
蛋白免疫印迹杂交（Western Blot）技术手册

蛋白免疫印迹杂交（Western Blot WB）是将蛋白样本通过聚丙烯酰胺电泳按分子量大小分离，再转移到杂交膜（blot）上，然后通过一抗/二抗复合物对靶蛋白进行特异性检测的方法。WB 是进行蛋白质分析最流行和成熟的技术之一。本指南讨论 Western Blot 操作方法及常见问题分析，有助于成功完成 WB。

A 蛋白样本提取制备

- 1 细胞或组织裂解
- 2 蛋白酶和磷酸酶抑制剂
- 3 蛋白定量
- 4 电泳上样样品的准备

B 电泳

- 1 PAGE 胶的制备
- 2 蛋白分子量 Marker
- 3 阳性对照
- 4 内参对照
- 5 上样与电泳

C 转膜与显色（Western Blot）

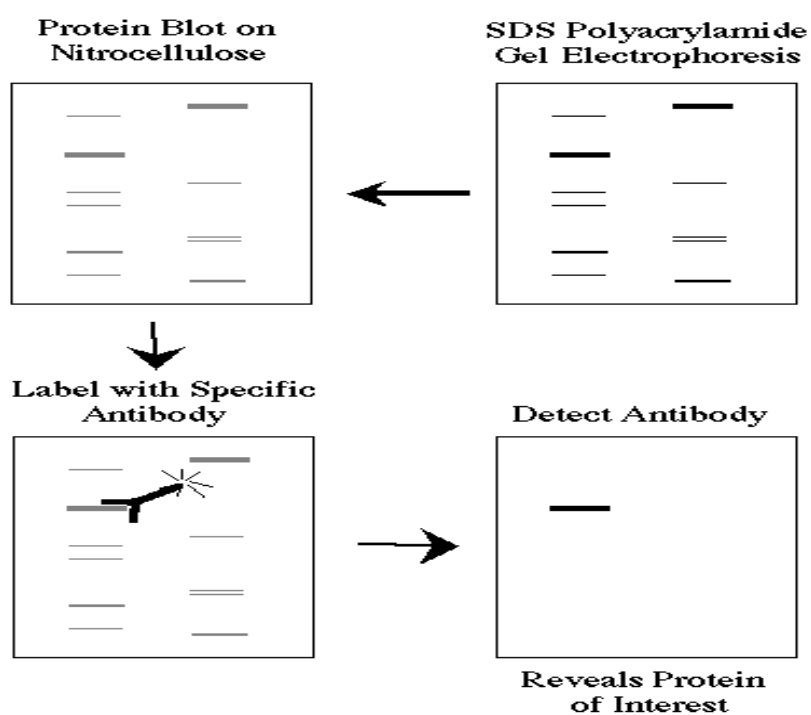
- 1 胶中蛋白的检测
- 2 蛋白转膜
- 3 膜上蛋白的检测：丽春红
- 4 膜的封闭
- 5 一抗的孵育
- 6 二抗的孵育
- 7 显色

D 常见问题分析与解决方案

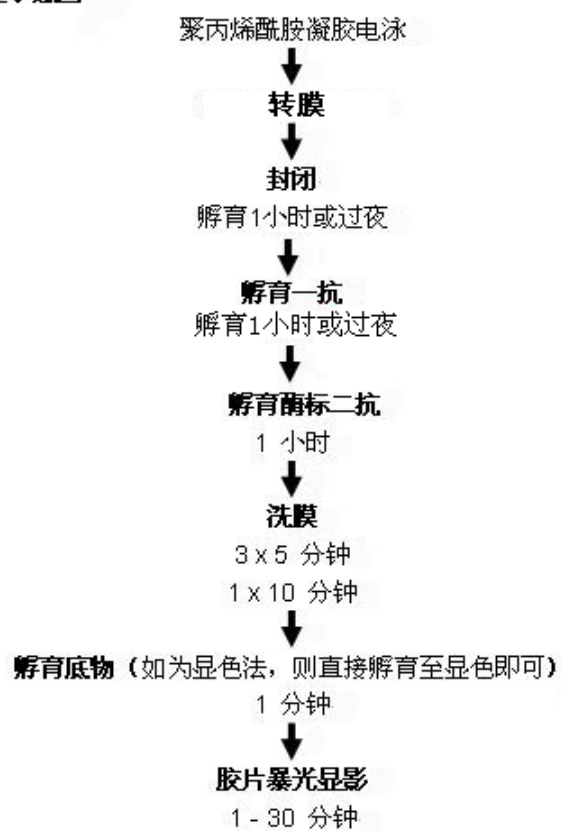
附录 1 WB 实验试剂配制方法

附录 2 SDS-PAGE 胶的配制

WB 概述: 检测原理:



Western Blot 过程示意图



A 蛋白样本提取制备

蛋白样品制备是 Western Blotting 的第一步，更是决定 WB 成败的关键步骤，

总体原则和注意事项：

- 1: 尽可能提取完全或降低样本复杂度只集中于提取目的蛋白
(通过采用不同提取方法或选择不同的试剂盒产品)
- 2: 保持蛋白的处于溶解状态 (通过裂解液的 PH 盐浓度 表面活性剂、还原剂等选择)
- 3: 提取过程防止蛋白降解、聚集、沉淀、修饰等，(低温操作，加入合适的蛋白酶和磷酸酶抑制剂)
- 4: 尽量去除核酸，多糖，脂类等干扰分子 (通过加入核酸酶或采取不同提取策略)
- 5: 样品分装，长期于-80℃中保存，避免反复冻融。

A-1 细胞或组织裂解

A-1-1 细胞裂解

裂解液 Lysis buffer 或商品化蛋白抽提试剂盒的选择*

目的蛋白分布定位	推荐裂解液 Lysis buffer	推荐试剂盒
全细胞	NP-40 or RIPA (附录 1)	全蛋白抽提试剂盒
细胞质 (可溶蛋白)	Tris-HCl (附录 1)	胞浆蛋白和核蛋白抽提试剂盒 线粒体蛋白提取试剂盒
细胞质 (细胞骨架等不溶蛋白)	Tris-Triton (附录 1)	蛋白分级抽提试剂盒
细胞质 (磷酸化蛋白)		磷酸化蛋白抽提试剂盒
细胞膜	NP-40 or RIPA (附录 1)	膜蛋白抽提试剂盒 蛋白分级抽提试剂盒
细胞核	RIPA (附录 1)	核蛋白抽提试剂盒
线粒体	RIPA (附录 1)	线粒体蛋白抽提试剂盒 亚细胞定位蛋白抽提试剂盒

