

Western Blotting 全攻略

蛋白免疫印迹 (Western blotting 或 Immunoblotting) 一般由凝胶电泳、样品的印迹和免疫学检测三个部分组成。第一步是做 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 使待测样品中的蛋白质按分子量大小在凝胶中分成带。第二步把凝胶中已分成条带的蛋白质转移到一种固相支持物上, 用得最多的材料是硝酸纤维素膜(NC 膜)和 PVDF 膜, 蛋白转移的方法多用电泳转移(转移电泳), 它又有半干法和湿法之分, 现在大多用湿法。第三步是用特异性的抗体检测出已经印迹在膜上的所要研究的相应抗原。免疫检测的方法可以是直接的和间接的。现在多用间接免疫酶标的方法, 在用特异性的第一抗体杂交结合后, 再用酶标的第二抗体(碱性磷酸酶(AP)或辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗第一抗体的抗体)杂交结合, 再加酶的底物显色或者通过膜上的颜色或 X 光底片上暴光的条带来显示抗原的存在。该技术被广泛应用于蛋白表达水平的检测中。

一、基本原理

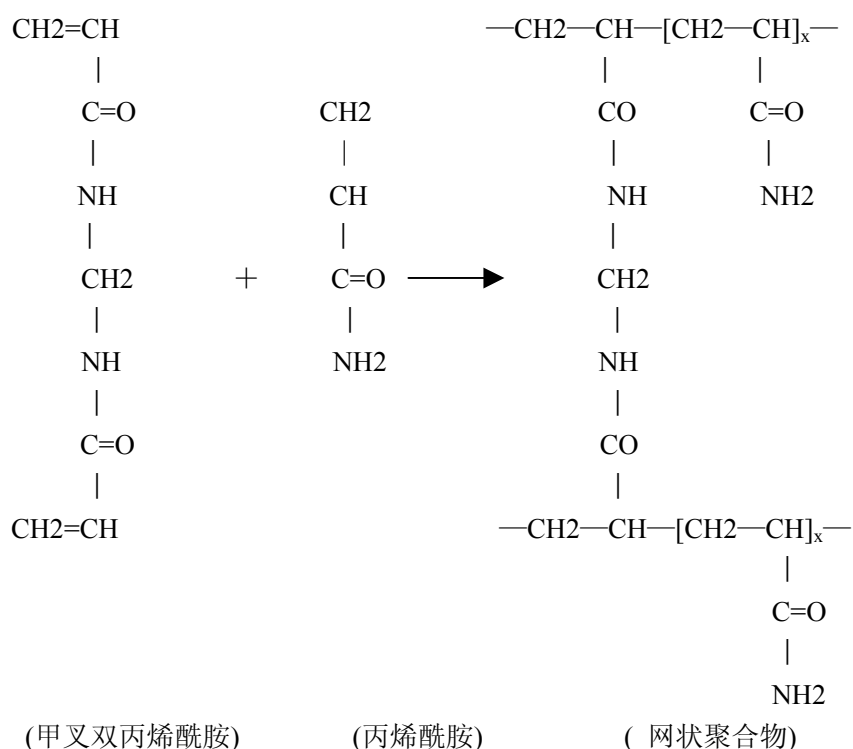
第一部分: SDS-PAGE 电泳

1、蛋白中含有很多的氨基(+)和羧基(-), 不同的蛋白在不同的PH值下表现出不同的电荷, 为了使蛋白在电泳中的迁移率只与分子量有关, 我们在上样前, 通常会进行一些处理(上样缓冲液)。即在样品中加入含有SDS 和 β -巯基乙醇的上缓冲液。SDS 即十二烷基磺酸钠 ($\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CH}_2\text{OSO}_3-\text{Na}^+$), 是一种阴离子表面活性剂, 它可以断开分子内和分子间的氢键, 破坏蛋白质分子的二级和三级结构; β -巯基乙醇是强还原剂, 它可以断开半胱氨酸残基之间的二硫键。电泳样品加入样品处理液后, 经过高温处理, 其目的是将SDS 与蛋白质充分结合, 以使蛋白质完全变性和解聚, 并形成棒状结构同时使整个蛋白带上负电荷; 另外样品处理液中通常还加入溴酚蓝染料, 用于监控整个电泳过程; 另外样品处理液中还加入适量的蔗糖或甘油以增大溶液密度, 使加样时样品溶液可以快速沉入样品凹槽底部。当样品上样并接通两极间电流后(电泳槽的上方为负极, 下方为正极), 在凝胶中形成移动界面并带动凝胶中所含SDS负电荷的多肽复合物向正极推进。样品首先通过高度多孔性的浓缩胶, 使样品中所含SDS 多肽复合物在分离胶表面聚集成一条很薄的区带(或称积层)。

2、电泳启动时, 蛋白样品处于PH6.8 的上层, PH8.8 的分离胶层在下层, 上槽为负极, 下槽为正极。出现了PH不连续和胶孔径大小不连续: 启动时 Cl^- 解离度大, Pro^- 解离度居中,

