



实验技术手册

Laboratory Technical Manual

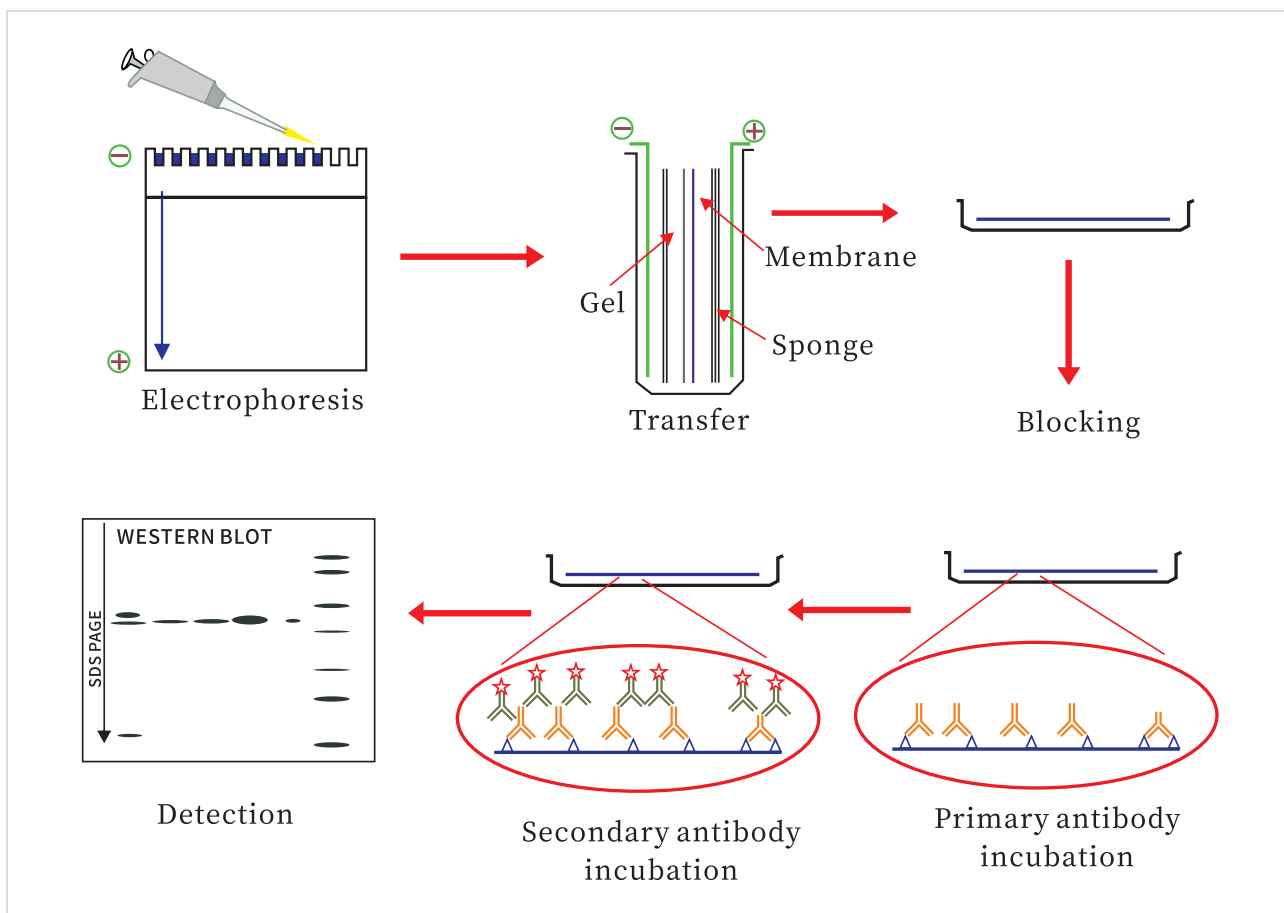
——蛋白免疫印迹 (WB)

Contents

目录

1 蛋白样品准备	01
1.1 蛋白样品来源	01
1.2 蛋白样品制备	01
1.3 蛋白裂解液的选择	03
2 蛋白定量	05
2.1 Bradford法标准曲线的绘制	05
2.2 BCA检测法（可参考相应厂家试剂盒说明完成）	06
3 上样	06
3.1 蛋白样品制备	06
4 凝胶电泳	07
4.1 SDS-PAGE凝胶	07
4.2 电泳液的配制与选择	07
4.3 Protein Marker 与内参选择	08
5 转膜	09
6 封闭	11
7 孵育一抗	11
8 孵育二抗	12
9 显影	12
10 常见问题	13

蛋白免疫印迹 (WB) 是基于抗原抗体的特异性结合作用，以检测复杂样品中的某种蛋白，并对其进行半定量分析的一种方法。通过将复杂蛋白样品置于凝胶板上，在电势作用下，按照蛋白分子大小进行电泳分离。然后取固化印迹膜与凝胶相贴，在印迹膜的自然吸附力、电场力或其它外力作用下，使凝胶中的蛋白组份充分转移到固化印迹膜上。最后通过抗原抗体特异性结合作用对载有抗原的印迹膜进行检测和分析。主要用于靶标蛋白特异性表达的定性或半定量分析，蛋白与蛋白或蛋白与DNA相互作用的后续分析，以及蛋白修饰的鉴定分析。



1 蛋白样品准备

1.1 蛋白样品来源

用于WB的蛋白样本可以是可溶性蛋白液，细胞\组织裂解液，及免疫沉淀蛋白。对于不同样品蛋白上样量存在区别，纯蛋白建议不超过100ng，细胞\组织裂解液10-40μg。

