



# 免疫印迹

## western blot



培训人：马芳  
2018年5月27日

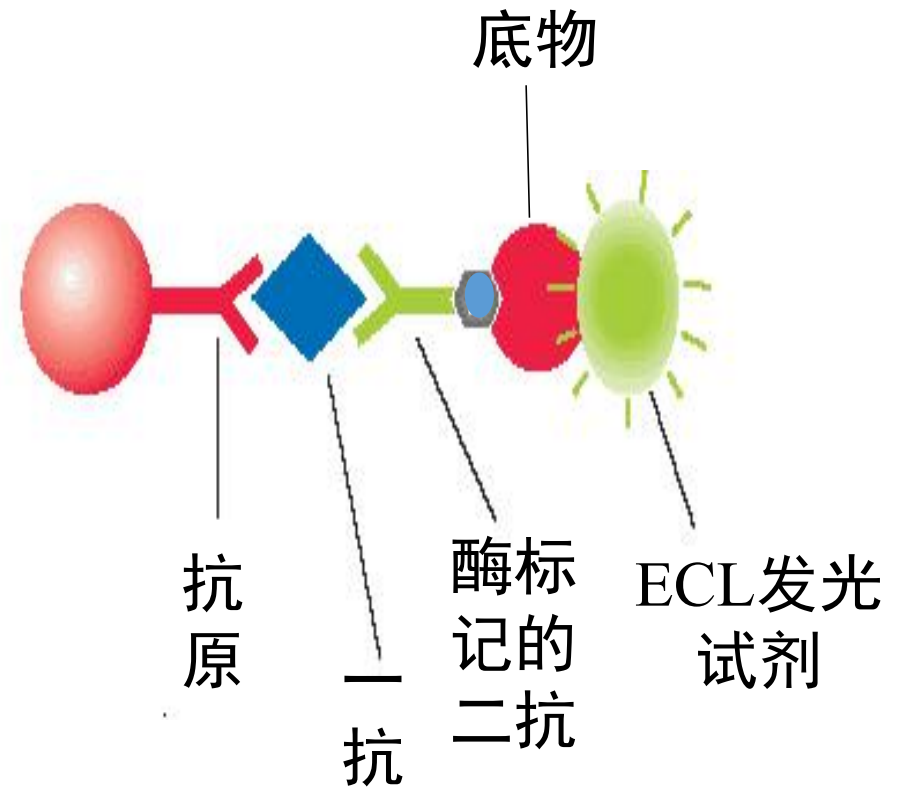
# 目录

## Contents

第一部分	原理
第二部分	实验准备
第三部分	主要步骤
第四部分	注意事项
第五部分	常见问题及原因

# 第一部分 原理

**Western Blot**又称免疫印迹，是指将蛋白样品转移到固相载体上，利用相应的抗体来检测目的蛋白的一种方法，可对样品中特异性蛋白质进行定性或者半定量分析。



## 第二部分 实验准备

需用户自备耗材：

制胶试剂

电泳缓冲液

转膜缓冲液

封闭液

TBST

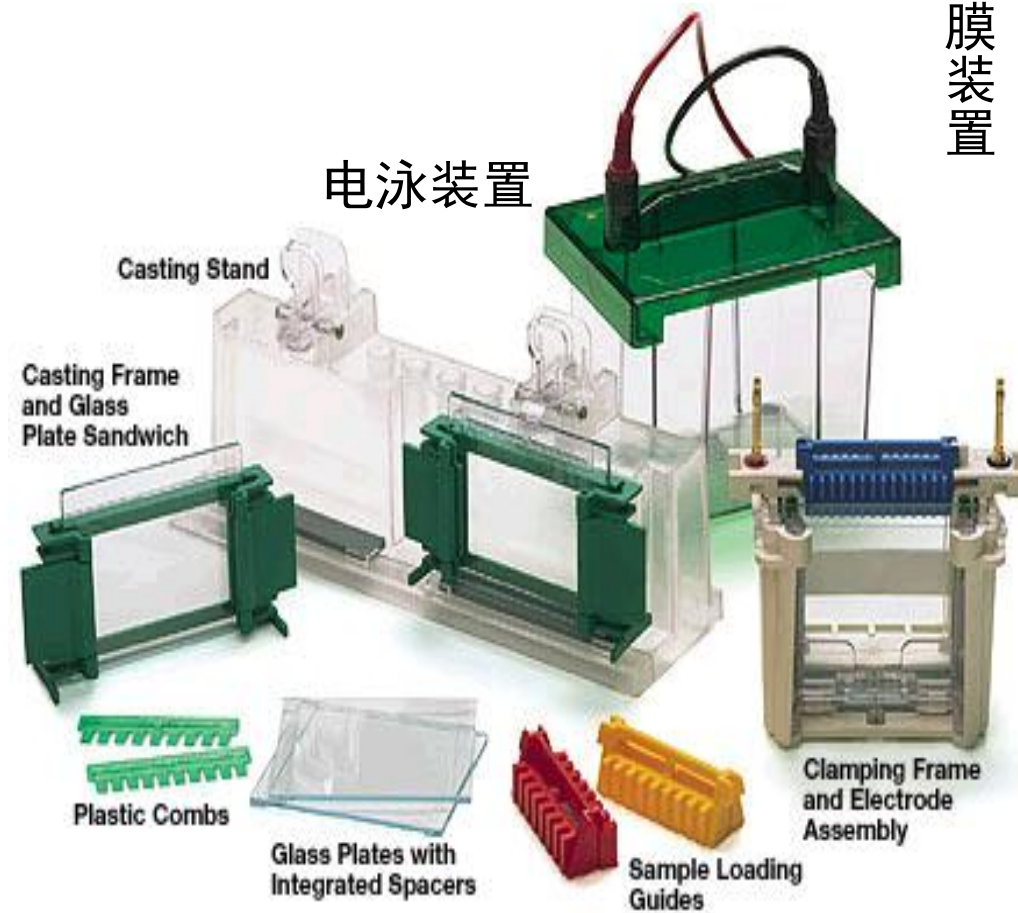
一抗

二抗

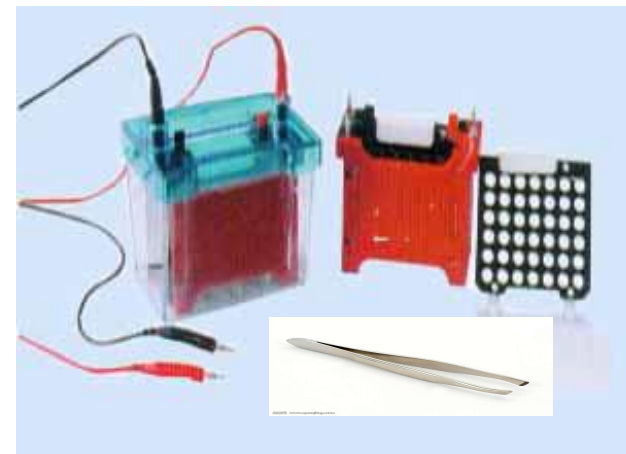
显色液

PVDF膜

中心可提供如下设备：

