

免疫印迹(Western Blot)的基本原理、实验步骤及 FAQ

查看 Western blot 实验问题：[Western Blot 的常见问题\(FAQ\)](#)

Western Blot 采用的是聚丙烯酰胺凝胶电泳,被检测物是蛋白质,“探针”是抗体,“显色”用标记的二抗。SDS-PAGE 可对蛋白质样品进行分离,转移到固相载体——例如硝酸纤维素薄膜(NC)上。固相载体可以吸附蛋白质,并保持电泳分离的多肽类型及其生物学活性不变。转移后的 NC 膜就称为一个印迹(blot),用蛋白溶液(如 5%BSA 或脱脂奶粉溶液)处理,封闭 NC 膜上的疏水结合位点。用目标蛋白的抗体(一抗)处理 NC 膜——只有待研究的蛋白质才能与一抗特异结合形成抗原抗体复合物,这样清洗除去未结合的一抗后,只有在目标蛋白的位置上结合着一抗。用一抗处理过的 NC 膜再用标记的二抗处理,二抗是指一抗的抗体,如一抗是从鼠中获得的,则二抗就是抗鼠 IgG 的抗体。处理后,带有标记的二抗与一抗结合形成抗体复合物可以指示一抗的位置,即是待研究的蛋白质的位置。

Western Blot 实验试剂及仪器

试剂准备

(1) 甲醇

(2) 转移缓冲液 (Tris 5.8g 甘氨酸 2.9g SDS 0.37g 甲醇 200ml V=1L)

(3) 一抗,二抗

(4) PBST, PBS, Tween-20

(5) 显影液 (5X):

自来水 (加热至 50°C) 375ml (以下药品加到温水中)

米吐尔 1.55g, 亚硫酸钠 (无水) 22.5g, 碳酸钠 (无水) 33.75g, 溴化钾 20.95g, 补水至 500ml

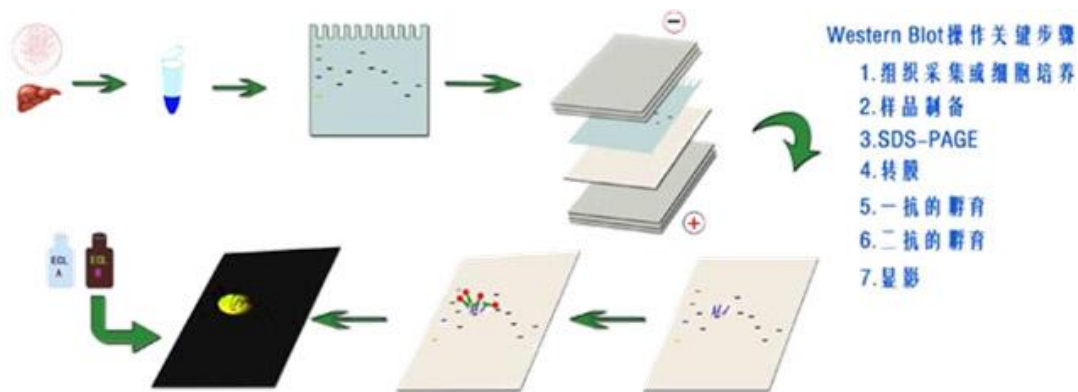
(6) 定影液:

自来水 (50~60°C) 700ml (以下药品按顺序加入前者溶解后再加后者)

硫代硫酸钠 240g, 亚硫酸钠 (无水) 15g, 冰乙酸 12.6ml, 硼酸 7.5g, 钾明矾 15g (水温冷至 30°C 以下时再加入), 加水定容至 1000ml, 室温保存 材料准备

转膜用的夹子, 两块海绵垫, 一支滴管, 两张滤纸, 一张 PVDF 膜, 转膜槽, 转移电泳仪, 摇床, 计时器, 磁力搅拌器, 转子, Western blot 盒, 一块 SDS-PAGE 胶, 脱脂奶粉

