



# 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

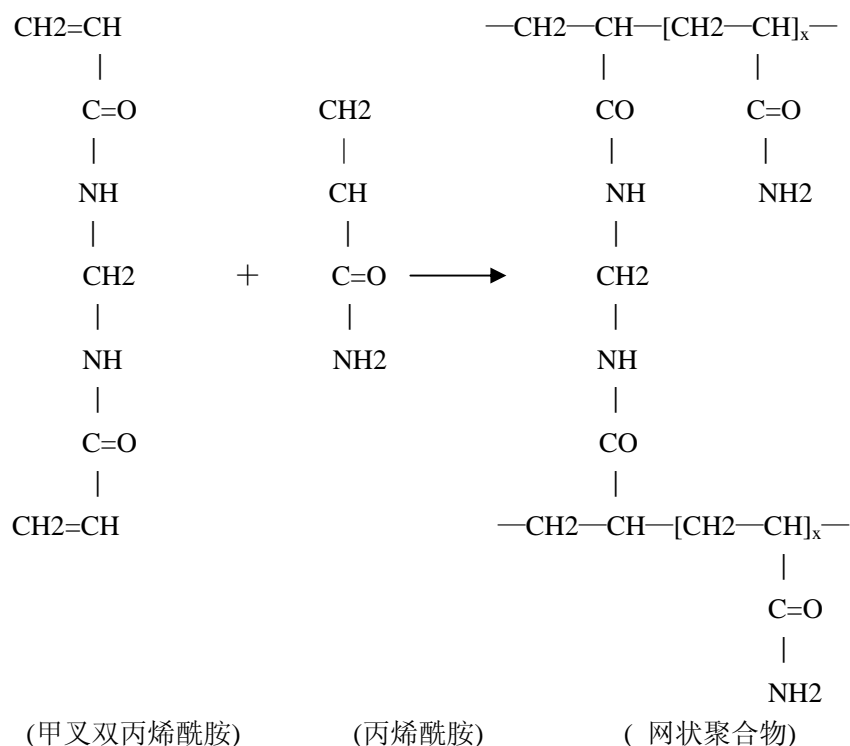
### 第一部分: SDS-PAGE 电泳

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  $\beta$ -巯基乙醇的上缓冲液。SDS 即十二烷基磺酸钠 ( $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CH}_2\text{SO}_3^- \text{Na}^+$ ), 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;  $\beta$ -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  $\text{Cl}^-$  解离度大,  $\text{Pro}^-$  解离度居中, 甘 aaCOO $^-$  解离度小, 迁移顺序为 (PH6.8)  $\text{Cl}^- > \text{Pro}^- > -\text{COO}^-$ 。在  $\text{Cl}^-$  与  $\text{Pro}^-$  之间和  $\text{Pro}^-$

与 $\text{COO}^-$ 之间都将出现低离子区,同时也出现高电势,高电势迫使 $\text{Pro}^-$ 向 $\text{Cl}^-$ 迁移, $\text{COO}^-$ 向 $\text{Pro}^-$ 迁移。如:一个 $\text{Cl}^-$ 领路, $\text{COO}^-$ 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, $\text{Pro}^-$ 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 $\text{Pro}^-$ , $\text{Cl}^-$ ,甘 aa 离子在 PH8.8 的溶液中, $\text{Cl}^-$ 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 $\text{Pro}^-$ 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

### NC膜的预处理：

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）

### PVDF膜及滤纸的预处理：

剪裁与胶大小一致的膜泡入甲醇中，约1-2分钟。

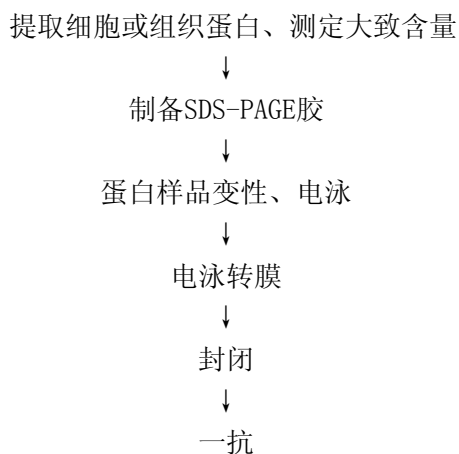
膜的选择：印迹中常用的固相材料有NC膜、DBM、DDT、尼龙膜、PVDF等。我们选用PVDF（聚偏二氟乙烯），其具有更好的蛋白吸附、物理强度，以及具有更好的化学兼容性。

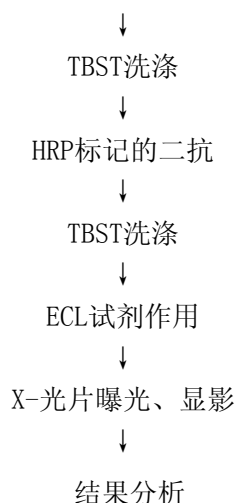
有两种规格：Immobilon-P（0.45um）和Immobilon-PSQ（0.2um for MW<20kDa）。