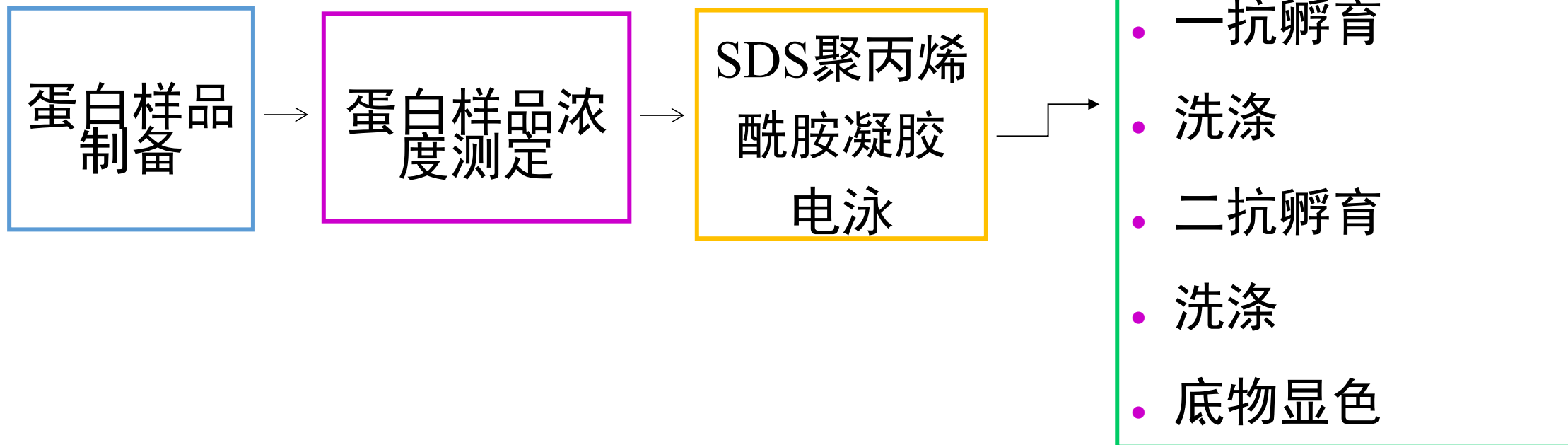


转膜装置



## 第三部分 主要步骤

主要步骤：



## 第三部分 主要步骤

### 蛋白样品制备

RIPA裂解液中加入蛋白酶抑制剂

建议使用广谱蛋白酶抑制剂的混合物如“cocktail”

**组织蛋白提取：**100 mg组织加1 ml裂解液,用玻璃匀浆器匀浆,冰上裂解30min

**细胞蛋白提取：**去培养基,胰酶消化后转入EP管,PBS洗2-3次,每一培养瓶细胞加入约120  $\mu$ L裂解液,冰上裂解30min

4°C 离心, 取上清

-80°C保存

和

加入SDS-loading buffer,煮10min  
-20°C保存

## 第三部分 主要步骤

### 蛋白样品浓度测定

方法	双缩脲法	紫外吸收法	Lowry法	Bradford法	BCA法