细胞裂解操作方法：

- 1 培养的细胞经预冷的 PBS 漂洗 2 次，裂解液中加入蛋白酶和磷酸酶抑制剂 (种类与量见本节 2)
- 2 吸净 PBS，加入预冷的裂解液，((1 ml per 10^7 cells/100mm dish/150cm² flask; 0.5ml per 5×10^6 cells/60mm dish/75cm² flask)。
- 3 用细胞刮子刮取贴壁细胞，将细胞及裂解液温和地转移至预冷的微量离心管中，
- 4 4℃ 摇动 30 min
- 5 4℃ 离心 12,000 rpm, 20 min (根据细胞种类不同调整离心力)
- 6 轻轻吸取上清，转移至新预冷的微量离心管中置于冰上，即为蛋白样本，弃沉淀。

A-1-2 组织裂解

- 1 用灭菌的预冷的工具分离目的组织，尽量置于冰上以防蛋白酶水解，
- 2 将组织块放在圆底的微量离心管或 Eppendorf 管中，加入液氮冻结组织于冰上均质研磨，长期可保存于-80℃，
- 3 每约 5 mg 加入约 300 μ l 预冷的裂解液 lysis buffer，冰浴匀浆后置于 4℃ 摇动 2 小时，裂解液体积与组织样本量有适当比例，(最终的蛋白浓度至少达到 0.1 mg/ml，理想的蛋白浓度应为 1-5 mg/ml)。
- 4 4℃ 离心 12,000 rpm, 20 min，轻轻吸取上清，转移至新预冷的微量离心管中置于冰上，即为蛋白样本，弃沉淀，

A-2 蛋白酶和磷酸酶抑制剂

推荐购商品化蛋白酶和磷酸酶抑制剂复合试剂盒或 COOKTAIL，或按下表配制：

Inhibitor	Protease/phosphatase Inhibited	Final concentration in lysis buffer	Stock (store at -20°C)
Aprotinin	Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin	2 µg/ml	Dilute in water, 10 mg/ml. Do not re-use thawed aliquots
Leupeptin	Lysosomal	5-10 µg/ml	Dilute in water. Do not re-use once defrosted.
Pepstatin A	Aspartic proteases	1 µg/ml	Dilute in methanol, 1 mM.
PMSF	Serine, Cysteine proteases	1 mM	Dilute in ethanol. You can re-use the same aliquot.
EDTA	Metalloproteases that require Mg ⁺⁺ and Mn ⁺⁺	5 mM	Dilute in dH ₂ O, 0.5M. Adjust pH to 8.0.
EGTA	Metalloproteases that require Ca ⁺⁺	1 mM	Dilute in dH ₂ O, 0.5M. Adjust pH to 8.0.
Na Fluoride	Serine/Threonine phosphatases	5-10 mM	Dilute in water. Do not re-use once defrosted.
Na Orthovanadate	Tyrosine phosphatases	1 mM	Dilute in water. Do not re-use once defrosted.

备注：其中Sodium orthovanadate 配制活化方法如下：

所有步骤均需在通风橱中进行：

1. 用双蒸水配制100 mM 正矾酸钠溶液.
2. 用盐酸HCl 调至pH 9.0
3. 煮沸至溶液无色,尽量减少水分挥发.
4. 冷却至室温
5. 再调pH 至 9.0
6. 再煮沸至无色
7. 重复上述过程,直至溶液煮沸冷却后达pH 9.0
8. 用水定容至原体积
9. 分装保存于- 20°C. 溶液变黄则弃之不用.

A-3 蛋白定量

Bradford 法 Lowry 法或BCA 法（均有商品化试剂盒可选择，操作简单、需分光光度计或酶标仪），小牛血清白蛋白 (BSA) 作为标准曲线。如果裂解液中有NP40或其它表面活性剂，则推荐使用BCA 法。三种方法或产品比较列表如下：

方法	原理	灵敏性	干扰因素	应用
Lowry 法 Folin - 酚试剂法	蛋白质在碱性溶液中肽键与 Cu ²⁺ 螯合，形成蛋白质-铜复合物，还原酚磷钼酸产生蓝色化合物，蓝色深浅与蛋白质浓度呈线性关系	较高约 5 µg/ml 对可达 1-1500 µg/ml	适用于脂类含量较高的样品测定，也能耐受相当浓度的去垢剂如 SDS。 受硫酸铵; Tris 缓冲液; 甘氨酸; 各种硫醇干扰	耗费时间长 40 ~ 60 分钟; 操作要严格计时; 颜色深浅随不同蛋白质变化; 标准曲线不是严格的直线形式，且专一性差

Bradford 法	考马斯亮蓝 G-250 与蛋白质结合呈蓝色，在波长 595nm 吸收峰，在一定的范围内与蛋白质的含量呈线性关系	高约 1~5 $\mu\text{g/ml}$ ， 微孔法测定范围为 1~25 $\mu\text{g/ml}$ 试管法测定范围为 100~1500 $\mu\text{g/ml}$	易受强碱性缓冲液，TritonX-100, SDS 等去污剂的影响	快速 5~15 分钟，颜色稳定；深浅随不同蛋白质变化；标准曲线有轻微的非线性
BCA 法	BCA 法基于双缩脲原理，碱性条件下蛋白质将 Cu^{2+} 还原成 Cu^{+} ，BCA（Bicinchoninic 酸）螯合 Cu^{+} 作为显色剂，产生兰紫色并在 562 nm 有吸收峰， Cu^{+} 与蛋白呈剂量相关性，	很高 0.5~20 $\mu\text{g/ml}$ 试管法可测范围 20~2,000 $\mu\text{g/ml}$ 微孔法为 0.5~10 $\mu\text{g/ml}$	不易受一般浓度去污剂的干扰 可受螯合剂；略高浓度的还原剂的影响	较快 40 分钟内，较好的方法；抗干扰能力强

BCA测定方法如下:

