白 (Housekeeping Proteins),它们在各组织和细胞中的表达相对恒定,在检测蛋白的表达水平变化时常用它来做参照物。在 Western Blotting 实验中,除了需要进行蛋白抽提、蛋白定量、等量蛋白上样电泳、转膜、

靶蛋白抗体孵育、显色等步骤以外，还需要进行内参的检测，以校正蛋白质定量、上样过程中存在的实验误差，保证实验结果的准确性。



Western blot analysis of Tubulin alpha expression in various whole cell lysates

在 Western Blotting 中使用内参其实就是在 WB 过程中的另外用内参对应的抗体检测内参，这样在检测目的产物的同时可以检测内参的表达，由于内参在各组织和细胞中的表达相对恒定，借助检测每个样品内参的量就可以用于校正上样误差，这样半定量的结果才更为可信。此外使用内参可以作为空白对照，检测蛋白转膜情况是否完全、整个 Western Blot 显色或者发光体系是否正常。

实验结果分析其实很简单：如果样品蛋白量有限，只够进行一次电泳转膜实验时，分别检测样品的内参量和目的蛋白量。将各样品目的蛋白量分别除以其内参含量，得到的数值即为内参校正后的各样品中目的蛋白相对含量，再用此数值进行样品间的比较和分析，得到目的蛋白含量在不同样品间的实际变化结果。如果样品量充分，可以先检测内参，观测样品间内参显色条带是否一致，根据差异大小调整各样品的上样量重新进行 Western Blotting 实验，至内参量一致为止；若内参一致，即可进行不同样品间目的蛋白表达变化分析。

试剂配方：

- 1、 丙烯酰胺和 N, N'-亚甲双丙烯酰胺，应以温热(以利于溶解双丙烯酰胺)的去离子水配制含有 29%(w/v) 丙烯酰胺和 1%(w/v)N, N'-亚甲双丙烯酰胺储存液丙烯酰胺 29g, N, N'-亚甲双丙烯酰胺 1g, 加 H₂O 至 100 mL。) 储于棕色瓶，4℃避光保存。严格核实 pH 不得超过 7.0，因可以发生脱氨基反应是光催化或碱催化的。使用期不得超过两个月，隔几个月须重新配制。如有沉淀，可以过滤。
- 2、 十二烷基硫酸钠 SDS 溶液:10%(w/v)0.1g SDS, 1ml H₂O 去离子水配制，室温保存。
- 3、 分离胶缓冲液:1.5 mmol/L Tris-HCL(pH8.8):18.15 g Tris 和 48 ml 1 mol/L HCL 混合，加水稀释到 100 mL 终体积。过滤后 4℃ 保存。
- 4、 浓缩胶缓冲液:0.5 mmol/L Tris-HCL (pH6.8):6.05g Tris 溶于 40 ml H₂O 中，用约 48 mL 1mol/L HCL 调至 pH 6.8 加水稀释到 100 mL 终体积。过滤后 4℃ 保存。

5、TEMED(四甲基乙二胺)原溶液催化过硫酸铵 (APS) 形成自由基而加速两种丙烯酰胺的聚合。PH 太低时, 聚合反应受到抑制。APS 提供两种丙烯酰胺聚合所必须的自由基。临用前使用去离子水配制。

6、10%过硫酸铵溶液: 称取 1g 过硫酸铵, 加超纯水溶解并定容至 10mL, 分装到 1.5 mL 微量离心管中, 冻存。

7、SDS-PAGE 加样缓冲液:在沸水终煮 3 min 混匀后再上样, 一般为 20~25ul, 总蛋白量 100 µg。

8、Tris-Gly 电泳缓冲液: 30.3g Tris, 188g 甘氨酸, 10g SDS, 用蒸馏水溶解至 1 L, 临用前稀释 10 倍。pH8.3。

9、转移缓冲液: 2.9g 甘氨酸、5.8g Tris 碱、0.37g SDS (也可不加), 200 mL 甲醇 (临用前加), 加水至总量 1L。

10、丽春红染色液: 丽春红 S 2g 三氯乙酸 30g 磺基水杨酸 30g 加水至 100 mL 用时上述储存液稀释 10 倍即成丽春红 S 使用液。使用后废弃。