原理	多肽键+碱性Cu <sup>2+</sup> 生成紫色络合物	蛋白质中的酪氨酸和色氨酸残基在280nm处的光吸收	磷钼酸-磷钨酸试剂被Tyr和Phe还原	考马斯亮蓝染料与蛋白质结合时, 其Imax由465nm变为595nm	在碱性环境下蛋白质与Cu <sup>2+</sup> 络合并将Cu <sup>2+</sup> 还原成Cu <sup>+</sup>
说明	用于快速测定, 不太灵敏; 不同蛋白质显色相似	用于层析柱流出液检测; 不消耗样品, 测定后样品能回收利用	耗时长; 操作严格计时; 标准曲线不是严格的直线, 专一性差	较好; 颜色稳定; 颜色深浅随不同蛋白质变化	抗干扰能力强, 蛋白不可逆变性

## 第三部分 主要步骤

### SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

制分离胶，30min  
凝固

制浓缩胶，1h凝固

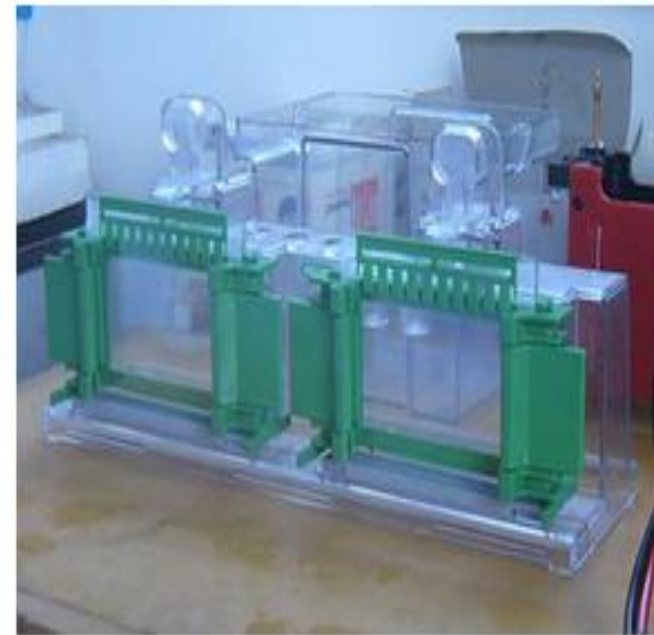
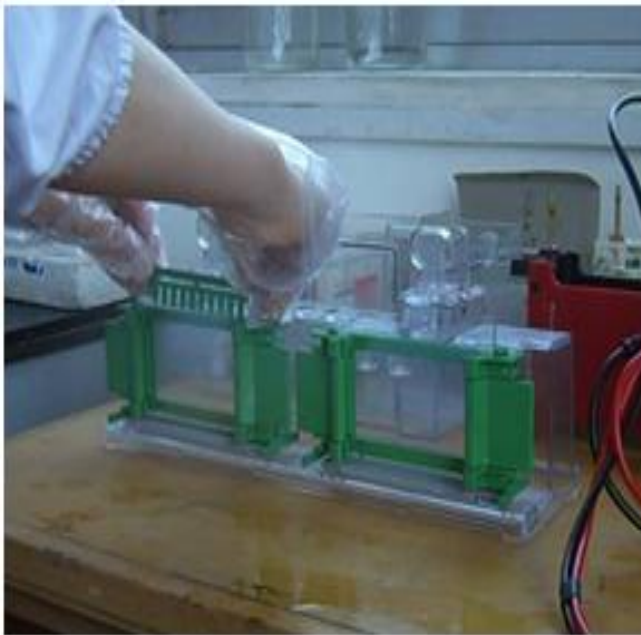
上样