1.2 蛋白样品制备

一般从动植物组织或细胞中提取复杂蛋白成分，在提取过程中应遵守如下原则：

- ① 结合蛋白特性采用合适的提取方法；
- ② 采用合适的方法最大限度提取靶标蛋白；
- ③ 保持低温操作，并加入蛋白酶抑制剂，防止蛋白降解；
- ④ 选择合适的蛋白裂解液，以维持蛋白可溶性状态；
- ⑤ 蛋白样品-80°C低温保存或变性后保存，避免反复冻融，并尽快检测。

◎ 细胞样本蛋白制备

- 1 待细胞汇合度达到80%，取出培养皿（10cm），此时细胞生长至对数期，活性良好。弃去培养液，加入预冷的PBS缓冲液洗涤3次，置于冰上。
- 2 配制含蛋白酶抑制剂的裂解液，常用蛋白酶抑制剂见下表（表1），需根据实验要求选择合适的蛋白酶抑制剂。最常用的蛋白酶抑制剂为PMSF（工作浓度1mM），剧毒，使用时应注意自我防护，其在水中半衰期极短，故在临用前加入。
- 3 加入1ml含蛋白酶抑制剂的蛋白裂解液于10cm培养皿中，轻轻晃匀后，置于冰上裂解15-30min。
- 4 用干净的细胞刮迅速刮取细胞于一侧，并将含细胞碎片的裂解液转移至1.5ml Ep管中，置于冰上。此时应避免气泡产生。
注：收集的细胞亦可通过超声破碎进行充分裂解。将超声探头置于样本裂解液中部，但不触碰管壁或管底，进行超声。我们所使用的超声破碎仪为新芝JY92-IIIN，10%功率（650W），超2s，停3s，1ml内细胞悬液超声10-25个循环。
- 5 于4°C，12000rpm离心10-15min。
- 6 轻轻取出EP管，用枪头吸去上层上清于新的EP管中，注意不要吸到上层漂浮的脂质等杂质，并置于冰上备用。
- 7 经蛋白定量后，加入适量6× Sample loading buffer 95°C煮样5min，12000rpm离心30s，-20°C保存。

◎ 样本准备注意事项

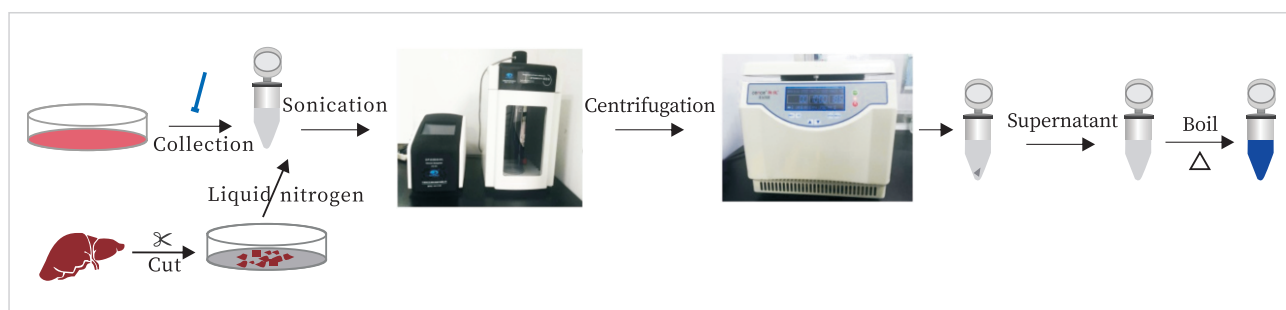
所有步骤保持低温操作，低温操作，低温操作！

1. 对于悬浮生长的细胞，通过2500rpm离心3min收集细胞后进行细胞洗涤、裂解流程。
2. 对于经药物处理的细胞，特别是凋亡相关研究的样本，还应收集培养基上清。
3. 不建议使用蛋白酶进行消化收集细胞。一方面可能引入蛋白杂质。另一方面，可能会对某些蛋白特别是膜表面蛋白产生破坏作用，干扰实验结果。
4. 裂解产物中可能会出现一团黏稠的透明胶状物，该透明胶状物为基因组DNA成分，取上清进行实验即可。但当目的蛋白与基因组结合紧密时，需要将此胶状物进行超声打碎或者注射器抽吸后，取上清进行后续实验，避免蛋白损失。
5. PMSF在水溶液中不稳定，30min即降解一半，其活性丧失速率随pH值的升高而加快，在25°C的失活速率高于4°C。当样品处理超过1h，需补加一次。
6. 重视细胞状态以及细胞传代次数的影响。不同代数的癌细胞间存在异质性，细胞形态，迁移和侵袭能力可能都会发生一定改变，同时也会使得某些基因表达发生改变。一方面是由于细胞本身存在一定异质性，经过一段时间的培养，以一种优胜劣汰的方式，逐渐使得细胞整体特性被改变。另一方面，在细胞培养过程中，由于培养条件的改变或外界的刺激的存在，如培养试剂的更换、消化传代过程、细胞污染以及一些化学和物理刺激都会对细胞的相关基因表达发生影响，最终影响实验结果。在使用瘤细胞进行实验时，应先保种，并尽量使用同一代数内的细胞进行相关实验研究，以避免由于传代次数过多造成的细胞异质性的发生，最终造成实验结果前后不一致的情况。