A. 酶标板操作

1. 标准曲线的绘制：取一块酶标板，按照下表加入试剂

孔号	0	1	2	3	4	5	6	7
蛋白标准溶液 (μL)	0	1	2	4	8	12	16	20
去离子水 (μL)	20	19	18	16	12	8	4	0
对应蛋白含量 (μg)	0	0.5	1.0	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0

2. 根据样品数量，按 50 体积 BCA 试剂 A 加 1 体积 BCA 试剂 B (50:1) 配制适量 BCA 工作液，充分混匀；
3. 各孔加入 200 μL BCA 工作液；
4. 把酶标板放在振荡器上振荡 30sec，37°C 放置 30 分钟，然后在 562nm 下比色测定。以蛋白含量 (μg) 为横坐标，吸光值为纵坐标，绘出标准曲线；
5. 稀释待测样品至合适浓度，使样品稀释液总体积为 20 μL ，加入 BCA 工作液 200 μL ，充分混匀，37°C 放置 30 分钟后，以标准曲线 0 号管做参比，在 562nm 波长下比色，记录吸光值；
6. 根据所测样品的吸光值，在标准曲线上即可查得相应的蛋白含量 (μg)，除以样品稀释液总体积 (20 μL)，乘以样品稀释倍数即为样品实际浓度 (单位: $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)。

B. 分光光度计测定

1. 标准曲线的绘制：各管按照下表加入试剂

孔号	0	1	2	3	4	5	6	7
蛋白标准溶液 (μL)	0	5	10	20	40	60	80	100
去离子水 (μL)	100	95	90	80	60	40	20	0
对应蛋白含量 (μg)	0	2.5	5.0	10.0	20.0	30.0	40.0	50.0

2. 根据样品数量，按 50 体积 BCA 试剂 A 加 1 体积 BCA 试剂 B (50:1) 配制适量 BCA 工作液，充分混匀；
3. 各管加入 1000 μL BCA 工作液；
4. 各管充分混匀，37°C 放置 30 分钟，然后在 562nm 下比色测定。以蛋白含量 (μg) 为横坐标，吸光值为纵坐标，绘出标准曲线；
5. 稀释待测样品至合适浓度，样品稀释液总体积为 100 μL ，加入 BCA 工作液 1000 μL ，充分混匀，37°C 放置 30 分钟后，以标准曲线 0 号管做参比，在 562nm 波长下比色，记录吸光值；
6. 根据所测样品的吸光值，在标准曲线上即可查得相应的蛋白含量 (μg)，除以样品稀释液总体积 (100 μL)，乘以样品稀释倍数即为样品实际浓度 (单位: $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)。

A-4 电泳上样样品的准备

A-4-1 变性、还原蛋白样本

一般的抗体只能识别抗原蛋白中的部份序列结构（表位），因此，为使抗体能够达到结合该表位而需要将蛋白样本进行变性，使之打开折叠的空间结构，

蛋白变性一般使用含阳离子变性去污剂如 SDS 的上样 buffer（loading buffer），并于 95-100° C 煮沸 5 分钟，对于多次跨膜蛋白，可以于 70° C 加热 5-10 分钟，标准的上样 buffer 称为 2X Laemmli buffer，上样时与样本 1:1 混合后变性上样即可：

2X Laemmli buffer

4% SDS

10% 2-mercaptoethanol

20% glycerol

0.004% bromophenol blue

0.125 M Tris HCl

Check the pH and bring it to pH 6.8.

SDS 的阴离子环绕蛋白肽键使之带负电荷，蛋白分子量不同，结合的 SDS 数量不同，所带负电荷也不同，电泳迁移速度不同，因此 SDS-PAGE 电泳可将不同分子量的蛋白分离开。

A-4-2 天然和非还原样本

某些抗体识别的表位是非连续氨基酸构成的蛋白三维结构，此种情况则需要进行非变性的 WB，抗体的说明书一般会标注，这种非变性电泳不加 SDS，样本也不需煮沸。

某些抗体仅识别蛋白的非还原态，如某些 cysteine 基的氧化态，因此 loading buffer 和电泳液中不加入 β -mercaptoethanol and DTT

蛋白状态	凝胶状态	loading buffer	电泳缓冲液
还原-变性	还原和变性	有 β -mercaptoethanol 或 DTT 和 SDS	有 SDS
还原-天然	还原和非变性	有 β -mercaptoethanol 或 DTT，无 SDS	无 SDS
氧化-变性	非还原和变性	无 β -mercaptoethanol 或 DTT，有 SDS	有 SDS
氧化-还原	非还原和天然	无 β -mercaptoethanol 或 DTT，无 SDS	无 SDS

注：除说明书特别标注之外，一般情况下，均使用变性和还原电泳

B 电泳

B-1 PAGE 胶的制备

聚丙烯酰胺凝胶PAGE电泳根据蛋白分子量进行分离蛋白，PAGE胶是由两种化合物聚合而成的，即丙烯酰胺（acr）和N,N-甲叉双丙烯酰胺(Bis).，聚合需加入过硫酸铵及DMAP 或 TEMED，凝胶为中性、水溶性、三维网状结构。凝胶的孔径取决于总丙烯酰胺的百分含量（%T）和交联度（%C）， $T\% = (a+b)/m \times 100\%$ ；和 $C\% = a/(a+b) \times 100\%$ ，其中：a=双体(bis)的重量；b=单体(arc)的重量；m=溶液的体积(ml)。丙烯酰胺总量增加，则孔径减小，5%C构成最小的孔径，任何的 %C增加或降低，孔径都增加，凝胶的百分浓度组成需两个参数，丙烯酰胺（acr）和N,N-甲叉双丙烯酰胺(Bis). 的总量百分浓度（w/v）。