90V，电泳直至蛋白样品至浓缩胶与  
分离胶分界面

120V，继续电泳直至指示剂  
至胶底部



制胶的操作流程



### 10%的分离胶

总体积 5ml

ddH <sub>2</sub> O	2.0ml
30%Acr-Bis	1.65ml
1M Tris-HCl (pH 8.0)	1.25ml
10% SDS	0.05ml
10% AP	0.05ml
TEMED	4 μl

将混合液迅速加入玻璃板间隙，预留1.5cm加入异丙醇

### SDS-PAGE 分离胶浓度

### 最佳分离范围

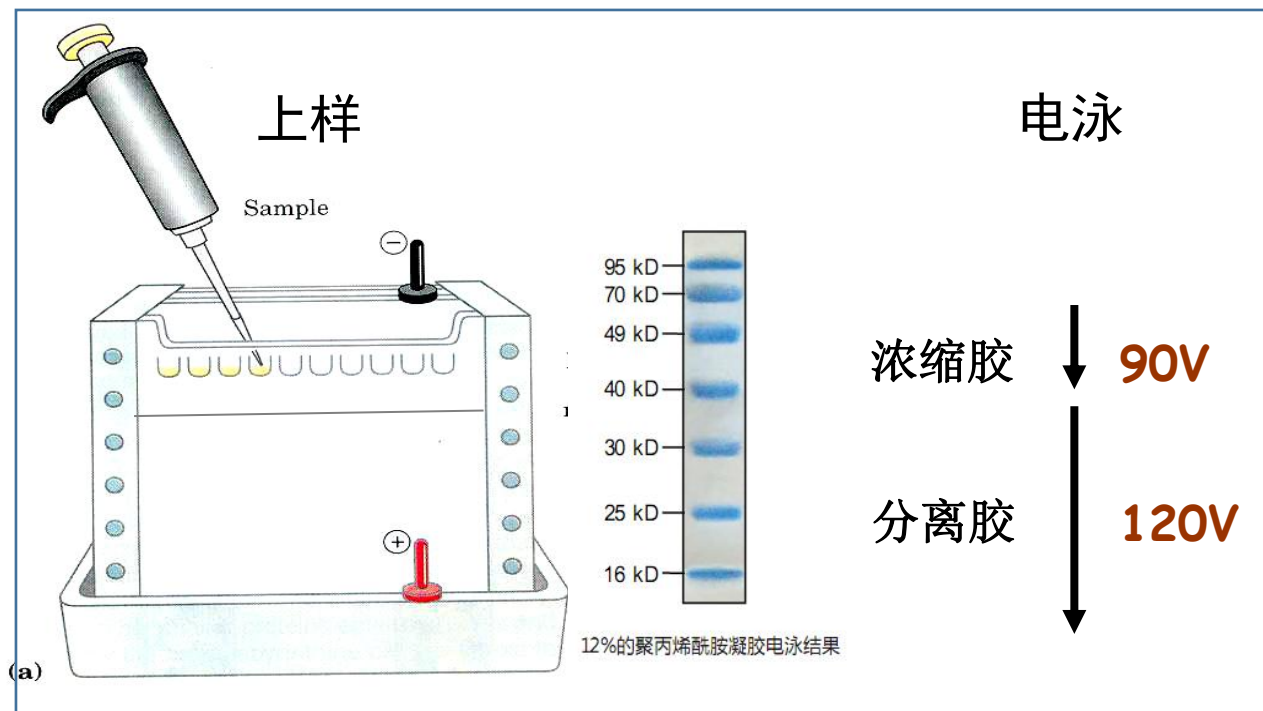
6%	50-150kD
8%	30-90kD
10%	20-80kD
12%	12-60kD
15%	10-40kD