甘aaCOO⁻解离度小，迁移顺序为 (PH6.8) Cl⁻ > Pro⁻ > -COO⁻。在Cl⁻与Pro⁻之间和Pro⁻与-COO⁻之间都将出现低离子区，同时也出现高电势，高电势迫使Pro⁻向Cl⁻迁移，-COO⁻向Pro⁻迁移。如：一个Cl⁻领路，-COO⁻推动，蛋白在中间，这样就起到浓缩的作用了。在浓缩胶运动中，由于胶联度小，孔径大，Pro⁻受阻小，因此不同的蛋白质就浓缩到分离胶之上成层，起浓缩效应，使全部蛋白质处于同一起跑线上。当蛋白质进入分离胶时，此时Pro⁻，Cl⁻，甘aa离子在PH8.8的溶液中，Cl⁻完全电离而很快到达正极，甘aa电离度加大很快跃过蛋白质，而到达正极，只有蛋白质分子在分离胶中较为缓慢的移动。由于Pro⁻在电泳过程中，受到溶液离子的变化而PH值发生变化，但每一瞬间，其所带电荷数除以单位质量是不同的，所以带负电荷多者迁移快，反之则慢，这就现了电荷效应。由于胶孔径小，而且成为一个整体的筛状结构，它们对大分子阻力大，小分子阻力小，起着分子筛效应，也就是蛋白质在分离胶中，以分子筛效应和电荷效应而出现迁移率的差异，最终达到彼此分开。

3、PAGE 胶的聚合原理：甲叉双丙烯酰胺和丙烯酰胺在过硫酸胺的作用下聚合，形成胶，如下图：



催化剂：过硫酸铵 (AP) 在隔氧的状态下，最好现配现用，使用新鲜的。

加速催化剂：TEMED，四甲基乙二胺。催化剂的作用是使单体聚合成网状聚合物。

4、SDS聚丙烯酰胺凝胶的分离范围

丙烯酰胺浓度 (%)	线性分离范围 (KD)
15	10~ 43
12	12~ 60

10	20~ 80
7. 5	36~ 94
5. 0	57~212

第二部分：样品的印迹(转膜)

膜的选择：印迹中常用的固相材料有 PVDF、NC 膜、尼龙膜等。我们通常选用 PVDF（聚偏二氟乙烯），因为它具有更好的蛋白吸附、物理强度以及具有更好的化学兼容性。

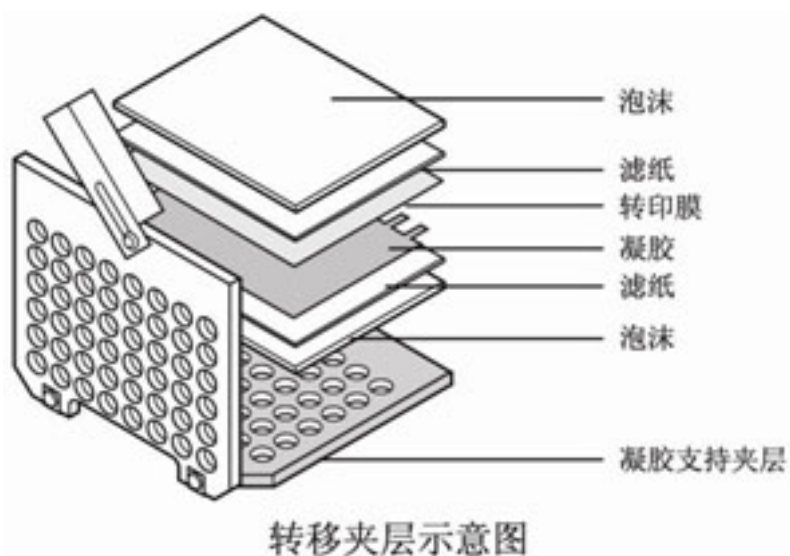
PVDF膜及滤纸的预处理：转移前，剪裁与胶大小一致的膜泡入甲醇中，约30秒；·小心将膜放入双蒸水水中浸泡2分钟。·小心将膜放入转移缓冲液中平衡至少5分钟。滤纸只要转移前用转移液浸湿即可。

NC膜及滤纸的预处理：

剪裁与胶大小一致的NC膜，将其浸入1×转移缓冲液平衡5 分钟以上。（注意：必须保证NC膜始终完全浸于转移缓冲液中），滤纸只要转移前用转移液浸湿即可。

注：膜的预处理是为了使膜上的部分基团充分活化，更有利蛋白吸附，是必不可少的步骤，几乎所有的商业膜都是要预处理的。

转移缓冲液是一种 Tris-甘氨酸缓冲液，常用于湿转系统。该缓冲液 pH 为 8.3，比大多数蛋白质的等电点（pI）高，蛋白质带净负电荷并向阳极迁移，所以在装转移夹层时，应该在黑色夹子一面（阴性电极）依次放上泡沫、滤纸、凝胶、转移膜、滤纸、泡沫。转移缓冲液最好是新鲜配制，或者只使用 1 – 2 次的，多次使用的缓冲液效果很差。转移缓冲液最好不含 SDS，SDS 会严重影响转印效果，会导致实验失败；如果蛋白分子量比较大，可适当加入一点，浓度在 0.01% 的范围内。电泳后的胶最好用清水冲洗一下，以去除电泳缓冲液中的 S D S 残留。夹层装置如下图：