◎ 组织样本蛋白制备

- 1 获取新鲜组织样本，并用生理盐水或PBS洗涤干净，用洁净的剪刀将组织剪碎至合适大小。可采用1-2ml匀浆器置于冰上进行组织匀浆，或加入液氮进行研磨。因组织块相对不易破坏，且在匀浆过程中存在摩擦产热，推荐采用液氮研磨。
- 2 配制含蛋白酶抑制剂的裂解液。
- 3 加入适量含蛋白酶抑制剂的裂解液（50mg/500 μ L）于研磨后的组织样本中，将离心管置于冰上裂解15-30min，期间进行间断混匀，以充分裂解。
注：为确保组织细胞充分裂解，建议进行超声破碎。调节超声仪至适宜频率与功率（超声功率不宜过大，并设置超声间歇，以防止超声探头过度产热），将超声探头置于样本裂解液中部，但不触碰管壁或管底，进行冰浴超声。
- 4 于4 $^{\circ}$ C，12000rpm离心10-15min。
- 5 轻轻取出EP管，用枪头吸去上层上清于新的EP管中，注意不要吸到上层漂浮的脂质等杂质，并置于冰上备用。
- 6 经蛋白定量后，加入适量的6 \times Sample loading buffer 95 $^{\circ}$ C煮样，12000rpm离心30s，-20 $^{\circ}$ C保存。

注：组织样本务必清洗干净，剥离血管，洗去血液，避免样本中IgG的干扰。



1.3 蛋白裂解液的选择

蛋白裂解液的主要成分及其作用如下：

1. 缓冲体系

一定pH范围的缓冲体系，为蛋白提供了一个稳定环境，并增加蛋白溶解度。常用近似生理pH状态的Tris-HCl或HEPES缓冲体系，pH7.4。Tris-HCl (pKa=8.1) pH缓冲范围为7.0-9.2，其对温度较为敏感。HEPES (pKa=7.55) pH缓冲范围为6.5-8.5。

2. 盐离子

在适当盐离子浓度下，保持蛋白溶解状态。选择近似生理状态下的150mM的NaCl，不会对破坏蛋白以及蛋白间相互作用产生影响。

3. 螯合剂

螯合金属离子，以防止蛋白提取物过于黏稠，导致溶解度下降。另外，螯合剂亦可与某些酶发生相互作用，以抑制酶活性。

4. 还原剂

加入一定量的还原剂保护蛋白质上自由的巯基不被氧化，从而避免蛋白质的聚集或变性。常用 β -巯基乙醇或二硫苏糖醇（DTT），后者还原能力强于前者。 β -巯基乙醇具有挥发性，加入缓冲液中以后较短时间内会被氧化，会对蛋白活性产生影响，其使用浓度为5-20mM/L。而DTT具有更强的还原能力，且在氧化以后能够形成稳定的分子内二硫键，不会影响蛋白巯基，使用浓度相对偏低为0.5-1mM/L。长期保存建议使用DTT，但DTT溶液不稳定，需要现配现用。

5. 去垢剂

去垢剂即表面活性剂，其通过分子结构特征，表面活性剂分子的疏水段插入膜的磷脂双分子层，而改变其通透性，最终破坏膜结构。因此，表面活性剂的强度直接决定了裂解细胞的强度。裂解液中所使用的表面活性剂主要可分为两大类：阴离子型表面活性剂和非离子型表面活性剂。常用表面活性剂如下：

十二烷基硫酸钠 (SDS)：阴离子表面活性剂，具有很强的破坏力，基本可以使所有的蛋白溶解，并破坏其天然构象结构。SDS与蛋白分子以1.4:1的比例进行结合，可以有效的覆盖蛋白本身所带的电荷情况。SDS的临界胶束温度较高，在低温时即会发生沉淀，且在钾盐存在时，沉淀效果会更明显。另外溶液离子强度越强，会降低离子型去污剂的临界胶束浓度，使得这种蛋白溶解效果更强。

脱氧胆酸钠 (NaDOC)：也是一种离子型表面活性剂，作用较SDS弱。

Triton X-100：是一种非离子型表面活性剂。可以破坏蛋白质与脂质间的相互作用，但并不使蛋白变性，也不破坏蛋白与蛋白间的连接，能够保留蛋白质的天然构象。其具有较低的临界胶束浓度，在64°C下，可观察到两相分离。

NP-40：非离子型表面活性剂，对核膜的破坏作用较弱，与蛋白结合力强，可确保蛋白的充分溶解和结构稳定，特别适用于膜蛋白非变形条件下的溶解。

Tween 20：温和非离子型表面活性剂，蛋白溶解能力较弱，也不会破坏蛋白结构，并不作为蛋白裂解液的常见成分。

去污剂的选择取决于所要提取蛋白的性质与实验目的。需要充分裂解细胞，并溶解蛋白，对于提取后蛋白的状态（变性还是保留天然状态）都是需要考虑的问题。

6. 蛋白酶抑制剂

由于在蛋白提取过程中，细胞和组织被破坏，大量蛋白酶被释放。除了保持在低温条件下操作以抑制蛋白酶活性外，还应加入适量蛋白酶抑制剂以抑制蛋白酶的活性，防止目的蛋白的降解。常用蛋白酶抑制剂如下表：

蛋白酶抑制剂	作用	工作浓度	特点
PMSF	丝氨酸蛋白酶抑制剂 巯基蛋白酶抑制剂	0.5-1mM	在水中半衰期短，需临用前加入。 剧毒，实验操作时应注意防护。
APMSF	丝氨酸蛋白酶抑制剂	0.4-4mM	-
Pepstatin	天冬氨酸蛋白酶抑制剂	1μM	4°C可保存一周，分装于-20°C保存一月，避免反复冻融。
Leupeptin	丝氨酸和半胱氨酸蛋白酶抑制剂	10-100μM	4°C可保存一周，分装于-20°C长期保存，避免反复冻融。
Aprotinin	丝氨酸蛋白酶抑制剂	0.01-0.03μM	4°C可保存一周，分装于-20°C长期保存，避免反复冻融。
Na ₃ VO ₄	磷酸酶抑制剂	1mM	需活化。溶解后加酸调整pH到10，并加热煮沸至无色，室温冷却，再调整pH到10。反复，直到溶液保持无色，pH稳定在10，分装保存于-20°C。
NaF	磷酸酶抑制剂	10-20mM	-