### 4%的浓缩胶

总体积 2ml

ddH <sub>2</sub> O	1.4 ml
30%Acr-Bis	0.33 ml
1M Tris-HCl (pH 6.8)	0.25 ml
10%SDS	0.02 ml
10%AP	0.02 ml
TEMED	2 μl

将混合液迅速加入玻璃板间隙，并立即插入梳子

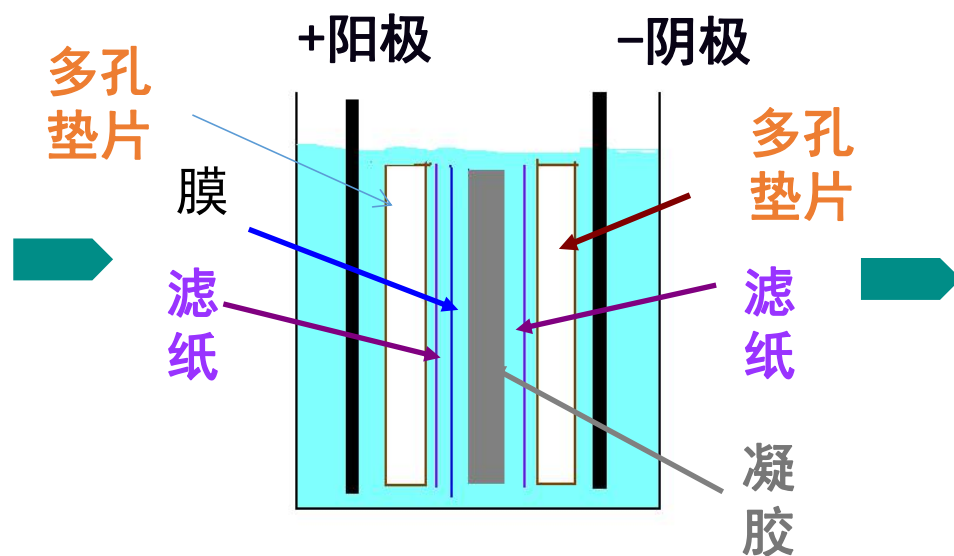


## 第三部分 主要步骤

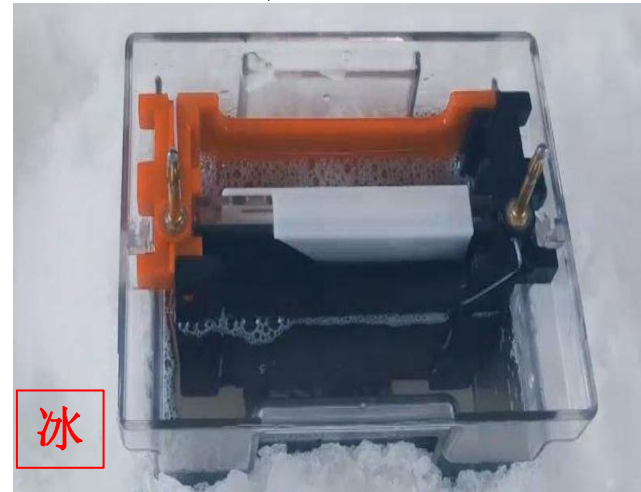
### 转膜

经PAGE胶分离的蛋白质样品,转移到固相载体(例如PVDF膜)上,固相载体以非共价键形式吸附蛋白质,且能保持电泳分离的多肽类型及其生物学活性不变。