电流 1mA-2mA/cm²，我们通常 200mA/膜，转移 2 个小时；或者 30mA 冰水浴中转移过夜；按照目的蛋白分子大小、胶浓度选择合适的转移时间，具体可以根据实际适当调整。不必过多地延长转移时间，这样不但对转移效果没有增加，反而会降低，因为根据文献报道，蛋白还是会有穿膜的现象发生。下表是转移时间：

目的蛋白分子大小(kDa)	胶浓度	转移时间(h)
80---140	8%	1.5-2.0
25---80	10%	1.5
15—40	12%	0.75
<20	15%	0.5

如果想看转移后的效果，可以用丽春红染液（配方在附录中）对膜（任何一种膜都适用）进行染色，具体的操作步骤如下：1、将膜置于反应盒中（印迹蛋白的一面朝上）2、加 0.5 ml 丽春红 S，在脱色摇床中染色 5 分钟，观察转印效果。3、去除染液（可重复使用），双蒸水洗膜两次，每次 5 分钟，这时如果膜上有转印的蛋白时，可以看见数条蛋白条带及泳道痕迹。丽春红 S 是一种水溶性可逆染料，带负电荷，可以与带正电荷的氨基酸残基结合，同时丽春红也可以与蛋白的非极性区相结合，从而形成红色，使其短时显现，但在随后的步骤中可被洗掉，不影响后面的免疫检测。丽春红染色必需在封闭前进行。

第三部分：免疫检测

抗原抗体反应的原理

抗原抗体反应 (antigen-antibody reaction) 是指抗原与相应抗体之间所发生的特异性结合反应。抗原与抗体能够特异性结合是基于两中分子间的结构互补性与亲和性, 这两种特性是由抗原与抗体分子的一级结构决定的。抗原抗体反应可分为两个阶段。第一为抗原与抗体发生特异性结合的阶段, 此阶段反应快, 仅需几秒至几分钟, 但不出现可见反应。第二为可见反应阶段, 抗原抗体复合物在环境因素 (如电解质、pH、温度、补体) 的影响下, 进一步交联和聚集, 表现为凝集、沉淀、溶解、补体结合介导的生物现象等肉眼可见的反应。此阶段反应慢, 往往需要数分钟至数小时。实际上这两个阶段以严格区分, 而且两阶段的反应所需时间亦受多种因素和反应条件的影响, 若反应开始时抗原抗体浓度较大且两者比较适合, 则很快能形成可见反应。

(一) 亲水胶体转化为疏水胶体

抗体是球蛋白, 大多数抗原亦为蛋白质, 它们溶解在水中皆为胶体溶液, 不会发生自然沉淀。这种亲水胶体的形成机制是因蛋白质含有大量的氨基和羧基残基, 这些残基在溶液中带有电荷, 由于静电作用, 在蛋白质分子周围出现了带相反电荷的电子云。如在 pH7.4 时, 某蛋白质带负电荷, 其周围出现极化的水分子和阳离子, 这样就形成了水化层, 再加上电荷的相斥, 就保证了蛋白质不会自行聚合而产生沉淀。

抗原抗体的结合使电荷减少或消失, 电子云也消失, 蛋白质由亲水胶体转化为疏水胶体。此时, 如再加入电解质, 如 NaCl, 则进一步使疏水胶体物相互靠拢, 形成可见的抗原抗体复合物。

(二) 抗原抗体结合力

有四种分子间引力参与并促进抗原抗体间的特异性结合。

1. 电荷引力 (库伦引力或静电引力) 这是抗原抗体分子带有相反电荷的氨基和羧基基团之间相互吸引的力。例如, 一方在赖氨酸离解层带阳离子化的氨基残基 ($-\text{NH}_3^+$), 另一方在天门冬氨酸电离后带有阴离子化的羧基 ($-\text{COO}^-$) 时, 即可产生静电引力, 两者相互吸引, 可促进结合。这种引力和两电荷间的距离的平方成反比。两个电荷越接近, 静电引力越强。反之, 这种引力便很微弱。

2. 范登华引力这是原子与原子、分子与分子互相接近时发生的一种吸引力，实际上也是电荷引起的引力。由于抗原与抗体两个不同大分子外层轨道上电子之间相互作用，使得两者电子云中的偶极摆而产生吸引力，促使抗原抗体相互结合。这种引力的能量小于静电引力。