表1

对大部分样本，RIPA裂解液可以进行快速的裂解过程，配方如下：

50mM Tris-HCl

150mM NaCl

1mM EDTA

0.1% SDS (W/V)

1% Sodium deoxycholate (W/V)

1% Triton X-100 (V/V)

使用时，临时加入蛋白酶抑制剂，根据实验目的选取合适的蛋白酶抑制剂。

2 蛋白定量

为了对样品中的目的蛋白进行相对定量，需要对样品间的总蛋白量进行检测。在总蛋白含量一定的情况下，体现目的蛋白的表达差异。常用化学定量方法如下（表2）：

方法	原理	干扰因素	特点
Bradford法	酸性条件下，蛋白与染料G-250结合后，会引起染料最大吸收波长的改变。在一定范围内，蛋白含量与595nm吸收峰呈线性关系。	易受强碱性缓冲液，高浓度去污剂的干扰。	检测快速，灵敏度高，最低检测下限为1μg，复合物具有较高消光系数，颜色稳定。但对于检测蛋白具有选择性，主要检测碱性氨基酸和芳香族氨基酸。
BCA法	在碱性条件下，二价铜离子被蛋白还原成一价铜离子，其可与BCA发生显色反应。在562nm吸收峰处，吸光度与蛋白浓度呈线性关系。	不易受到高浓度去污剂的影响，可耐受一定浓度螯合剂和还原剂的影响。	抗干扰能力强，检测较快速，灵敏度高，检测下限达到0.5μg，对于不同蛋白的检测变异系数小于Bradford法。
Lowry法	在碱性条件下，蛋白质与二价铜离子螯合形成复合物，还原酚磷钼酸会产生蓝色复合物，颜色深浅与蛋白质含量呈线性关系。	适用于脂类含量较高的样品检测，可耐受一定浓度去垢剂的影响。	标曲不是严格的直线形式，不同蛋白颜色深浅变化不同，检测耗时较长。
紫外分光光度检测法	根据蛋白物理性质和朗伯比尔定律，在一定波长处的吸光度与蛋白浓度成线性关系。	-	受不同蛋白中色氨酸和酪氨酸含量影响。

表2

最常使用的蛋白定量方法是BCA法和Bradford法。但当所使用裂解液中含有高浓度去垢剂时，推荐使用BCA法定量蛋白。

2.1 Bradford法标准曲线的绘制

1 标准蛋白质溶液配制：

10mg/ml牛血清白蛋白（BSA）标准品。准确称取0.05g牛血清白蛋白，溶于5ml PBS中，即为10mg/ml牛血清白蛋白。

2 考马斯亮蓝G-250染色液配制：

称取50mg考马斯亮蓝G-250，溶于25ml 90%乙醇中，加入85%的磷酸50ml，最后用纯水定容到500ml，考马斯亮蓝染色液需避光保存。

3 稀释待测蛋白：

将蛋白稀释三种不同梯度的浓度10倍，20倍，40倍。

- 4 稀释标曲：**
将标准品稀释8种不同浓度梯度：

浓度梯度	1	2	3	4	5	6	7	8
浓度 (mg/ml)	0	0.05	0.075	0.1	0.15	0.2	0.3	0.4

- 5** 将稀释好的标曲和样品各取20ul按顺序依次加入到酶标孔条中，然后再依次加入G250染色液180ul，混匀。

- 6** 在酶标仪595nm处测定吸光值，根据吸光值做出标准曲线，并根据标准曲线计算蛋白浓度。

2.2 BCA检测法（可参考相应厂家试剂盒说明完成）

- 1** 根据蛋白数量，按50:1 (V/V) 的BCA试剂A与B配置BCA工作液，室温24h内稳定；
- 2** 溶解标准品，使终浓度为0.5mg/ml。所用溶剂与样品所用溶剂相同；
- 3** 将标准品按照0, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20 μ l体积加入到酶标板中，并加标准品稀释液补足到20 μ l；
- 4** 向个孔中加入200 μ l BCA工作液，于37 $^{\circ}$ C放置30min；
- 5** 酶标仪检测562nm处吸光度值；
- 6** 根据绘制的标准曲线计算出样品蛋白浓度。

3 上样

3.1 蛋白样品制备

变性蛋白，破坏蛋白三级结构，暴露抗原表位，便于抗体结合与后续检测。将定量后的蛋白加入等体积2 \times Sample loading buffer 或1/5体积6 \times Sample loading buffer，于95 $^{\circ}$ C加热煮沸5min。

对于膜蛋白，由于高温会使得其聚集沉淀，在37 $^{\circ}$ C处理30min即可。

6 \times Sample loading buffer 配方如下：

6%Tris (pH6.8) (V/V)

4%SDS (W/V)

0.2%溴酚蓝 (W/V)

20%甘油 (V/V)

9%DTT (V/V)

● **注意事项：**

蛋白溶液上样量以10-40 μ g/孔为宜，避免上样量超载，造成拖尾。

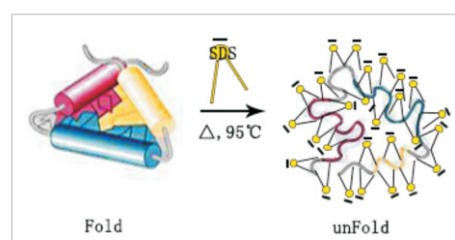
4 凝胶电泳

4.1 SDS-PAGE凝胶

利用丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺的聚合作用，可以形成一种网状的凝胶结构，具有一定的分子筛作用。蛋白在大量SDS胶束包裹下，形成SDS的电荷效应，蛋白分子本身电荷被覆盖，蛋白在电势作用下，只与所包裹的SDS所带负电荷相关，即反映分子量大小。SDS-PAGE的分辨率与所使用交联剂丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺的浓度相关。不同浓度的交联剂所形成的网状分子筛孔径不同，形成分子筛效应。分离情况如下（表3）：