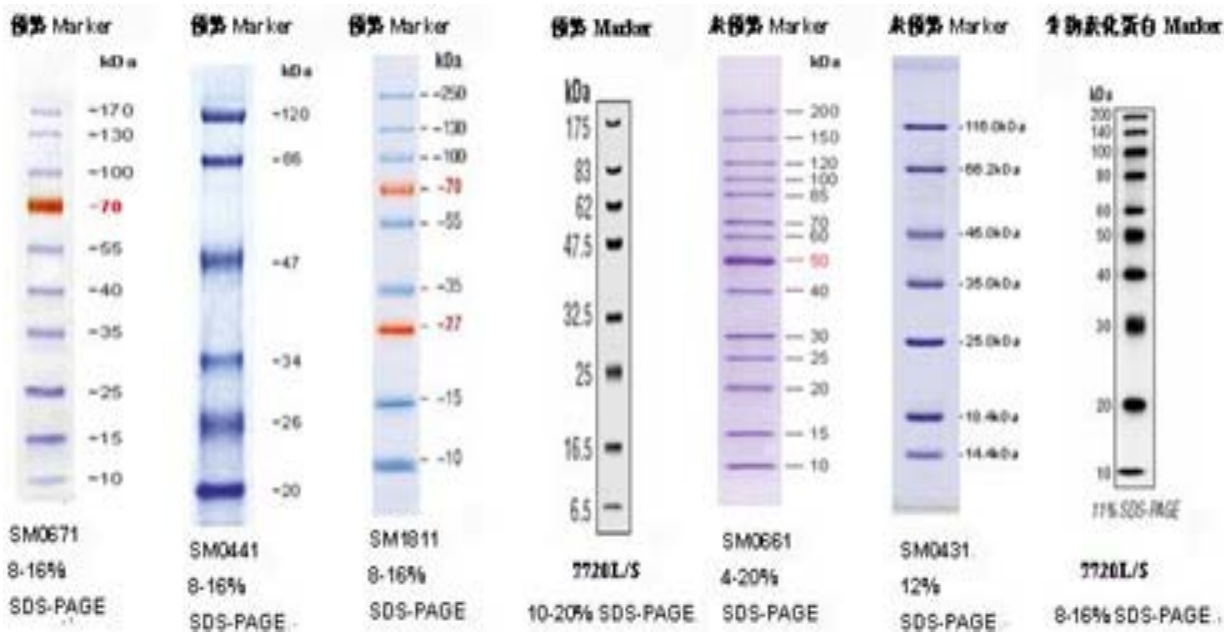
不同分子量的蛋白选择不同的凝胶浓度（参考下表），原则上高分子量蛋白用低浓度胶，低分子量蛋白用高浓度胶分离。

蛋白分子量 (kDa)	凝胶浓度 (%)
4-40	20
12-45	15
10-70	12.5
15-100	10
25-200	8

不同浓度的凝胶的配制方法见附录2 首先配制各组分贮备液，然后分别配制浓缩胶和分离胶。

B-2 蛋白分子量 Marker

预染或非预染各种分子量的蛋白，用于标示电泳中蛋白的大小和示踪



商业化产品：

非预染Marker (MW 116, 97.4, 66, 45, 36 29, 24, 20.1, 14.2KDa)

预染Marker (MW 116, 97.4, 66, 45, 36 29, 24, 20.1, 14.2KDa)

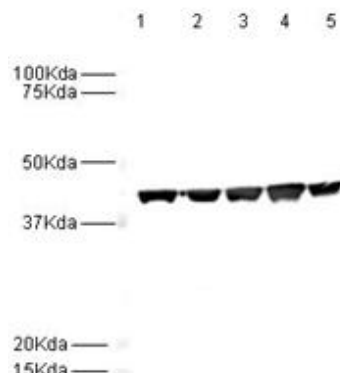
B-3 阳性对照

目的蛋白或明确表达目的蛋白的组织或细胞的蛋白提取物，用于检验整个实验体系和过程的正确性有效性/特别是一抗的质量和效率。建议使用该对照。可查阅文献或抗体说明书选择购买或自提该对照样本。

B-4 内参对照

管家基因编码的、很多组织和细胞中都稳定表达的蛋白，用于检测整个 WB 实验过程及体系是否正常工作，并作为半定量检测目的蛋白表达量的标准对照。必须设立。

内参名称	分子量大小	适用范围
beta-actin	43kDa	胞浆和全细胞
GAPDH	30-40kDa	胞浆和全细胞
Tubulin	55kDa	胞浆和全细胞
WCA1/Porin	31kDa	线粒体
COXIV	16kDa	线粒体
Lamin B1	66kDa	细胞核 (不适于去除核膜的样本)
TBP	38kDa	细胞核 (不适于去除 DNA 的样本)



内参 Beta-actin 抗体 at 1/5000 dilution, Lysates/proteins at 20 ug per lane Lane 1 : HeLa nuclear Lane 2 : HeLa whole cell lysate Lane 3 : A431 cell lysate Lane 4 : Jurkat cell lysate Lane 5 : HEK293 cell lysate.

B-5 上样与电泳

每孔上样量为 20-40 μ g 蛋白，使用专用枪头或注射针头，勿溢出加样孔，

标准电泳缓冲液：1X Tris-glycine：

25 mM Tris base

190 mM glycine

0.1% SDS

调 pH;8.3.

电泳时间按电流仪说明书推荐方法使用,(1 小时或过夜，取决于电压大小)，当染料到达胶的底部，关电源停止电泳，胶不能存放，应立刻进行下一步的转膜。

C 转膜与显色 (Western Blot)

C-1 胶中蛋白的检测

电泳后检测蛋白是否迁移正确与平均，可采用铜染或考马斯蓝染色检测，如果凝胶中的蛋白需要进行转膜则需可逆的铜染法，否则采用不可逆考马斯蓝法染色。

铜染法：电泳胶用蒸馏水洗数秒钟，加入 0.3 M CuCl_2 染色 5-10 分钟，再用去离子水洗一次，在暗背景下观察在兰色胶背景下蛋白出现透明条带，胶置于 0.1- 0.25 M Tris/0.25 M EDTA pH 8.0 缓冲液中漂洗脱色两次，再置于电转缓冲液中开始转膜。

考马斯蓝法：用 40% 双蒸水, 10% 醋酸, 50% 甲醇的溶液固定胶中蛋白，考马斯蓝 R-250 染液（凯基产品）室温染色 4 小时至过夜，保持摇匀，转入 67.5% 双蒸水, 7.5% 醋酸, 25% 甲醇摇匀至脱去多余的染料，蛋白被染成深蓝色。

C-2 蛋白转膜

蛋白因结合 SDS 而带电荷，在电场下从胶中转至膜上，转膜操作根据电转仪制造商的说明书进行转膜方式分为半干和湿转两种，半干式转膜速度快，而湿式成功率高并特别适合用于分子量大于 100KD 的蛋白。