3. 氢键结合力氢键是由分子中的氢原子和电负性大的原子如氮、氧等相互吸引而形成的。当具有亲水基团（例如—OH，—NH₂及—COOH）的抗体与相对应的抗原彼此接近时，可形成氢键桥梁，使抗原与抗体相互结合。氢键结合力较范登华引力强，并更具有特异性，因为它需要有供氢体和受氢体才能实现氢键结合。

4. 疏水作用抗原抗体分子侧链上的非极性氨基酸（如亮氨酸、缬氨酸和苯丙氨酸）在水溶液中与水分子间不形成氢键。当抗原表位与抗体结合点靠近时，相互间正、负极性消失，由于静电引力形成的亲水层也立即失去，排斥了两者之间的水分子，从而促进抗原与抗体间的相互吸引而结合。这种疏水结合对于抗原抗体的结合是很重要的，提供的作用力最大。

抗原抗体反应的特点

（一）特异性

抗原抗体的结合实质上是抗原表位与抗体超变区中抗原结合点之间的结合。由于两者在化学结构和空间构型上呈互补关系，所以抗原与抗体的结合具有高度的特异性。这种特异性如同钥匙和锁的关系。例如白喉抗毒素只能与相应的外毒素结合，而不能与破伤风外毒素结合。但较大分子的蛋白质常含有多种抗原表位。如果两种不同的抗原分子上有相同的抗原表位，或抗原、抗体间构型部分相同，皆可出现交叉反应。

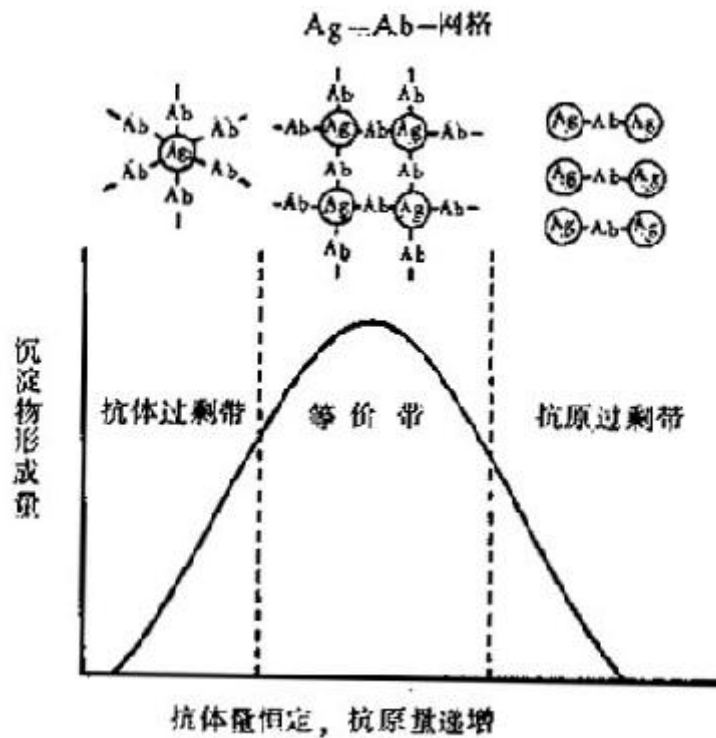


图 9-1 沉淀反应中沉淀量与抗原抗体的比例关系

Ag: 抗原; Ab: 抗体

(二) 按比例

在抗原抗体特异性反应时，生成结合物的量与反应物的浓度有关。无论在一定量的抗体中加入不同量的抗原或在一定量的抗原中加入不同量的抗体，均可发现只有在两者分子比例合适时才出生现最强的反应。以沉淀反应为例，若向一排试管中中入一定量的抗体，然后依次向各管中加入递增量的相应可溶性抗原，根据所形成的沉淀物及抗原抗体的比例关系可绘制出反应曲线（图 9-1）。从图中可见，曲线的高峰部分是抗原抗体分子比例合适的范围，称为抗原抗体反应的等价带（zone of equivalence）。在此范围内，抗原抗体充分结合，沉淀物形成快而多。其中有一管反应最快，沉淀物形成最多，上清液中几乎无游离抗原或抗体存在，表明抗原与抗体浓度的比例最为合适，称为最适比（optimal ratio）。在等价带前后分别为抗体过剩则无沉淀物形成，这种现象称为带现象（zone phenomenon）。出现在抗体过量时，称为前带（prezone），出现在抗原过剩时，称为后带（postzone）。

关于抗原抗体结合后如何形成聚合物，曾经有过不少解释。结合现代免疫学的成就呼电镜观察所见，仍可用 Marrack (1934) 提出的网格学说 (lattice theory) 加以说明。因为大多数抗体的巨大网格状聚集体，形成肉眼可见的沉淀物。但当抗原或抗体过量时，由于其结合价不能相互饱和，就只能形成较小的沉淀物或可溶性抗原抗体复合物。