分离胶浓度	分离范围 (KDa)
8%	70-200
10%	25-70
12%	20-55
15%	15-45

表3



SDS电荷效应

● 丙烯酰胺凝胶的成分及作用

成分	作用
丙烯酰胺	单体分子可发生聚合反应
N,N-双甲叉丙烯酰胺	使聚合的长链发生交联，以形成三维网状结构
Tris-HCl Buffer	提供稳定pH环境
APS	促进交联的发生，提供促发丙烯酰胺和N,N-双甲叉丙烯酰胺聚合的自由基
TEMED	催化APS形成自由基，加速聚合反应的发生

4.2 电泳液的配制与选择

常规SDS-PAGE凝胶电泳对于分离30-250kDa范围内的蛋白具有较好的分离作用，根据蛋白分子量大小的不同，参照表3选择合适的分离胶浓度。1L电泳液配方如下：

试剂	质量 (g)
甘氨酸	14.4
Tris	3
SDS	1
加入ddH ₂ O充分溶解混匀，pH8.3	

使用Glycine-Tris-gel电泳体系时，一般电泳条件为恒压，浓缩胶60-80V，分离胶100-120V。电压越小，跑的越慢，分离效果更好。但对于分子量低于30kDa的小分子蛋白，Glycine-Tris-gel体系分辨率不高，无法达到相应的分离效果。Tricine相对于Glycine具有更好的电子迁移率和解离常数，使得小分子蛋白在浓缩胶内具有更好的浓缩效应，且在分离胶内具有更高的分辨率。所以，对于小分子蛋白推荐使用电泳液配方如下：

	试剂	质量 (g)	备注
阳极液 (1L体系)	Tris	24.228	ddH ₂ O充分溶解混匀，调节pH8.9
阴极液 (1L体系)	Tricine	17.92	ddH ₂ O充分溶解混匀
	Tris	12.114	
	SDS	1	

使用Tricine-Tris-gel电泳体系时，一般条件为恒压，电压不宜过大，60-100V左右。

4.3 Protein Marker 与内参选择

在实验过程中，根据实验需求需要设置相应对照。

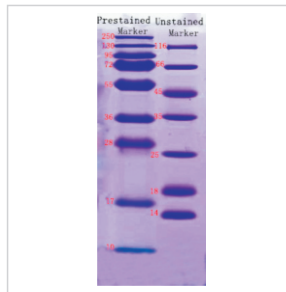
◎ 分子量指示剂

合适范围的蛋白Marker，可指示蛋白分子量大小，并在一定程度上反映电泳效果和转膜效率。按照不同使用特性，目前所使用的Marker大致可以分为3种：普通非预染Marker、预染Marker、曝光Marker。

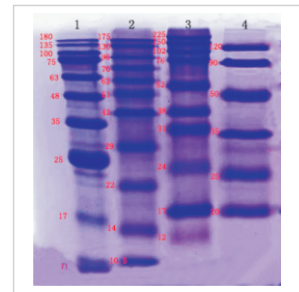
产品	优势	不足
非预染Marker	最准确蛋白Marker，未附带染料分子和标记分子，可精确判断蛋白大小。	电泳过程中不显示，无法对实验电泳和转膜过程进行实时监测，需进行染色后才可见。
预染Marker	是将蛋白与染料共价偶联，在实验过程中，可直接肉眼观察，对电泳和转膜过程起到参照作用。	由于染料偶联导致染色后的蛋白分子电泳的迁移效率发生改变，导致指示分子量发生偏差，不能精确定位。最后结果需将Marker与目的条带进行对比确定，存在人为误差。
曝光Marker	在曝光步骤中，可将目的带和Marker带同时曝光显示，减小误差。并克服了预染Marker迁移率的变化。	价格昂贵

这也是为什么在实验过程中，会出现指示的目的带大小与理论大小存在一定偏差的原因。那么如何规避预染Marker的偏差呢？可通过与普通Marker做对比实验，确认两者的差异大小，共同对目的带进行精确定位（如下左图所示，即预染Marker与非预染Marker的大小偏差）。另外，不同厂家的Marker指示剂差异较大，实验时需谨慎选择（如下右图所示，即不同厂家Marker的大小偏差）。在对阳性结果做判断时，需将Marker造成的大小偏差考虑在内。

预染与非预染Marker偏差图



不同厂家预染Marker偏差图



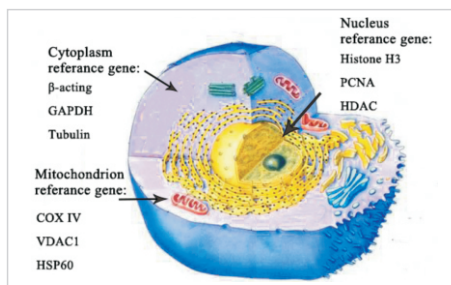
◎ 阳性对照

组织或细胞中已证实有相应蛋白表达的样本即阳性对照品。

◎ 内参对照

由于管家基因编码表达的蛋白在各种组织和细胞中的表达量相对恒定，故而在对蛋白进行定量检测时，需要将此类蛋白作为内参，以校正蛋白定量和上样的误差。另外，内参蛋白还可以用于监测整套实验体系是否成功。

由于研究对象的不同，需要根据实验目的对内参蛋白进行选择：



Common internal reference gene

	核	核膜	胞浆	胞膜	线粒体	膜
动物组织或细胞	Histone H3 (17KD)、PCNA (29KD)	Lamin B (66KD)	β -actin (43KD)、GAPDH (36KD)、Tubulin (5KD)	Na ⁺ /K ⁺ -ATPase (120KD)	CoX IV (17KD)、VDAC1 (30KD)	ATP1A1 (113KD)