实验步骤



(一) 配胶

将玻璃板洗净, 最后用 ddH₂O 冲洗, 将与胶接触的一面向下倾斜置于干净的纸巾晾干。

分离胶及浓缩胶均可事先配好 (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), 加入 10%AP 及 TEMED 即可。

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% 时用异丁醇或异戊醇, 也可以用 0.1% 的 SDS, 封胶后静置至胶凝固。待胶凝后将封胶液倒掉, 如用醇封胶需用大量清水及 ddH₂O 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。

灌好浓缩胶后 1h 拔除梳子, 注意在拔除梳子时防止气泡进入梳孔使梳孔变形。拔出梳子后用 ddH₂O 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。30min 后上样, 长时间有利于胶结构的形成, 因为肉眼观的胶凝时其内部分子的排列尚未完成。(10% 的 AP 最好现配现用, 如在 4°C 存放勿超过两周。30% 的丙烯酰胺如有沉淀, 最好弃掉)

(二) 样品处理

培养的细胞 (定性)

去培养液后用温的 PBS 冲洗 2~3 遍 (冷的 PBS 有可能使细胞脱落)。

对于 6 孔板来说每孔加 200~300uL, 60~80°C 的 1×loading buffer。

刮下的细胞在 EP 管中煮沸 10min, 期间 vortex 2~3 次。

用干净的针尖挑丝 将团块弃掉 如果没有团块但有拉丝现象 可将 EP 管置于 0°C 后在 14000~16000g 离心 2min, 再次挑丝。若无团块也无丝状物但溶液有些粘稠, 可使用 1ml 注射器反复抽吸来降低溶液粘滞度, 便于上样。

待样品恢复到室温后上样。

培养的细胞 (定量)

去培养液后用温的 PBS 冲洗 2~3 遍 (冷的 PBS 有可能使细胞脱落)。

加入适量的冰预冷的裂解液后置于冰上 10~20min。

刮下的细胞收集在 EP 管后超声 (100~200w) 3s, 2 次。

12000g 离心, 4°C, 2min。

取少量上清进行定量。

将所有蛋白样品调至等浓度 充分混合沉淀后加 loading buffer 后直接上样最好 剩余溶液 (溶于 1×loading buffer)

可以低温储存, -70°C 一个月, -20°C 一周, 4°C 1~2 天, 每次上样前 98°C, 3min。

组织

心肝脾肾等组织可每 50~100mg 加 1ml 裂解液, 肺 100~200mg 加 1ml 裂解液。可手动或电动匀浆。注意尽量保持低温, 快速匀浆。

12000g 离心, 4°C, 2min。

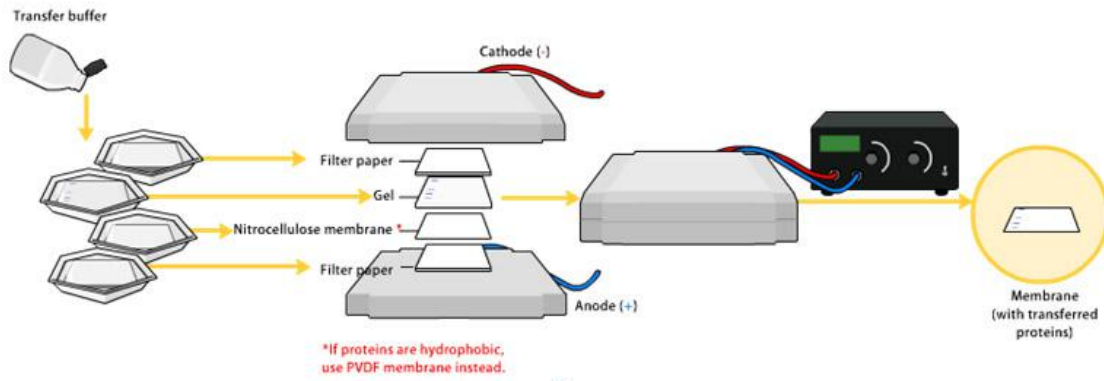
取少量上清进行定量。

将所有蛋白样品调至等浓度 充分混合沉淀加 loading buffer 后直接上样最好 低温储存剩余溶液 (溶于 1×loading

buffer), 每次上样前 98°C, 3min。

(三) SDS-PAGE 电泳(不用染色!)