PVDF膜用甲醇浸泡5s

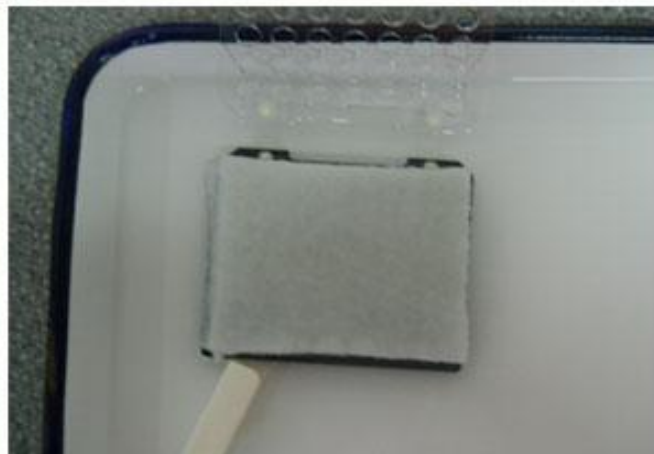
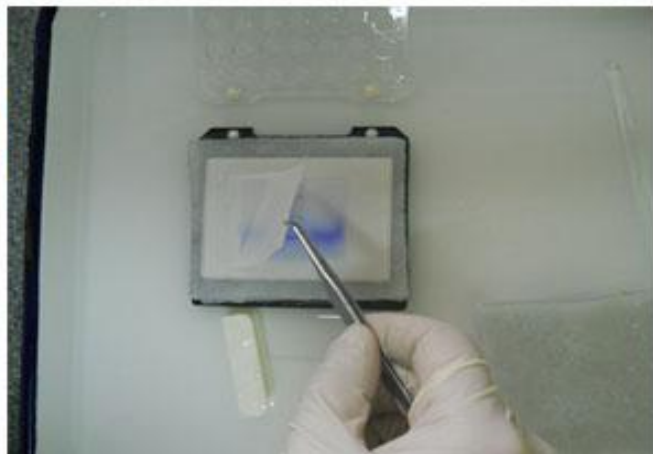
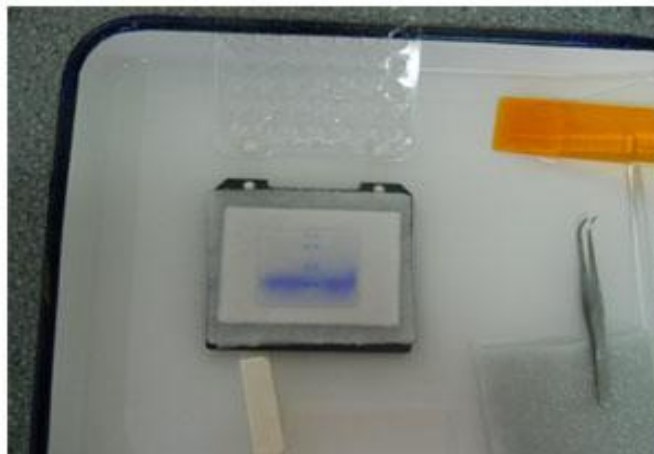
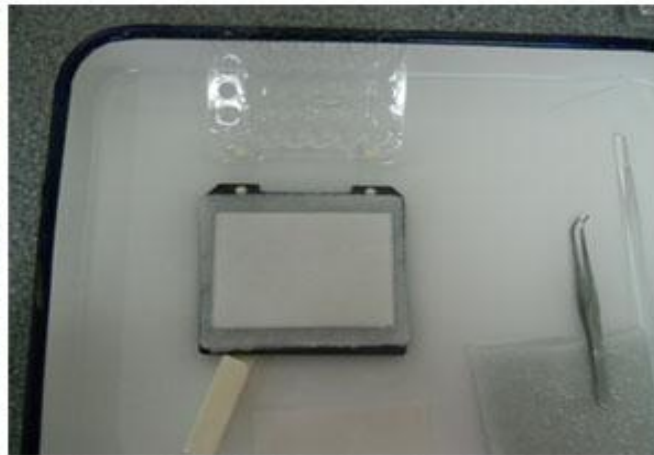
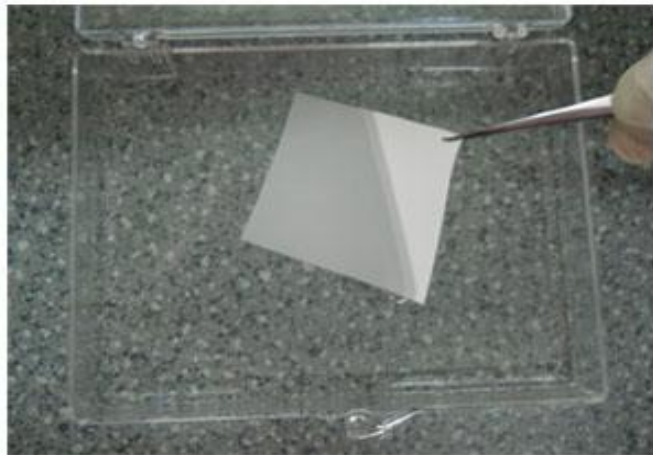
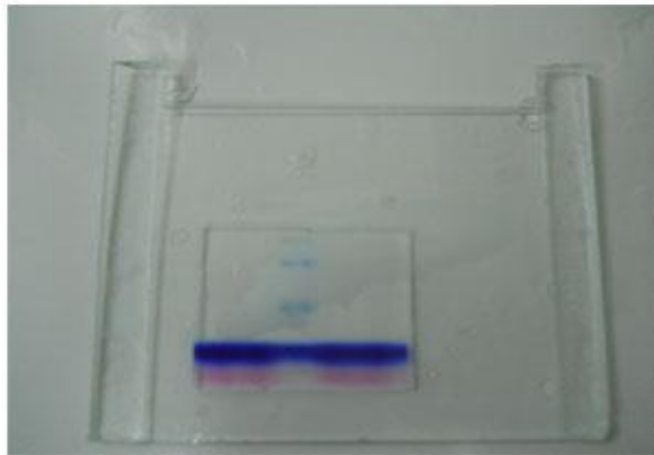