此外，在选择内参蛋白时还应注意以下几点：

1. 注意某些特定条件下的内参基因表达可能发生变化，而不适于作为内参对照。比如药物诱导或者外界刺激存在时，导致某些管家基因的表达量不再恒定，而是发生一定变化。需要结合具体的实验方案，并查询相关文献综合考虑。
2. 目的蛋白与内参蛋白大小应存在差异，便于检测操作和区分。如果选用的内参蛋白大小与目的蛋白大小相差不大时，可以先进行目的蛋白的显影。随后采用一抗二抗去除液洗去目的抗体，再进行内参抗体的孵育与显影。

5 转膜

◎ 转膜方式

将电泳分离后的蛋白从凝胶中转移到固相介质上，通常采用湿转和半干转。两种方法原理相同，只是施加电场的机械装置和用于固定胶与膜的方式有所不同，半干转用浸润缓冲液buffer的多层滤纸替代。两种方法比较如下：

方式	优势	不足
湿转	转膜效果好，转膜过程温度可控	转膜时间较长，需要大量转膜缓冲液
半干转	转膜效率高，时间短，需要转膜buffer缓冲液较少	转膜过程温度不可控，高热造成高背景

在转膜时，高电流作用下，短时间内装置产热非常明显，所以转膜过程应采取相关措施，以保持低温环境。湿转时，可以将装置进行冰浴，有利于散热。半干转时，不宜长时间进行电转，所以推荐大分子蛋白（100kDa以上）采用湿转。对于小分子蛋白和正常分子蛋白，湿转与半干转效率相差不大。对于高丰度，小块胶，建议干转，提高效率。低丰度，大块胶，建议湿转。

◎ 膜介质的选择

转膜过程中使用的膜介质，目前使用最多的包括两种，即硝酸纤维素膜（NC膜）和PVDF膜。

膜介质	NC膜	PVDF膜
蛋白截留力	80-100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	100-300 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$
结合强度	低	高
材料质地	脆	较为柔韧
是否需要活化	无需活化	需要醇活化

NC膜的结合能力主要是与其纯度相关，纯度越高，与蛋白结合能力更强。但纯度高的NC膜较脆，容易出现破碎的情况。相对于NC膜，PVDF膜具有更强的蛋白结合能力，且其具有更好的化学耐受性。需要注意的是，PVDF膜使用前，需在甲醇中浸泡（>15s）以活化膜上的正电基团，并在转膜液中平衡一段时间。另外，PVDF膜与NC膜都具有不同孔径大小。对于小分子蛋白（<20kDa），建议使用0.22 μm 孔径的膜，避免出现转过的现象。正常情况下使用0.45 μm 孔径的膜即可。

◎ 蛋白分离与转膜条件优化

对于小分子蛋白的转膜，可从以下几点进行优化：

1. 可以增大交联剂浓度，采用15%丙烯酰胺凝胶进行电泳。但对于15 Kda以下的蛋白，此胶的分辨率较低，建议在浓缩胶和分离胶之间增加10%的间层胶，以增加小分子蛋白分辨率。
2. 采用Tris-Tricine电泳体系替代Tris-Glycine缓冲体系，达到更好的浓缩作用与分离效果。注意应用该系统时，电压不宜过大，60-80V为宜。
3. 选取0.22 μm 孔径的膜介质
4. 缩短转膜时间，可采用干转方式进行转膜。

对于大分子蛋白的转膜，可从以下几点进行优化：

1. 降低交联剂浓度，采用8%-5%丙烯酰胺凝胶进行电泳，但需注意胶浓度越低，越容易破碎，操作时应小心。
2. 转膜时，电流适当调大，转膜时间延长，并避免转膜过程中出现高热，推荐湿转4℃过夜。
3. 适当降低转膜缓冲液中的甲醇，可促进胶中SDS分子与蛋白的分离，高浓度的甲醇对蛋白有固定作用，而不利于大分子蛋白泳出，可降低甲醇浓度至10%。

◎ 转膜效率监测

1. 预染Marker的转膜情况在一定程度上反映了蛋白转移效率。
2. 对胶进行丽春红染色，根据染色后的条带查看是否转膜成功。此过程为可逆过程，但不适用与尼龙膜的染色。

丽春红染色液的配制：5% (V/V) 乙酸，0.1% (W/V) 丽春红，ddH₂O混匀，置于4℃保存。

丽春红染色流程如下：将转膜后的PVDF膜或NC膜浸没在丽春红染色液中5-10min振荡。取出印迹膜，用PBS洗涤3×5min。观察染色的红色条带，记录转膜情况。再次使用PBS洗涤3×5min，以去除结合的丽春红，便于后续WB检测。

3. 对胶进行考马斯亮蓝染色，此染色过程不可逆，但考马斯亮蓝染色灵敏度较丽春红高。

考马斯亮蓝染色液的配制：10% (V/V) 冰醋酸，45% (V/V) 甲醇，0.25% (W/V) ， ddH₂O混匀

考马斯亮蓝脱色液的配制：25% (V/V) 甲醇，8% (V/V) 冰醋酸， ddH₂O混匀

考马斯亮蓝染色流程如下：将转膜后的PVDF膜或NC膜浸没在考马斯亮蓝染色液中，置于水平摇床上缓慢摇动，室温染色1h（根据胶大小、厚度和温度调整），至胶染成蓝色。倒出染色液，将胶浸入脱色液中，置于水平摇床上缓慢摇动，室温脱色4h，至蓝色背景脱去，蛋白条带可见。