11、脱脂奶粉 5% (w/v)。10 g 脱脂奶粉, 在 200 mL TBST 中搅拌溶解。

12、NaN₃ 0.02% 叠氮钠 (剧毒, 务必戴手套操作), 可溶于磷酸缓冲盐溶液(PBS)。

聚丙烯酰胺凝胶溶液配方比例:

分离胶:

分离胶 12.5% ,PH8.8	5 mL	10 mL	15 mL
dd H ₂ O	1.5 mL	3.0 mL	4.5 mL
30%丙烯酰胺溶液	2.1 mL	4.2 mL	6.3 mL
1.5mol/L Tris 溶液 pH8.8	1.3 mL	2.6 mL	3.9 mL
10%SDS	0.05 mL	0.10 mL	0.15 mL
TEMED	0.002 mL	0.004 mL	0.006 mL
10%过硫酸铵	0.02 mL	0.04 mL	0.06 mL

浓缩胶

浓缩胶: 5% , pH6.8	2 mL	4 mL	6 mL
dd H ₂ O	1.4 mL	2.8 mL	4.2 mL
30%丙烯酰胺溶液	0.3 mL	0.6 mL	0.9 mL
1.0mol/L Tris 溶液 pH6.8、	0.25 mL	0.50 mL	0.75 mL
10%SDS	0.02 mL	0.04 mL	0.06 mL
TEMED	0.002 mL	0.004 mL	0.006 mL
10%过硫酸铵	0.02 mL	0.04 mL	0.06 mL

第四章：常见问题的分析和解决办法

白板，无信号

问题所在	可能原因	解决办法
抗体相关	二抗选用不恰当	选择与一抗相匹配的二抗类型，如一抗来自兔，那么二抗要选择抗兔的抗体
	抗体稀释度不合适	降低一抗稀释度；增加孵育时间；尝试梯度稀释，优化实验条件
	抗体不适用于 western blot	检查 datasheet 看抗体是否可用于 western blot；尝试梯度稀释，优化实验条件
	储存时间较长或储存条件不当导致抗体失活	尝试梯度稀释；选择新的抗体
抗原相关	一抗不识别待检测的目的蛋白	参照 datasheet, 对比抗原序列和蛋白序列以确保会发生特异性反应
	抗原量不足	每条泳道上样量不低于 20~30 ug, 使用蛋白酶抑制剂并设置阳性对照
实验操作相关	转膜不充分	使用丽春红 S 染膜或使用考马斯亮蓝染胶检测转膜效果；检查转膜操作是否正确；优化电转条件；使用两张膜叠加载一起，防止转膜过度
	洗膜次数过多	减少洗膜次数和洗膜时间
buffer 相关	封闭液与一抗或二抗有交叉反应	使用温和的去污剂如 Tween-20，或更换封闭液
	缓冲液中含有叠氮钠	避免叠氮钠和 HRP 一起使用
	ECL 发光液失活	更换新的有效的发光液

高背景

问题所在	可能原因	解决办法
抗体相关	一抗，二抗浓度较高	提高一抗，二抗稀释度；尝试梯度稀释，优化实验条件
	一抗，二抗和封闭液结合	更换封闭液；更换二抗
	储存时间较长或储存条件不当导致抗体失活	尝试梯度稀释；选择新的抗体
	牛奶中含有的酪蛋白(casein)，对磷酸化抗体有影响	更换封闭液，例如 BSA
实验操作相关	封闭温度过高，膜封闭不充分，或封闭过程中膜变干燥	尝试 4℃ 封闭过夜；确保在充分震荡的条件下孵育膜，并且抗体充分覆盖膜表面
	PVDF 膜的背景相对较高	换用 NC 膜进行 WB 实验
	孵育中洗膜不充分	适当增加洗膜时间，和次数
	曝光过度	缩短曝光时间，或等 5~10 分钟后重新使用 X 光片进行曝光
	缓冲液中去污剂不够	增加 TBST 中 Tween 20 的浓度