湿式转膜三明治排列为：海绵/纸/胶/膜/纸/海绵，全部紧密排列，特别是胶/膜之间不能留有气泡，三明治安放的方向确认正确负极方为带负电的胶里的蛋白，向正极方（膜）电迁移。

标准的电转缓冲液为 1X Tris-glycine buffer 不含 SDS，但加入 20%甲醇，如果转膜的蛋白分子量大于 80KD，则推荐加入 SDS 使之终浓度为 0.1%。

半干式转膜中，三明治的排列为：/纸/胶/膜/纸，用电转缓冲液浸湿后，直接置于电转仪的正负极之间。胶于负极而膜置于正极。半干式的电转缓冲液可不同于湿式的电转缓冲液，推荐为：48 mM Tris, 39 mM glycine, 0.04% SDS, 20%甲醇，

两类膜可供选择：硝酸纤维素膜和 PVDF 膜（正电荷尼龙膜），根据不同需要选择（下表），PVDF 膜需要浸泡甲醇中 1-2 分钟，再孵育于冰冷的电转缓冲液中 5 分钟，胶也需在冰冷的电转缓冲液中平衡 3-5 分钟，否则转膜时会导致条带变形。

	PVDF 膜	NC 膜	尼龙膜
灵敏度和分辨率	高	高	高
背景	低	低	较高
蛋白结合能力	100-200ug/cm ² (适用于 SDS 存在时与蛋白结合)	80-100ug/cm ²	>400ug/cm ²
机械强度	强	干的膜易脆	软而结实
溶剂抗性	强	差	差
使用前是否需要浸润	100%甲醇润湿	缓冲液润湿	缓冲液润湿
适用染色方法	胶体金、丽春红、酰胺黑、印度墨汁、考马斯亮兰	胶体金、丽春红、酰胺黑、印度墨汁	不能用阴离子染料
适用检测方法	显色法、化学发光、荧光、放射性、化学荧光、快速免疫检测	显色法、化学发光、荧光、放射性	显色、化学发光、放射性
适用范围	普通蛋白 WB、糖蛋白检测、蛋白质测序、氨基酸分析、重复检测	普通蛋白 WB、氨基酸分析、重复检测、0.1um 膜适用于 7kDa 以下蛋白	低浓度小分子蛋白、酸性蛋白、糖蛋白、蛋白多糖、核酸检测常用
价格	高	较低	低

注：大蛋白和小蛋白的转膜

电转移缓冲液中 SDS 与甲醇的平衡、蛋白的大小、胶的浓度都会影响转膜效果，如下调整可以增加转膜效率：

大蛋白（大于 100 KD）

1. 对于大蛋白而言，其在凝胶电泳分离迁移较慢，而从凝胶转出也非常慢，因此对于这种大分子量蛋白应该用低浓度的凝胶，8%或更低，但因低浓度的胶非常易碎，所以操作时需十分小心，

2 大蛋白易在凝胶里形成聚集沉淀，因此；转膜时在电转移缓冲液加入终浓度为 0.1%的 SDS，以避免出现这种情况，甲醇易使 SDS 从蛋白上脱失，因此应降低电转移缓冲液中甲醇的浓度至 10%或更低，以防止蛋白沉淀。

3 降低电转移缓冲液中甲醇的比例以促进凝胶的膨胀，易于大蛋白的转出。

4 如果使用硝酸纤维素膜，甲醇是必需的，但如果是 PVDF 膜，甲醇可以不必加入电转移缓冲液中，但转膜前 PVDF 需用甲醇活化。

5 选择湿式，4℃转膜过夜，以取代半干式转膜。

小蛋白（小于 100 KD）

1 SDS 妨碍蛋白与膜的结合，特别是对小蛋白更是如此，因此，对于小分子的蛋白，电转移缓冲液中可以不加 SDS。

2 保持 20%的甲醇浓度

对于大于500KD的蛋白，请参考下述文献：Bolt and Mahoney, High-efficiency blotting of proteins of diverse sizes following sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide, gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry* **247**, 185–192 (1997).

更多的转膜注意事项：

- 避免用直接接触膜，应使用镊子，手指上的油脂与蛋白会封闭转膜效率并易产生背景污斑
- 排列三明治时，尽量用移液器或 15ml 试管赶除胶与膜之间的气泡，或将三明治放在装有的培养皿中以防止气泡产生，请戴手套！
- 确认裁剪的膜和滤纸与凝胶尺寸相同，否则导致电流不能通过膜，从而转膜无效
- 鸡抗体易于与 PVDF 膜和其它尼龙膜结合，导致高背景，请替换成硝酸纤维素膜以降低背景。

C-3 膜上蛋白的检测：丽春红

为检测转膜是否成功，可用丽春红染色，

2%的丽春红贮备液(20ML)：2%丽春红(0.4 克)溶于 30%三氯乙酸(6 克)和 30%磺基水杨酸(6 克)

丽春红染色工作液：2%的丽春红贮备液 1：10 稀释，即加 9 倍的 ddH₂O

染色方法：

将膜放入 TBST 洗一次，再置于丽春红染色工作液中，在室温下摇动染色 5 分钟，大量的水洗膜直至水变清无色蛋白条带清晰，（膜也可以用 TBST 或水重新洗后再进行染色）PVDF 膜需用甲醇再活化后用 TBST 洗后进行封闭。

10x TBS的配制

24.23 g Trizma HCl

80.06 g NaCl

加约 800 ml 超纯水

用纯HCl调pH 至7.6

定容至 1 L.