◎ 转膜缓冲液的配制

1L转膜缓冲液配制如下：

试剂	质量 (g)
甘氨酸	11.26
Tris	2.43
甲醇	200ml
加入ddH ₂ O充分溶解混匀	

转膜buffer需避光保存，可重复使用多次，但由于甲醇较易挥发，应及时更换使用新鲜转膜缓冲液。

6 封闭

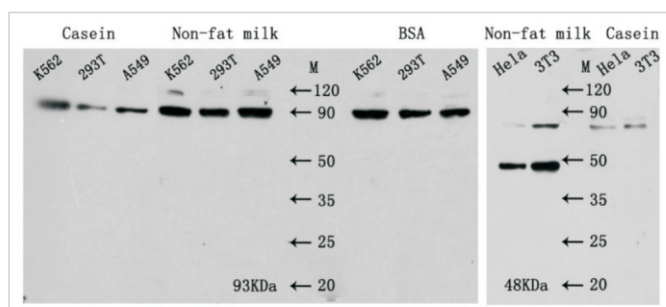
◎ 封闭剂的选择

固相介质表面材质不均一，有很多细小孔洞。当蛋白被转移至固相介质以后，通过非共价作用力吸附于固相介质表面。但并不是所有位点都吸附了蛋白，故需要将封闭剂吸附到固相介质上，以避免抗体分子直接吸附到膜上，产生假阳性或者高背景的结果。选择封闭剂的原则是封闭剂应能够封闭膜上所有未结合位点，而不干扰目的蛋白的结合，且不与靶蛋白表位进行结合，不与抗体及其他试剂有交叉反应。

常用封闭剂如下：

封闭剂	优点	不足
5% 脱脂奶粉	成分复杂，含有多种不同分子量蛋白，封闭全面。	不适于生物素-亲和素和碱性磷酸酯酶检测系统（因脱脂奶粉中有少量生物素和碱性磷酸酯酶残留）
1% 酪蛋白	中性和碱性条件性带有负电，与带正电的膜具有相互作用	溶解性较差，不利于封闭
5% BSA	成分单一，大多数情况适用	当免疫原偶联有BSA时，由于其具有一定免疫原性，故而可能与抗体中残留的BSA抗体发生交叉反应，产生一定背景
血清	除能够封闭非特异性结合以外，血清中的抗体还可以封闭样本中可能的FC受体，以避免一抗二抗与样本FC受体的相互作用	成本相对较高
非蛋白化合物	明胶、Tween-20等可降低蛋白间疏水作用，洗脱非特异性吸附，提高抗体特异性识别能力	—

不同封闭剂的比较实验如下：



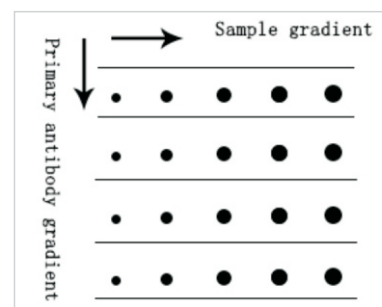
Comparison of different blocking buffer

需要特别注意的是，对于磷酸化的蛋白，进行检测时不建议使用脱脂奶粉和酪蛋白作为封闭剂，并使用TBST替代PBST。对于封闭剂的选择需要根据结果情况进行相应调整，对于大部分抗体在用脱脂奶粉时，可以达到好的封闭效果，但有些抗体在使用BSA封闭时，能够更好的降低背景。封闭条件一般为室温振荡封闭1h。

7 孵育一抗

按照产品说明，对一抗进行适当稀释，一抗稀释液一般与封闭剂组分相同。另外，建议选择已有验证的一抗。另外，一抗建议4°C孵育过夜，使抗原抗体充分结合。

对于一抗稀释比例最好做梯度预实验，以确定最佳稀释比例。此时可采用简单的Dot blot法进行摸索。使用NC膜，在膜上依次点上不同上样量的样本，自然风干。待膜完全吸收样本后，进行封闭。随后，按上样梯度对膜进行裁剪，分别采用不同浓度梯度的一抗孵育，相同二抗孵育。最后ECL发光底物孵育显影。观察显影情况进行抗体稀释比范围的初步判定。



Dot Blot

8 孵育二抗

◎ 实验操作

1. 二抗孵育前，用PBST/TBST洗膜3×10min，以去除未结合的一抗。
2. 对二抗进行适当稀释，室温孵育1h。
3. 二抗孵育完成后，用PBST/TBST洗膜3×10min，以去除未结合的二抗，再进行后续实验。

◎ 二抗选择

1. 物种来源

不建议选择来源于鼠或兔来源的二抗，因其与人的同源性较大，容易发生交叉反应，导致高背景。常使用羊或驴来源二抗，所使用二抗必须与一抗种属来源不同，且需根据一抗种属选择抗该种属的二抗。另外，还应注意所使用单克隆一抗的亚型，选择针对一抗亚型的二抗。