在用沉淀反应对不同来源的抗血清进行比较后，发现抗体可按等价带范围大小分为两种类型，即 R 型抗体和 H 型抗体。R 型抗体以家兔免疫血清为代表，具有较宽的抗原抗体合适比例范围，只在抗原过量时，才易出现溶性免疫复合物，大多数动物的免疫血清均属此型。H 型抗体以马免疫血清为代表，其抗原与抗体的合适比例范围较窄，抗原或抗体过量，均可形成可溶性免疫复合物。人和许多大动物的抗血清皆属 H 型。

(三) 可逆性

抗原抗体反应遵循生物大分子热动力学反应原则，其反应式为：

$$[Ab-Ag] / [Ab] \cdot [Ag] = k_1 / k_2 = K$$

公式中各反应项的单位以 mol 表示， k_1 表示反应速度常数， k_2 为逆反应速度常数， K 是反应平衡时的速度常数。由上式可知， K 值是反映抗原抗体间结合能力的指示，所以抗体亲和力通常以 K 值表示。

抗原抗体复合物解离取决于两方面的因素，一是抗体对相应抗原的亲合力；二是环境因素对复合物的影响。高亲和性抗体的抗原结合点与抗原表位的空间构型上非常适合，两者结合牢固，不容易解离。反之，低亲和性抗体与抗原形成的复合物较易解离。解离后的抗原结合牢固，不容易解离。反之，低亲和性抗体与抗原形成的复合物较易解离。解离后的抗原或抗体均能保持未结合前的结构、活性及特异性。在环境因素中，凡是减弱或消除抗原抗体亲和力的因素都会使逆向反应加快，复合物解离增加。如 pH 改变，过高或过低的 pH 值均可破坏离子间电引力消失。对亲合力本身较弱的反应体系而言，仅增加离子强度即可解离抗原抗体复合物的目的；增加温度可增加分子间的热动能，加速已结合的复合物的解离，但由于温度变化易致蛋白变性，所以实际工作中极少应用。改变 pH 和离子强度是最常用的促解离方法，免疫技术中的亲和层析就是以此为根据纯化抗原或抗体。

影响抗原抗体反应的因素

（一）电解质

抗原与抗体发生特异性结合后，虽由亲水胶体变为疏水胶体，若溶液中无电解质参加，仍不出现可见反应。为了促使沉淀物或凝集物的形成，常用 0.85% 氯化钠或各种缓冲液作为抗原及抗体的稀释液。由于氯化钠在水溶液中解离成 Na^+ 和 Cl^- ，可分别中和胶体粒子上的电荷，使胶体粒子的电势下降。当电势降至临界电势（12~15mV）以下时，则能促使抗原抗体复合物从溶液中析出，形成可见的沉淀物或凝集物。

（二）酸碱度

抗原抗体反应必须在合适的 pH 环境中进行。蛋白质具有两性电离性质，因此每种蛋白质都有固定的等电点。抗原抗体反应一般在 pH 为 6~8 进行。PH 过高或过低都将影响抗原与抗体的理化性质，例如 pH 达到或接近抗原的等电点时，即使无相应抗体存在，也会引起颗粒性抗原非特异性的凝集，造成假阳性反应。

（三）温度

在一定范围内，温度升高可加速分子运动，抗原与抗体碰撞机会增多，使反应加速。但若温度高于 56℃ 时，可导致已结合的抗原抗体再解离，甚至变性或破坏；在 40℃ 时，结合速度慢，但结合牢固，更易于观察。常用的抗原抗体反应温度为 37℃。每种试验都有其独特的最适反应温度，例如冷凝集素在 4 左右与红细胞结合最好，20℃ 以上反而解离。此外，适当振荡也可促进抗原抗体分子的接触，加速反应。

闪晶生物将目前临床检验中最灵敏的 ELISA（如乙肝两对半的检测）检测技术移植到 Western Blot 检测中，在抗体稀释液中加入 HRP 酶保护剂、防腐剂 Proclin300、抗生素（庆大）、脱脂奶粉以及免疫助沉剂组成高效的抗体稀释液，从不同的角度最大限度地增强 Western Blot 检测的灵敏度。

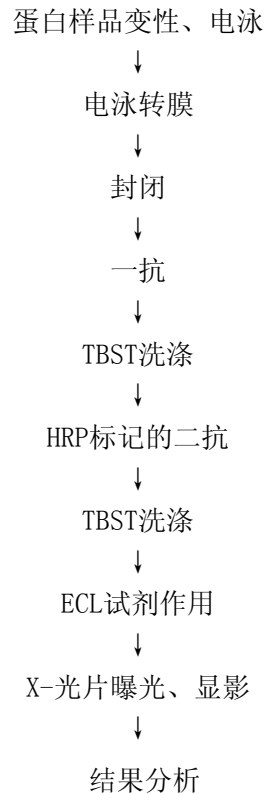
二、基本操作流程：

提取细胞或组织蛋白、测定大致含量



制备 SDS-PAGE 胶





三、详细操作流程

(一) 蛋白样品制备

(1) 单层贴壁细胞总蛋白的提取（培养细胞经过简单计数后，大概数量在 10^6 左右即可）：

- 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、 每瓶细胞加3ml 4℃预冷的 PBS（0.01M pH7.2~7.3）。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（100mM），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 100—400 μ l含PMSF的裂解液，于冰上裂解30min，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），然后用枪将细胞碎片和裂解液移至1.5ml离心管中。（整个操作尽量在冰上进行。）