TBST的配制

配制 1 L TBST：量取 100 ml 10x TBS + 900 超纯水 + 1ml Tween20

Tween20 非常粘稠，用枪头不易吸取，请确定加入准确的量，最好用 Tris buffer.配成 10%的 Tween20 母液后使用。

C-4 膜的封闭

为防止一抗或/和二抗与膜的非特异性结合产生的高背景，因此需要进行膜的封闭，

传统上有两种封闭液：脱脂奶粉或 BSA，脱脂奶粉成本低但不能用于磷酸化蛋白（因脱脂奶粉含有酪蛋白，该蛋白本身就是一种磷酸化蛋白），使用脱脂奶粉会结合磷酸化抗体从而易产生高背景。

某些抗体用 BSA 封闭时因不明原因可能会产生比脱脂奶粉更强的信号，，请仔细阅读说明书注明的注意事项和膜的特殊的封闭方法。

配制 5%脱脂奶粉或 BSA 溶液：每 100 ml TBST 中加入 5 g 脱脂奶粉或 BSA，混匀后过滤，如不过滤会导致使膜污染上细微黑颗粒。

封闭时，4℃ 摇动，封闭 1 hour，再用 TBST 洗 5 秒，进入下一步抗体的孵育。

C-5 一抗的孵育

孵育 Buffer：按抗体说明书建议的稀释倍数，用 TBST 稀释一抗，如果说明书没有建议的稀释倍数，则参照一般推荐的稀释倍数 (1:100–1:3000)，一抗浓度过高会导致产生非特异性条带。

某些实验室传统上在封闭液中孵育抗体，而有些实验室用不含封闭剂的 TBST 来孵育抗体，结果因抗体而异，有时两者结果相同，有时结果不同。

注：如果不存在高背景的问题，某些抗体用含低浓度 (0.5 - 0.25%) 脱脂奶粉或 BSA 的封闭液来，稀释，可产生相对更强的信号条带。

孵育时间：一抗的孵育时间可从几小时至过夜（一般不超过 18 小时）不等，取决于抗体与蛋白的亲合性和蛋白的含量丰度，建议使用较高的抗体稀释倍数和较长的孵育时间来保证特异性结合。

孵育温度：尽可能低温孵育，如果在封闭液中孵育一抗过夜，应在 4℃ 进行否则会产生污染而破坏蛋白（特别是磷酸基团）。

孵育一抗时需保持适当的摇动使之均匀覆没膜，防止结合不均匀。

C-6 二抗的孵育

一抗孵育结束后，用 TBST 摇动洗膜数次，每次 5min 或更长，去除残留的一抗。

孵育 Buffer 和稀释倍数：用 TBST 按说明书推荐的倍数稀释二抗，如果说明书没有标出稀释倍数，则按常规的倍数稀释(1:1000- 1:20,000)预试，二抗的浓度过高也会导致非特异性条带。亦可以在封闭液中孵育二抗（和一抗），但可能在降低背景同时导致特异性条带的信号也减弱，可能是封闭剂阻碍了抗体与靶蛋白的结合。

孵育时间和温度：室温、1-2 hours，摇动

二抗连接物：推荐使用二抗连接 HRP，不建议连接 AP 碱性磷酸酶，因其不够灵敏。

C-7 显色

我们用的是底物化学发光法

显色分为酶促底物发光和化学发光法或荧光法

酶促底物发光法代表为 DAB 显色法，与其它同类方法的比较如下图所示：

底物	DAB	4-CN	AEC	TMB
稳定性	好	一般	避光	好
灵敏度	250pg	1ng		100pg
背景	一般	低	高	高
终产物 成像性	不能很好的成像	容易成像		容易成像
颜色	褐色	介于蓝色与蓝紫色之间（可用于 double-staining）	棕红色	蓝紫色
毒性	有（疑有治癌作用）	无	有	无

而现在最常用的是化学发光法：HRP 化学发光底物 Luminol（ECL 法 chemiluminescence）及其改良法，对于 HRP 偶联的二抗，一般传统上使用 ECL 和 ECL+，推荐使用后者，更灵敏。其中不同商家的产品特点总结如下表：

	ECL Advance	ECL	ECL Plus
推荐应用	用于极高的灵敏性的 WB 一抗和/或靶蛋白含量极低的样本	常规 Western blotting	较高灵敏性的 Western blotting 和化学发光扫描
灵敏性	$2 \times 10^{-14}g$	$10^{-12}g$	$2 \times 10^{-13}g$
抗体经济性	极好	好	非常好
一抗稀释度	1:100 000	1:10 000	1:20 000
二抗稀释度	1:500 000	1:15 000	1:200 000
封闭剂	Yes-ECL Advance Block	Certain systems	Certain systems
样本重新标记	可以	可以	可以
信号持续时间	4-6 h	1-2 h	24-18 h
建议膜	硝化纤维或 PVDF	硝化纤维或 PVDF	硝化纤维或 PVDF
建议检测方法	X 胶片/CCD	X 胶片/CCD	荧光扫描仪/X 胶片/CCD

	SuperSignal® West Pico 化学发光底物	SuperSignal® West Femto 超灵敏型底物	SuperSignal® West Femto 增强型底物
主要优点	与 ECL™ 系统相比减半的价格、双倍的信号	适用于 HRP 检测的最灵敏的化学发光底物	延长的信号持续时间使这种底物用于今天的成像设备最为理想
检测下限	10-12g	10-15g	10-14g
信号持续时间	6-8 小时	8 小时	24 小时
首选检测方法	X 胶片	成像设备或 X 胶片	成像设备或 X 胶片
建议一抗稀释度	1:1000-1:5000	1:5,000-1:100,000	1:1000-1:50,000
建议二抗稀释度	1:20,000-1:100,000	1:100,000-1:500,000	1:50,000-1:250,000
产品保存期	室温 1 年	4℃1 年或室温 6 个月	室温 1 年
建议印迹膜	硝化纤维	硝化纤维或 PVDF	硝化纤维或 PVDF