使待测样品中的蛋白质按分子量大小在凝胶中分成带。关于 SDS-PAGE 实验操作原理及 FAQ 参考 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳



(四) 转膜

电泳结束前 20 分钟左右戴上手套开始准备

- 1、准备：转移缓冲液 (Tris5.8g 甘氨酸 2.9g SDS 0.37g 甲醇 200ml V=1L)、转膜用的夹子、两块海绵垫、一支滴管、2 张滤纸、一张 PVDF 膜。
- 2、剪切滤纸和膜时一定要戴一次性 PE 手套，避免手上的蛋白污染膜。转膜前，PVDF 膜应在甲醇溶液中浸泡 5-10 秒，浸湿为止，在平衡液中平衡 (甲醇的作用是固定大分子蛋白，使小分子物质易转移出去)
- 3、将转膜用的夹子、两块海绵垫、一支滴管、2 张滤纸、一张 PVDF 膜浸泡在转移缓冲液中，然后取出 SDS-PAGE 胶，将浓缩胶轻轻刮去，并在胶的一角做一缺角作为标记以区分上样顺序。将胶在转膜缓冲液中浸泡 5min 左右，以平衡离子强度。
- 4、夹子打开平放底部黑色电极(阴极)，放一张海绵垫片，用玻棒来回擀几遍以擀走里面的气泡。在海绵垫片上放置 1 张转移缓冲液浸泡过的滤纸，对齐，然后用一玻璃棒作滚筒以挤出所有气泡，必要时可滴加转膜液润湿。取出浸在转膜液中的凝胶平放在滤纸上，排除所有气泡。将 PVDF 膜置于聚丙烯酰胺凝胶上，玻棒来回擀几遍排除所有气泡，注意在膜的正面作上标记 (可以将膜的一角剪去或用签字笔在膜的边角上做记号)。在膜上盖一张转移缓冲液

浸泡过的滤纸，同样须确保不留气泡。最后盖上另一张海绵垫，盖上阳极板（白色），夹紧。保证对凝胶有一定压力。

5、将夹子放入转移槽中，要使夹的黑面对槽的黑面，夹的白面对槽的红面。转膜时将转移槽放入冰水中进行。转膜过程中电转液用磁力搅拌器搅拌。一般用恒压 110V 转移 60min。对于大分子量的蛋白（超过 120KD），时间约 80min。特别要注意加强降温措施。

（五）免疫学检测

1、取膜，将膜正面朝上在 1xPBST 溶液中摇动五分钟，洗一次，移至含有封闭液（含 10%脱脂奶粉的 瓶 PBST 缓冲液；脱脂奶粉 5g，PBST 100ml，溶解后 4°C 保存。使用时，恢复室温，用量以盖过膜面即可，一次性使用。）的平皿中，室温下脱色摇床上摇动封闭 1 小时。注：10%脱脂牛奶的作用：用大分子物质封闭非相关的蛋白结合位点，降低非特异性结合（抗体与膜），同时也使背景色不高。PBST：T 为吐温，减少非特异性吸附，不影响抗体抗原的结合。

2、取出膜在 1xPBST 溶液中洗 5 分钟，摇动，洗两次，放入 1xPBST 缓冲液中（内含 5%脱脂牛奶），同时加入一抗与二抗到缓冲液中，孵育 60min。