buffer 相关	转膜液, 封闭液等不新鲜或被污染	现用现配
-----------	------------------	------

条带弱, 信号弱

问题所在	可能原因	解决办法
抗体相关	一抗或二抗稀释度过高	降低一抗, 二抗稀释度; 尝试梯度稀释, 优化实验条件
	抗体和抗原亲和力较低	降低一抗, 二抗稀释度; 降低洗膜次数
抗原相关	上样量不足	检查待测样本, 增加上样量
实验操作相关	转膜不充分	使用丽春红 S 染膜或使用考马斯亮蓝染胶检测转膜效果; 检查转膜操作是否正确; 优化电转条件; 使用两张膜叠加载一起, 防止转膜过度
	ECL 曝光时间过短	增加曝光时间
buffer 相关	封闭液选择不当	降低脱脂奶粉浓度, 或更换封闭液

条带位置异常, 杂带多

现象	可能原因	解决办法
条带出现位置比预期低	目的蛋白经过剪切或降解, 有相同或相似抗原表位的蛋白被抗体检测出	样品准备时候要在冰上操作; 加入更多蛋白酶抑制剂; 更换别的抗体
条带出现位置比预期略高	蛋白可能被糖基化, 或氨基酸残基被修饰	使用酶去除可能的蛋白修饰; 检查抗原序列
条带出现位置比预期高很多	蛋白可能没有充分变性, 导致了二聚体, 多聚体的形成	实验之前加入新配的 DTT 或 β -ME, 重新加热使得蛋白充分变性; 使用新的蛋白样本
杂带较多	一抗浓度过高, 或和其他蛋白的相似抗原表位发生交叉反应	使用经亲和纯化的一抗; 尝试梯度稀释, 优化实验条件; 使用多肽封闭做对照
	二抗浓度过高, 导致非特异性结合	降低/优化二抗稀释比; 使用二抗做对照, 检测非特异性结合
	蛋白存在多种不同的 isoform	查阅文献, BLAST 搜索; 使用 datasheet 推荐的细胞株或组织
	细胞传代次数过多, 蛋白表达不同	使用原代细胞株, 和现在的细胞株一起做参照
条带模糊	转膜电压过高; 转膜缓冲液组分问题; 转膜中有气泡残留	降低转膜电压; 重新配转膜缓冲液; 在电转之前小心地移除膜和胶之间的气泡
条带的“微笑”效应	迁移过快; 电泳时温度过高	优化电泳条件, 降低电泳温度, 在冰上操作
不均匀的白色斑点	转膜时有气泡, 或膜上抗体分布不均匀	转膜前小心去除气泡, 抗体孵育时保持摇动

条带分布不均匀

问题所在	可能原因	解决办法
抗体相关	HRP 酶联二抗聚合	离心，分离二抗中的聚合物
实验操作相关	孵育和洗膜时，膜变得干燥	确保孵育过程中膜完全浸没在抗体中
	气泡残留	转膜前小心去除气泡
	抗体孵育时，振荡不均匀	孵育时确保振荡器振荡均匀
buffer 相关	抗体和封闭液结合	尝试更换封闭液

第五章：专业词汇

SDS	Sodium Dodecyl Sulfate	十二烷基硫酸钠
SDS-PAGE	SDS- PolyAcrylamide Gel Electrophoresis	十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳
APS/AP	Ammonium PerSulphate	过硫酸铵
AP	Alkaline Phosphatase	碱性磷酸酶
HRP	Horseradish Peroxidase	辣根过氧化物酶
Gly	Glycine	甘氨酸, 氨基乙酸
ECL	Enhanced ChemiLuminescent	增强化学发光法
PMSF	PhenylMethaneSulonyl Fluoride	苯甲基磺酰氟