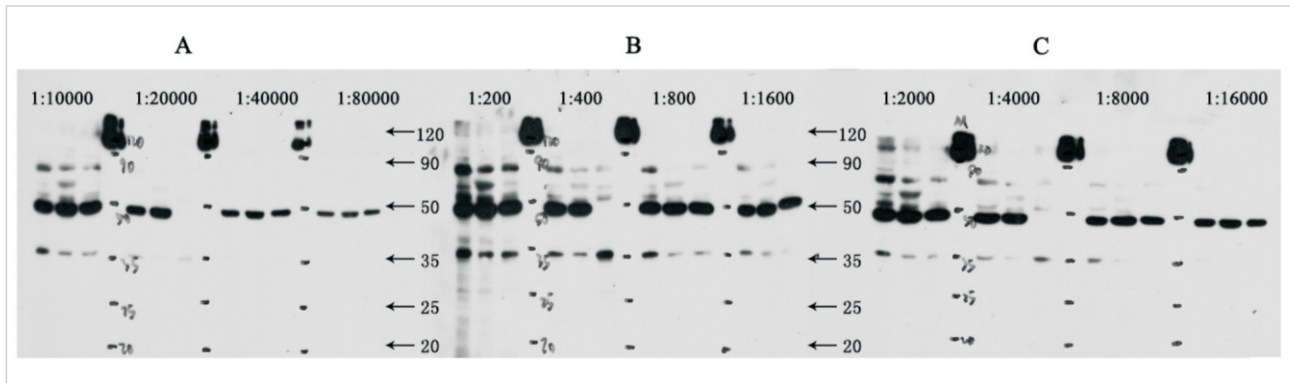
2. 纯化方式

对于目前抗体纯化方式主要有Protein G/A纯化和抗原亲和纯化。前者可与血清中所有抗体IgG分子发生结合，抗原特异性无区分。后者是通过能够与抗体特异性识别的配体或者受体来进行结合洗脱，可以纯化血清中的特异性抗体成分。所以，亲和纯化二抗可大大减少非特异性结合，提高蛋白的检测特异性。

3. 合适的标记物

WB中最常使用二抗标记物为酶标二抗，如辣根过氧化物酶HRP和碱性磷酸酯酶AP。HRP特异性强，作用底物较为广泛，经济快速，且稳定。AP虽然更为灵敏，但其背景往往更高，且在实验样本中可能存在的内源性磷酸酯酶会干扰实验结果。另外，使用AP标记二抗时，封闭剂也应谨慎选择，避免磷酸酯酶的干扰。

不同厂家二抗（HRP标记）的比较实验如下：



The dilution ranges are according to instructions of different manufacturers

9 显影

1. 化学发光显色

最为经典的HRP化学发光底物Luminol，在H₂O₂存在下，与辣根过氧化物酶发生酶促反应，发出荧光，灵敏度高，成像性好，可在胶片上进行显影。

2. 底物显色

HRP的显色底物有多种，其中最常用的是DAB，其通过与HRP反应生成不溶性棕褐色沉淀而显色，其灵敏度高，但需要现配现用，且具有致癌性，操作时应小心操作。

3. 荧光显色

通过使用合适的荧光二抗，可实现荧光二抗显影，弥补了化学发光和底物显色的定量缺陷。

10 常见问题

1. 高背景

可能原因	解决办法
封闭不充分或封闭剂不合适	选择合适封闭剂，并优化封闭效果
抗体孵育浓度过高，孵育时间过长或温度过高	优化抗体孵育浓度与时间
洗涤不充分	洗涤次数和时间适当延长
二抗非特异性结合	设置二抗对照，并选择合适的二抗试剂
干膜	操作过程中保持膜湿润状态
膜污染	操作过程保持膜整洁，不要用手按压
发光底物过度残留	吸干多余发光液后进行显影
显影时间过长	显影时应短时显影到长时显影

2. 无目的条带

可能原因	解决办法
样本目的蛋白表达量过低或无表达	确认样本可行性，对表达过低的样本进行富集后再进行实验
蛋白提取过程中降解	蛋白提取时，保持低温状态，并加入蛋白酶抑制剂
蛋白样本保存条件不合适，蛋白降解	蛋白样本建议加入上样缓冲液煮沸变性后保存，对于稀有样本建议分装于-80°C保存
蛋白转膜效率低	丽春红染色确认转膜体系是否正常
抗体孵育浓度过低或时间过短	优化抗体孵育量，一抗建议4°C过夜孵育
一抗二抗检测体系不匹配	选择合适的一抗二抗
抗体失活	正确保存抗体
显影液使用时间过长	使用新鲜试剂，并避光保存

3. 分子量大小与理论不符

可能原因	解决办法
Marker指示大小偏差	选择合适的预染Marker，并与非预染Marker对比，观察差异大小
电泳体系影响	避免边缘孔的不稳定因素，在中间孔上样，边缘孔加入等量上样缓冲液平衡体系
翻译后修饰	查阅文献，确认蛋白本身是否存在磷酸化或糖基化等修饰
翻译后剪切及异构体	查阅文献，确认蛋白是否存在多种剪切活性形式
蛋白多聚体形成	蛋白二聚体或多聚体形成，在样本制备过程中，使用新鲜的DTT或β-巯基乙醇，保持蛋白单体状态
蛋白相对电荷变化	蛋白氨基酸组成不同，某些蛋白所带电荷未能被带负电的SDS所覆盖，导致蛋白迁移率与蛋白大小不成正比

4. 其他异常情况

可能原因	解决办法
反影或膜上可见黄色条带	一抗二抗抗体浓度过高或样本上样量过大，导致酶被瞬间消耗
白色空点	转膜三明治制备时有气泡，或者抗体孵育不均匀，应震荡孵育
黑色斑点背景	封闭液颗粒残留，在使用前应充分搅拌溶解
微笑条带	条带迁移过快，降低电压；胶凝固不均匀，正确制备凝胶；
皱眉条带	电泳时，电泳丝底物聚集大量气泡，导致电压不平衡
条带拖尾	样品内有不溶物，离心或者优化样本蛋白提取； 上样量过载，降低上样量； 使用凝胶浓度不合适，蛋白分辨率较低，调整交联剂比例； 电泳液反复使用多次，重新配置新鲜电泳液；
条带扭曲	胶界面不平导致歪斜或凝胶制备不均匀； 样本中盐离子浓度过高，干扰电泳； 电压过高，电泳迁移过快；



武汉华美生物工程有限公司
WUHAN HUAMEI BIOTECH CO., LTD.

地址：武汉东湖高新技术开发区高新大道818号高科医疗器械园B11号2楼

QQ: 1031906505

网址: www.cusabio.cn



027+87939808