X-ray 胶片：传统上使用手工曝光的方法，可控制 X-ray 胶片在曝光和在定影剂的时间调节。而全自动 X-ray 胶片曝光器也广泛使用并操作简便。

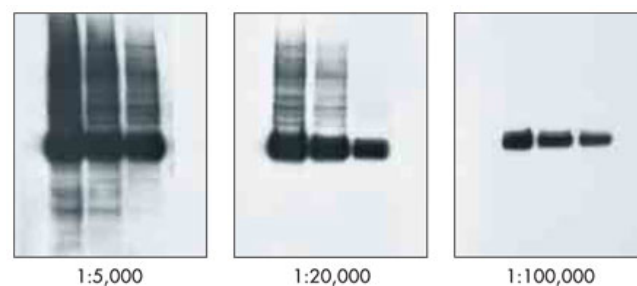
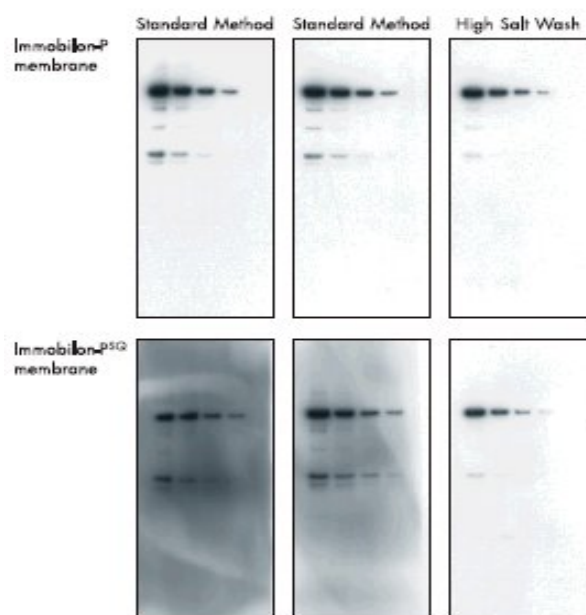
注意不能过度曝光，特别不适于检测相对蛋白量，过度曝光导致全暗的背景没有反差和/或产生大量的非特异性条带。

数字图像显影：新一代的胶片显色方法是使用数码相机在暗室中拍摄膜上的化学发光，将其转成数字信号，再通过仪器自带的软件进行分析。有些新一代商品化的数字成像仪器已不再检测 HRP 连接的抗体（如：ECL chemiluminescence），如 STORM 分析仪只检测荧光标记的抗体。

D 常见问题分析与解决方案

问题	可能原因	验证或解决办法
背景高	封闭不充分	延长封闭时间， 更换合适的封闭剂（脱脂奶粉，BSA，血清等）
	一抗浓度过高	增加一抗稀释倍数，
	抗体孵育温度过高	4℃孵育
	二抗非特异性结合 或与封闭剂交叉反应	设置二抗对照（不加一抗），降低二抗浓度
	一抗或二抗与封闭剂 有交叉反应	在孵育和洗涤液中加入 Tween-20 以减少交叉反应。
	洗膜不充分	增加洗涤次数
	膜不合适	NC 膜比 PVDF 膜背景低
	膜干燥	保证充分的反应液，避免出现干膜现象
没有阳性条带 或很弱	一抗、二抗等不匹配	订购试剂时认真选取一抗与组织种属，一抗与二抗或/和底物与酶系统之间相匹配的抗体及底物。可通过设置内参可以验证二级检测系统的有效性。
	一抗或/和二抗浓度低	增加抗体浓度，延长孵育时间 控制好，以免背景过高
	封闭剂与一抗或二抗有交叉反应	封闭时使用温和的去污剂，如 TWEEN20，或更换封闭剂（常用的脱脂奶、BSA、血清或明胶
	一抗不识别目的物种的靶蛋白	检查说明书，或做 ClustalW 比对，设阳性对照
	样本中无靶蛋白或靶蛋白含量过低 （抗原无效）	设置阳性对照，如果阳性对照有结果，但标本没有则可能是标本中不含靶蛋白或靶蛋白含量太低。后者可增加标本上样量至少每孔 20-30ug 蛋白，样本制备时使用蛋白酶抑制剂，或分级提取目的蛋白。
	转膜不充分，或洗膜过度	使用丽春红 S 检测转膜效果，PVDF 膜需浸透，需正确的转膜操作，勿过度洗膜
	过度封闭	使用含 0.5%脱脂奶或无脱脂奶的抗体稀释液，或更换封闭剂，减少封闭时间
	一抗失效	使用有效期内抗体，分装保存，避免反复冻融取用，工作液现配现用
	二抗受叠氮钠抑制	所用溶液和容器中避免含有叠氮钠（HRP 的抑制剂）
	酶和底物失效	直接将酶和底物进行混合，如果不显色则说明酶失活了。选择在有效期内、有活性的酶联物，使用新鲜的底物。
多非特异性条带 或条带位置不对	细胞传代次数过多，使其蛋白表达模式的分化	使用原始或传代少的细胞株，或平行实验
	体内表达的蛋白样本具有多种修饰形式：乙酰化、磷酸化、甲基化、烷基化、糖基化等	查文献，使用去修饰的试剂使蛋白恢复其正确的大小

	蛋白样本降解	使用新鲜制备的标本，并使用蛋白酶抑制剂
	新蛋白或同族蛋白的分享同种表位 的不同剪接方式	查其它文献报导，或 BLAST 搜寻，使用说明书报导的细胞株或组织
	一抗浓度过高	降低抗体浓度，可以减少非特异性条带
	二抗浓度过高 产生非特异性结合	降低抗体浓度，增加二抗对照 选择特异性更强，只针对重链的二抗
	抗体未纯化	使用单克隆或亲和纯化的抗体，减少非特异条带
	蛋白存在二聚体或多聚体	SDS-PAGE 电泳上样前，煮沸 10 min， 以增强蛋白质解聚变性
背景有白色/黑色斑点	转膜时有气泡或抗体分布不均	尽量去除气泡，抗体孵育时保持摇动
	抗体与封闭剂结合	过滤封闭剂
暗片现白条带	一抗或二抗加入过多	稀释抗体的浓度
目的条带过低/过高	SDS-PAGE 胶浓度选择不合适	调整胶浓度，分子量大的蛋白用低浓度胶，分子量小的蛋白用高浓度胶
“微笑”条带	迁移过快 电泳温度过高	降低电泳速度，低温电泳（冷室）
转膜不充分	膜没有完全均匀湿透	使用 100% methanol 浸透膜
	靶蛋白分子量小于 10,000	选择小孔径的膜，缩短转移时间
	靶蛋白等电点等于或接近转移缓冲液 pH 值	可尝试使用其他缓冲液如 CAPS 缓冲液（pH 10.5）或使用低 pH 值缓冲液如乙酸缓冲液
	甲醇浓度过高	过高甲醇浓度会导致蛋白质与 SDS 分离，从而沉淀在凝胶中，同时会使凝胶收缩或变硬，从而抑制高分子量蛋白的转移。降低甲醇浓度或者使用乙醇或异丙醇代替
	转移时间不够 Thick gel	对于厚的胶以及高分子量蛋白需要延长转移时间



Optimization of secondary antibody dilution for immunodetection of ERK 1 with Immobilon Western Chemilumin-escent HRP Substrate. Two-fold dilutions of rat liver lysate samples were applied to each gel. Electroblotted proteins were probed with rabbit anti-ERK 1 antibody (1:1,000 dilution) and HRPconjugated goat anti-rabbit IgG (1:5,000, 1:20,000 and 1:100,000dilutions, left to right).