3、用 1xPBST 洗至少三次，5min/次

4、化学发光，显影。显影液与水 1:4，定影液与水 1:9，发光液

注：显影液（5X）：

自来水（加热至 50°C）375ml（以下药品加到温水中）

米吐尔 1.55g，亚硫酸钠（无水）22.5g，碳酸钠（无水）33.75g，溴化钾 20.95g，补水至 500ml

配制时，上述药品应逐一加入，待一种试剂溶解后，再加入后一种试剂。4°C 保存。使用时

用自来水稀释至 1 倍。

定影液：

自来水（50~60°C）700ml（以下药品按顺序加入前者溶解后再加后者）

硫代硫酸钠 240g，亚硫酸钠（无水） 15g，冰乙酸 12.6ml，硼酸 7.5g，钾明矾 15g（水温冷至 30°C以下时再加入）

加水定容至 1000ml，室温保存

发光液：鲁米诺试剂 2ml、过氧化氢 1.3ml

5、在暗室中，将 1×显影液（50ml）和定影液（50ml）分别到入塑料盒中；在红灯下取出 X - 光片，用切纸刀剪裁适当大小（比膜的长和宽均需大 1cm）；打开 X-光片夹，将膜放入 X-光片夹，并将发光液均匀涂抹在膜上，之后把 X - 光片放在膜上，一旦放上，便不能移动，关上 X-光片夹，开始计时；根据信号的强弱适当调整曝光时间，一般为 1min 或 5min，也可选择不同时间多次压片，以达最佳效果；曝光完成后，打开 X-光片夹，取出 X-光片，迅速浸入显影液中显影，待出现明显条带后，即刻终止显影。显影时间一般为 1~2min（20~25°C），温度过低时（低于 16°C）需适当延长显影时间；显影结束后，马上把 X-光片浸入定影液中，定影时间一般为 5~10min，以胶片透明为止；用自来水冲去残留的定影液后，室温下晾干。

（六）注意事项

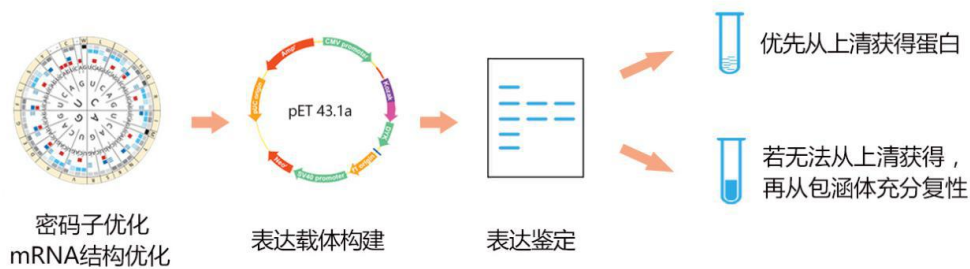
- 1.显影和定影需移动胶片时，尽量拿胶片一角，手指甲不要划伤胶片，否则会对结果产生影响。
- 2.一抗，二抗的孵育时间因抗体不同可做适当的调整。
- 3.转膜时滤纸与胶，胶与膜，膜与滤纸之间不能有气泡，必须用玻棒擀走。有气泡会影响转膜效果。
- 4.把 X - 光片放在膜上，一旦放上，便不能移动

南京德泰生物 -- 专注蛋白与抗体

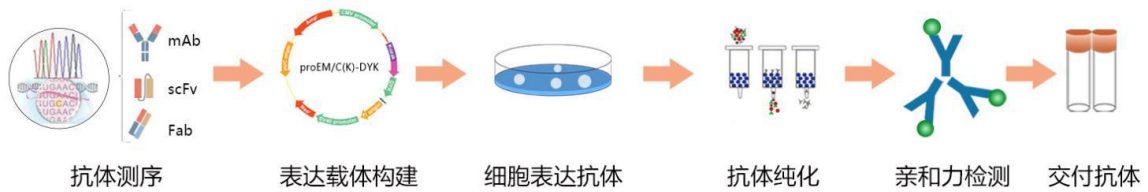
一、蛋白表达（哺乳动物细胞表达）蛋白被细胞充分修饰，活性有保障



二、蛋白表达（大肠杆菌表达）成功率>95%，不成功不收费，成功有保障



三、重组抗体表达 若想改造一个抗体，可以试试重组表达



四、稳定细胞系构建 研究级细胞系构建 & 高表达细胞株开发