6、于 4℃下12000rpm离心5min。（提前开离心机预冷）

7、将离心后的上清分装转移倒0.5ml的离心管中放于-20℃或者-70℃保存备用。

注：有些贴壁细胞由于受药物的影响，会有部分细胞脱落下来，如果遇到这种情况，最好将培养液中游离的细胞也离心收集一下。

（2）培养的悬浮动物细胞的总蛋白质抽提步骤（培养细胞经过简单数数后，大概数量在 10^6 左右即可）：

1、2,500 xg离心10分钟沉淀悬浮的细胞，弃去上清液

2、预冷的PBS悬浮沉淀细胞，2,500 xg离心10分钟沉淀细胞，去上清。

3、配置含抑制剂的蛋白质抽提试剂（1 ml抽提试剂中加入10 μl蛋白酶抑制剂混合液，10 μl PMSF）。

4、加入含抑制剂的预冷蛋白质抽提试剂（ 10^7 个细胞中加入0.5-1 ml抽提试剂； 10^6 个细胞中加入0.1-0.4 ml抽提试剂）

5、4℃中轻轻摇动混和20分钟进行裂解。

6、裂解液于预冷的离心机中14,000 xg离心15分钟。弃去沉淀，上清液立刻转移入新的离心管中-20℃或者-70℃保存备用。

（3）组织中总蛋白的提取：

1、将少量组织块置于 1~2ml 匀浆器中球状部位，用干净的剪刀将组织块尽量剪碎。

2、加 0.5-1ml 单去污剂裂解液裂（含 PMSF）于匀浆器中，进行匀浆。然后置于冰上。

3、几分钟后再碾一会儿再置于冰上，要重复碾几次使组织尽量碾碎。

4、裂解 30 min 后，即可用移液器将裂解液移至 1.5ml 离心管中，然后在4℃下12000rpm离心 5min，取上清分装于 0.5ml 离心管中并置于-20℃或者-70℃保存。

（二）蛋白样品的初步定量

蛋白质定量的方法比较多，目前用得比较多的是 BCA 法，其基本原理为要分析的蛋白在碱性溶液里与 Cu^{2+} 反应产生 Cu^+ ，后者与 BCA 形成螯合物，形成紫色化合物，吸收峰在 562nm 波长。此化合物与蛋白浓度的线性关系极强，反应后形成的化合物非常稳定。通过标准曲线可以确定对应样品的蛋白浓度，具体的操作步骤可以参考试剂盒说明书。Western Blot 的对蛋白浓度的检测要求通常 $>1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ，大部分培养的细胞或者组织都是可以满足的，但因为测定的是总蛋白浓度，而我们检测的是特异性蛋白的量，总蛋白再高，如果特异蛋白不表达，也是白搭，所以这步基本上没有什么意义，可以不做，而且在后面的检测中，都平行做内参

的检测，所以这步的意义更是不大，可以不做。

(三) SDS-PAGE电泳

(1) 清洗玻璃板：一只手扣紧玻璃板，另一只手蘸点洗衣粉轻轻擦洗。两面都擦洗过后用自来水冲，再用蒸馏水冲洗干净后立在筐里晾干。

(2) 灌胶与上样

1、玻璃板对齐后放入夹中卡紧。然后垂直卡在架子上准备灌胶。(操作时要使两玻璃对齐，以免漏胶。)

2、制备分离胶 (pH 8.8)

凝胶浓度	8%	10%	12.5%
40% w/v 丙烯酰胺:双丙烯酰胺	1.5ml	1.87 ml	2.34 ml
1.0M Tris-Cl pH 8.8	3 ml	3 ml	3 ml
10% SDS	75 μ l	75 μ l	75 μ l
dH ₂ O	2.88 ml	2.51 ml	2.04 ml
混合，灌胶前加入 APS 和 TEMED			
10% APS(过硫酸胺)	37 μ l	37 μ l	37 μ l
TEMED	5 μ l	5 μ l	5 μ l
总体积	7.5 ml	7.5 ml	7.5 ml

灌胶时，可用1ml 枪吸取1ml胶沿玻璃放出，溶液缓慢加入到装配好的板中至凝胶高度为6 cm左右，预留1.5 cm高度配制浓缩胶。然后胶上加一层水，液封后的胶凝得更快。(灌胶时开始可快一些，胶面快到所需高度时要放慢速度。操作时胶一定要沿玻璃板流下，这样胶中才不会有气泡。加水液封时要很慢，否则胶会被冲变形。)室温放置0.5—1小时左右至聚合完全。