加入缓冲液, 恒流200mA转膜





转膜的操作流程



## 膜的选择：

	NC膜	PVDF膜
蛋白结合能力	80-110ug/cm <sup>2</sup>	125-200ug/cm <sup>2</sup> 适合于SDS存在下与蛋白结合
质地	膜易脆	机械强度高
操作程序	缓冲液润湿	100%甲醇润湿
检测方式	不可用考马斯亮蓝染	可用考马斯亮蓝染
适用范围	0.45um 一般蛋白 0.2um 小于20kD	可用于蛋白质测序
价格	便宜	较贵

## 转膜条件：

蛋白大小	转膜条件
小于20kD	200mA 恒流1h
20-100kD	200mA 恒流2h
100-200kD	200mA 恒流6h或 30V恒压过夜
大于200kD	200mA 同上，转膜液加0.1%SDS

## 第三部分 主要步骤

### 封闭

#### 去除非特异结合位点，降低背景：

Blocking Buffer : 3%-5% BSA  
5% 脱脂牛奶

摇床，室温 1 -2h，或者4°C孵育过夜。

一般磷酸化蛋白不用脱脂奶粉封闭，而选用  
3%—5% BSA。

配制好的封闭液加入到容器中。  
用镊子将膜放入封闭液，使转  
有蛋白的一面朝上。



将PVDF膜取出放入预先配制好的脱脂牛奶(3%~5%)