附录 1 WB 实验试剂配方

1 Nonidet-P40 (NP40) buffer

150 mM sodium chloride
1.0% NP-40 (或 Triton X-100)
50 mM Tris, pH 8.0

2 RIPA buffer (Radio Immuno Precipitation Assay buffer)

150 mM sodium chloride
1.0% NP-40 or Triton X-100
0.5% sodium deoxycholate
0.1% SDS (sodium dodecyl sulphate)
50 mM Tris, pH 8.0

注: *The 10% sodium deoxycholate stock solution (5 g into 50 ml) must be protected from light.*

3 Tris-HCl buffer

20 mM Tris-HCl, pH 7.5

4 Tris-Triton buffer

10 mM Tris, pH 7.4
100 mM NaCl
1 mM EDTA
1 mM EGTA
1% Triton X-100
10% glycerol
0.1% SDS
0.5% deoxycholate

All four of these buffers will keep at 4°C for several weeks or for up to a year aliquotted and stored at -20°C.

5 TBS 10x (concentrated TBS)

24.23 g Trizma HCl
80.06 g NaCl
Mix in 800 ml ultra pure water.
pH to 7.6 with pure HCl.
Top up to 1 L.

TBST

For 1 L: 100 ml of TBS 10x + 900 ml ultra pure water + 1ml Tween20

6 PBS: 1.16 g Na₂HPO₄, 0.1 g KCl, 0.1 g K₃PO₄, 4 g NaCl (500 ml distilled water) pH 7.4

附录 2 SDS-PAGE 胶的配制

一 30% (W/V) Acrylamide 的配制

- 1 称量 Acrylamide 290g, Bis 10 g 下列试剂, 置于 1 L 烧杯中
- 2 向烧杯中加入约 600 ml 的去离子水, 充分搅拌溶解。
3. 加去离子水将溶液定容至 1 L, 用 0.45 μ m 滤膜滤去杂质。
4. 于棕色瓶中 4℃ 保存。

注意: 丙烯酰胺具有很强的神经毒性, 并可通过皮肤吸收, 其作用具有积累性, 配制时应戴手套等。聚丙烯酰胺无毒, 但也应谨慎操作, 因为有可能含有少量的未聚成份。

二 配制浓缩胶缓冲液: 1.0mol/L TrisHCl pH6.8, 4℃ 保存

三 配制分离胶缓冲液: 1.5mol/L TrisHCl pH8.8, 4℃ 保存

四 配制 10% SDS (W/V):

五 配制 10% W/V 过硫酸铵 (AP): 称 1 克过硫酸铵, 加 10ml 去离子水搅拌溶解, 贮存于 4℃。(注意 10% 过硫酸铵溶液在 4℃ 保存可使用 2 周左右, 超过期限会失去催化作用。

六 TEMED 原溶液

七 电泳缓冲液 (5×): Tris 15g+甘氨酸 72g+SDS 5g+H₂O 至 1L, 临用时稀释 5 倍至 1×SDS 电泳缓冲液加入电泳槽中。

八 配制 1 M Tris-HCl 的方法

1. 称量 121.1 g Tris 置于 1 L 烧杯中。
2. 加入约 800 ml 的去离子水, 充分搅拌溶解。
3. 加入浓盐酸调节所需要的 pH 值。
- 4 将溶液定容至 1 L。
5. 高温高压灭菌后, 室温保存。

注意: 应使溶液冷却至室温后再调定 pH 值, 因为 Tris 溶液的 pH 值随温度的变化差异很大, 温度每升高 1℃, 溶液的 pH 值大约降低 0.03 个单位。

九: PAGE 浓缩胶 (5% Acrylamide) 配方表

各种组份名称	各种凝胶体积所对应的各种组份的取样量							
	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	6 ml	8 ml	10 ml
H ₂ O	0.68	1.4	2.1	2.7	3.4	4.1	5.5	6.8
30% Acrylamide	0.17	0.33	0.5	0.67	0.83	1.0	1.3	1.7
1.0 M Tris-HCl (pH6.8)	0.13	0.25	0.38	0.5	0.63	0.75	1.0	1.25
10% SDS	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
10% 过硫酸铵	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
TEMED	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.008	0.01

十 SDS-PAGE 分离胶配方表

接下页

各种组份名称	各种凝胶体积所对应的各种组份的取样量							
	5 ml	10 ml	15 ml	20 ml	25 ml	30 ml	40 ml	50 ml
6% Gel								
H ₂ O	2.6	5.3	7.9	10.6	13.2	15.9	21.2	26.5
30% Acrylamide	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	8.0	10.0
1.5 M Tris-HCl (pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% 过硫酸铵	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.004	0.008	0.012	0.016	0.02	0.024	0.032	0.04
8% Gel								
H ₂ O	2.3	4.6	6.9	9.3	11.5	13.9	18.5	23.2
30% Acrylamide	1.3	2.7	4.0	5.3	6.7	8.0	10.7	13.3
1.5 M Tris-HCl (pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% 过硫酸铵	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.003	0.006	0.009	0.012	0.015	0.018	0.024	0.03
10% Gel								
H ₂ O	1.9	4.0	5.9	7.9	9.9	11.9	15.9	19.8
30% Acrylamide	1.7	3.3	5.0	6.7	8.3	10.0	13.3	16.7
1.5 M Tris-HCl (pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% 过硫酸铵	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
12% Gel								
H ₂ O	1.6	3.3	4.9	6.6	8.2	9.9	13.2	16.5
30% Acrylamide	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0	12.0	16.0	20.0
1.5 M Tris-HCl (pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% 过硫酸铵	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
15% Gel								
H ₂ O	1.1	2.3	3.4	4.6	5.7	6.9	9.2	11.5
30% Acrylamide	2.5	5.0	7.5	10.0	12.5	15.0	20.0	25.0
1.5 M Tris-HCl (pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% 过硫酸铵	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