3、当水和胶之间有一条折射线时，说明胶已凝了。再等3min使胶充分凝固就可倒去胶上层水并用吸水纸将水吸干。

4、制备浓缩胶 (PH6.8)：4%浓缩胶配合<10%的分离胶使用，6%浓缩胶配合>10%的分离胶使用。

浓缩胶浓度	4%	6%
40% w/v 丙烯酰胺:双丙烯酰胺	550 μ l	750ul
1M Tris-Cl pH6.8	630 μ l	630 μ l
10% SDS	50 μ l	50 μ l
dH ₂ O	3.74 ml	3.54 ml
混合，灌胶前加入 APS 和 TEMED		
10% APS	25 μ l	25 μ l

TEMED	5 μ l	5 μ l
总体积	5 ml	5 ml

将剩余空间灌满浓缩胶然后将梳子插入浓缩胶中。灌胶时也要使胶沿玻璃板流下以免胶中有气泡产生。插梳子时要使梳子保持水平。由于胶凝固时体积会收缩减小，从而使加样孔的上样体积减小，所以在浓缩胶凝固的过程中要经常在两边补胶。待到浓缩胶凝固后，两手分别捏住梳子的两边竖直向上轻轻将其拔出。凝胶聚合约0.5—1小时左右。

5、用水冲洗一下浓缩胶，将其放入电泳槽中。（小玻璃板面向内，大玻璃板面向外。若只跑一块胶，槽另一边要垫一块塑料板且有字的一面向外。）

6、取提取好的蛋白，约10—15 μ l与5 \times SDS上样缓冲液按5: 1的比例混合，加到1.5ml 离心管中，然后沸水中煮3—5min使蛋白完全变性。

7、电泳：电泳时间一般 2-3 h，电压为 100V 较好，也可用 120—150V。电泳至溴酚蓝刚跑出即可终止电泳，然后进行转膜。

（四）转膜

实验前的准备工作

- 1、制备足够转移缓冲液以充满转移槽，另外准备 200 ml 用于平衡凝胶和膜以及润湿滤纸。
- 2、从玻璃板上取下凝胶，去除所有浓缩胶。
- 3、将凝胶浸入转移缓冲液中 15 - 30 分钟。
- 4、滤纸在转移缓冲液中至少浸泡 30 秒。
- 5、准备膜：
 - a、硝酸纤维素膜：将膜进入转移缓冲液中 15 - 30 分钟
 - b、PVDF 膜

在甲醇中润湿膜 15 秒，保证膜由不透明变成半透明。

小心将膜放入双蒸水水中浸泡 2 分钟。

小心将膜放入转移缓冲液中平衡至少 5 分钟。

（1）将夹子打开使黑的一面保持水平。在上面垫一张海绵垫，用玻棒来回擀几遍以擀走里面的气泡。（一手擀另一手要压住垫子使其不能随便移动。）在垫子上垫三层滤纸（可三张纸先叠在一起在垫于垫子上），一手固定滤纸一手用玻棒擀去其中的气泡

（2）要先将玻璃板撬掉才可剥胶，撬的时候动作要轻，要在两个边上轻轻的反复撬。撬一会儿玻璃板便开始松动，直到撬去玻板。（撬时一定要小心，玻板很易裂。）除去小玻璃板

后, 将浓缩胶轻轻刮去(浓缩胶影响操作), 要避免把分离胶刮破, 同时在胶的右上角做个记号。小心剥下分离胶盖于滤纸上, 用手调整使其与滤纸对齐, 轻轻用玻棒擀去气泡。将膜盖于胶上, 要盖满整个胶(膜盖下后不可再移动)并除气泡。在膜上盖3张滤纸并除去气泡。最后盖上另一个海绵垫, 擀几下就可合起夹子。整个操作在转移液中进行, 要不断的擀去气泡。膜两边的滤纸不能相互接触, 接触后会发生短路。(转移液含甲醇, 操作时要戴手套, 实验室要开门以使空气流通。)

(3) 将夹子放入转移槽槽中, 要使夹的黑面对槽的黑面, 夹的红面对槽的红面。电转移时会产热, 在槽的一边放一块冰来降温。转膜装置置于冰水中, 打开电源30 mA过夜或200 mA 2小时。

(6) 转完后在膜上做个记号, 以判断膜的正反面, 如果需要看转移是否成功, 可以将膜用1×春红染液染5min(于脱色摇床上摇), 然后用水冲洗掉没染上的染液就可看到膜上的蛋白。将膜晾干备用。

(五)、免疫反应

(1) 将膜用TBS从下向上浸湿后, 移至含有封闭液的平皿中, 室温下, 用封闭液在脱色摇床上摇动封闭2h或者4度过夜, 如果预实验做完后, 发现背景比较高, 可以适当延长封闭时间。如果以后需要做膜再生实验的, 最好用脱脂奶粉做封闭剂。