## 第三部分 主要步骤

### 一抗孵育

一抗用封闭液稀释至适当浓度，膜与一抗稀释液  
加入孵育盒

摇床，室温孵育1-2h或4°C，过夜

TBST洗膜，10min/次，共3次

一抗的选择：

- 合乎你抗原的应用种属
- 方法上适于做 western blot

## 第三部分 主要步骤

### 二抗孵育

二抗用封闭液稀释至适当浓度，膜与二抗稀释液  
加入孵育盒

摇床，室温孵育1h

TBST洗膜，10min/次，共3次

- 二抗的选择根据一抗的种属来源，如：一抗是兔抗大鼠，则二抗应选择抗兔的抗体。
- 二抗要有酶标记。

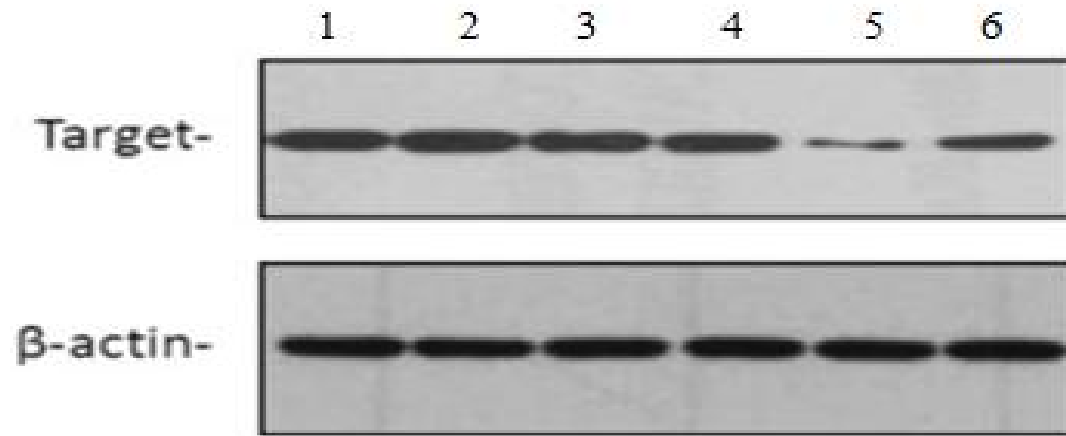


## 第三部分 主要步骤

### 底物显色

#### 一般用ECL发光法

**辣根过氧化物酶HRP标记二抗，加入底物发光：**将两种显色底物1：1等体积混合后将其覆盖在膜表面使其均匀，化学发光成像仪检测发光信号。



## 第四部分 注意事项

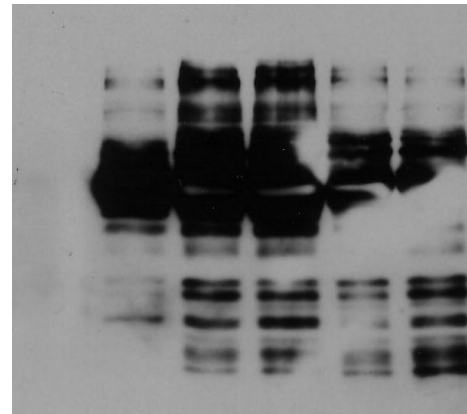
---

- 插入样品梳要倾斜缓慢插入以减少气泡的产生并防止液体溅出。
- 剪滤纸和膜时一定要戴手套，因为手上的蛋白会污染膜。
- 滤纸、胶、膜之间千万不能有气泡，气泡会造成短路。
- 确定转印夹黑色面对应于黑色电极。

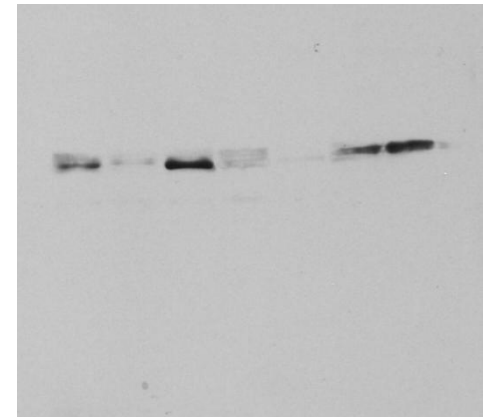
# 第五部分 常见问题及原因

非特异性条带	可能的原因
	抗体浓度太高
	曝光时间太长
	抗原浓度太高
底物太灵敏	

非特异性条带

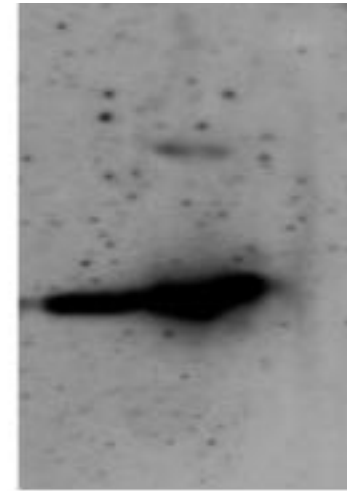


正常结果



# 第五部分 常见问题及原因

高背景	可能的原因
	蛋白浓度过高
	膜的污染
	漂洗不完全
	封闭液不适合
	封闭不完全
	抗体浓度过高
	曝光时间过长



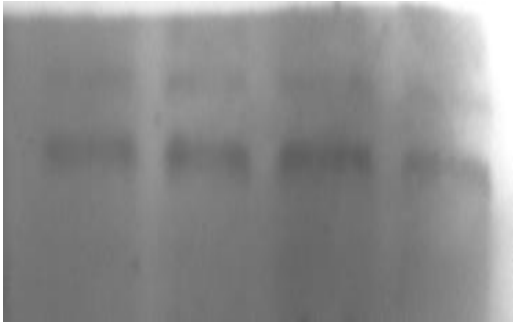
高背景



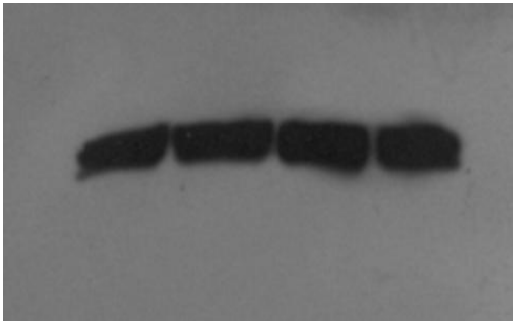
正常结果

# 第五部分 常见问题及原因

信号弱	可能的原因
	蛋白量不足
	蛋白质储存过程中降解
	转膜不完全
	抗体浓度低
	底物反应时间短



信号弱



正常结果

## 第五部分 常见问题及原因

微笑条带	可能的原因
	凝胶不均匀
	胶板底部有气泡
	样品盐浓度过高
	上样孔弯曲



微笑条带



正常结果