(2) 将一抗用封闭液稀释或者闪晶生物提供的高效抗体稀释液稀释至适当浓度; 通常用自封袋装溶液, 溶液体积大概2-5ml, 从封闭液中取出膜, 用滤纸吸去残留液后(不必洗涤), 将膜蛋白面朝上放于抗体液面上, 脱色摇床上37℃孵育2h后, 用TBST在室温下脱色摇床上洗3次, 每次5min, 如果预实验发现背景比较高, 可适当增加洗涤和洗涤时间; 如果预实验发现条带较淡, 可以一抗4℃过夜孵育。

(3) 同上方法准备二抗稀释液(可用闪晶生物提供的高效抗体稀释液)并与膜接触, 37℃孵育2h后, 用TBST在室温下脱色摇床上洗3次, 每次5min; 如果预实验发现背景比较高, 可适当增加洗涤和洗涤时间; 如果预实验发现条带较淡, 可以二抗4℃过夜孵育。

(六)、ECL化学发光, 显影, 定影

(1) 将A和B两种试剂在离心管中等体积混合; 1min后, 将溶液平铺在膜蛋白面, 暗室反应2min后去尽残液, 包好, 放入X-光片夹中。

(2) 在暗室中, 将影液和定影液分别到入塑料盘中; 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, 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℃), 温度过低时 (低于 16℃) 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。

(七)、凝胶图象分析

将胶片进行扫描或拍照, 用凝胶图象处理系统分析目标条带和内参条带的净光密度值以及它们的比值。

附录:

Buffers for Western blot

RIPA (蛋白提取液)

Tris.HCl, 50 mmol/L, pH 7.5;

NaCl, 150 mmol/L;

NP-40, 1%;

脱氧胆酸钠, 5%;

SDS, 0.1%;

EDTA, 1 mmol/L;

PMSF, 1 mmol/L;

Leupeptin, 2 µg/ml

1xSample buffer (上样缓冲液):

50mM Tris-Cl pH 6.8

2% SDS

10% glycerol

0.02% Bromophenol blue

0.7% 2-mercaptoethanol

Running buffer (电泳缓冲液):

Tris-base 3.g

glycine 14.4g

10%SDS 10ml

add ddH₂O to 1000ml, Do not adjust the pH!!

Transfer buffer (转移缓冲液):

Tris-base 3.g

Glycine 14.4g

methanol 200ml

add ddH₂O to 1000ml, Do not adjust the pH!!

Blocking Solution (封闭液)

For 2 blots, prepare 100 ml:

Weigh 5 g skim milk powder into a beaker.

Add 100 ml TBS-T and stir to suspend completely.

TBST buffer (洗涤液) :

20mM	Tris-Cl	pH 7.4
0.15M	NaCl	
0.5%Tween-20	1~5ml	

add ddH₂O to 1000ml, Do not adjust the pH!!

Ponceau Stain (丽春红染液)

Dissolve 0.5 g Ponceau S in 1.0 ml glacial acetic acid. Bring volume to 100 ml with MQ water. Final solution is 0.5% Ponceau/1% acetic acid. Wrap bottle in foil to protect from light. Reuse the solution until staining is no longer as good.

Stripping buffer (膜再生液)

- 1) In graduated cylinder, add 50ml of 10x Tris Buffer, pH 6.8 (500mM), to 300ml ddH₂O.
- 2) Add 100ml 10% SDS
- 3) Add 3.5ml BME
- 4) Bring up to 500ml with ddH₂O.

STRIP DEVELOPED BLOTS:

- 1) Place blot in a 50ml conical tube filled with strip buffer.
- 2) Seal with parafilm and put in water bath set at 50°C for 30 minutes. Shake gently every 10 min.
- 3) Decant Strip Buffer. Rinse with TBST approximately 5 minutes.
- 4) Repeat 3 times (4 rinses total).
- 5) Store in TBS at 4°C or proceed to standard immunoblotting protocol.

参考文献:

- 1、陈丽蓉; PVDF膜在电印迹法中的应用, 生物技术, 8(3), 45-46, 1998
- 2、董燕等, 电转移中蛋白质的透膜现象, 生物化学与生物物理进展, 29(3), 2002
- 3、李闻捷等, 增强疏水膜半干式蛋白电泳印迹作用的实验, 第二军医大学学报, 22(12), 2001
- 4、周健等, 转移缓冲液对蛋白质印迹的影响, 生物化学与生物物理进展, 27(3), 2000

相关产品

蛋白提取试剂

BCA 蛋白定量试剂

预染蛋白 marker

高效抗体稀释液

LumiPico® ECL 化学发光试剂



上海闪晶分子生物科技有限公司

地址：上海市吴河路328号A座2楼

邮编：201109

联系：市场部

电话：021-54460832 800-988-1995

E-mail:master@shinegene.org.cn

网址：<http://www.shinegene.org.cn>