电流1mA-2mA/cm<sup>2</sup>，我们通常200mA/膜，按照目的蛋白分子大小、胶浓度选择转移时间，具体可以根据实际适当调整。

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

### 基本操作流程：





蛋白质印迹法首先是要将电泳后分离的蛋白质从凝胶中转移到硝酸纤维素膜上，通常有两种方法：毛细管印迹法和电泳印迹法。毛细管印迹法是将凝胶放在缓冲液浸湿的滤纸上，在凝胶上放一片硝酸纤维素膜，再在上面放一层滤纸等吸水物质并用重物压好，缓冲液就会通过毛细作用流过凝胶。缓冲液通过凝胶时会把蛋白质带到硝酸纤维素膜上，硝酸纤维素膜可以与蛋白质通过疏水相互作用产生不可逆的结合。这个过程持续过夜，就可以将凝胶中的蛋白质转移到硝酸纤维素膜上。但这种方法转移的效率较低，通常只能转移凝胶中一小部分蛋白质（10%~20%）。电泳印迹可以更快更有效地进行转移。这种方法是用有孔的塑料和有机玻璃板将凝胶和硝酸纤维素膜夹成“三明治”形状，而后浸入两个平行电极中间的缓冲液中进行电泳，选择适当的电泳方向就可以使蛋白质离开凝胶结合在硝酸纤维素膜上。

转移后的硝酸纤维素膜就称为一个印迹 (blot)，用于对蛋白质的进一步检测。印迹首先用蛋白溶液（如 10% 的 BSA）处理以封闭硝酸纤维素膜上剩余的疏水结合位点，而后用所要研究的蛋白质的抗血清（一抗）处理，印迹中只有待研究的蛋白质与一抗结合，而其它蛋白质不与一抗结合，这样清洗去除未结合的一抗后，印迹中只有待研究的蛋白质的位置上结合着一抗。处理过的印迹进一步用适当标记的二抗处理，二抗是指一抗的抗体，如一抗是从鼠中获得的，则二抗是抗鼠 Ig G 的抗体。处理后，带有标记的二抗与一抗结合，可以指示一抗的位置，即是待研究的蛋白质的位置。目前有结合各种标记物的抗特定 Ig G 的抗体可以直接购买作为标记的二抗。最常用的一种是酶连的二抗，印迹用酶连二抗处理后，再用适当的底物溶液处理，当酶催化底物生成有颜色的产物时，就会产生可见的区带，指示所要研究的蛋白质的位置。在酶连抗体中使用的酶通常是碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶。碱性磷

酸酶可以将无色的底物 5-溴-4-氯吲哚磷酸盐 (BCIP) 转化为蓝色的产物；而辣根过氧化物酶可以以 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 为底物，将 3-氨基-9-乙基吖唑氧化成褐色产物或将 4-氯萘酚氧化成蓝色产物。另一种检测辣根过氧化物酶的方法是用增强化学发光法，辣根过氧化物酶在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 存在下，氧化化学发光物质鲁米诺 (luminol, 氨基苯二酰一胍) 并发光，在化学增强剂存在下光强度可以增大 1000 倍，通过将印迹放在照相底片上感光就可以检测辣根过氧化物酶的存在。除了酶连二抗作为指示剂，也可以使用其它指示剂，主要包括以下一些：

I125 标记的二抗：可以通过放射性自显影检测。

荧光素异硫氰酸盐标记的二抗：可以通过在紫外灯下产生荧光来检测。

I125 标记金黄色葡萄球菌蛋白 A (Protein A)：Protein A 可以与 Ig G 的 Fc 区特异性的结合，因此 Protein A 可以代替二抗：I125 标记的 Protein A 通过放射性自显影检测。

金标记的二抗：二抗通过微小的金颗粒包裹，与一抗结合时可以表现红色。

生物素结合的二抗：印迹用生物素结合的二抗处理后，再用碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶标记的凝集素处理。生物素可以与凝集素紧密结合，这种方法实际上相当于通过生物素与凝集素的紧密结合将二抗与酶连接，通过酶的显色反应就可以进行检测。这种方法的优点是生物素是一个小分子蛋白，一个抗体上可以结合多个生物素，也就可以结合多个酶连接的凝集素，可以大大增强显色反应的信号。

除了使用抗体或蛋白作为检测特定蛋白的探针以外，有时也使用其它探针如放射性标记的 DNA，可以检测印迹中的 DNA 结合蛋白。

## [主要试剂]

1、SDS-PAGE 试剂：

2、匀浆缓冲液：1.0M Tris-HCl (pH 6.8) 1.0ml；10%SDS 6.0ml； $\beta$ -巯基乙醇 0.2ml；ddH<sub>2</sub>O 2.8ml。

3、转膜缓冲液：甘氨酸 2.9g；Tris 5.8g；SDS 0.37g；甲醇 200ml；加 ddH<sub>2</sub>O 定容至 1000ml。

4、0.01M PBS (pH7.4)：NaCl 8.0g；KCl 0.2g；Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.44g；KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24g；加 ddH<sub>2</sub>O 至 1000ml。

5、膜染色液：考马斯亮兰 0.2g；甲醇 80ml；乙酸 2ml；ddH<sub>2</sub>O 118 ml。包被液 (5%脱脂奶粉，现配)：脱脂奶粉 1.0g 溶于 20ml 的 0.01M PBS 中。

6、显色液：DAB 6.0mg；0.01M PBS 10.0ml；硫酸镍胺 0.1ml；H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1.0  $\mu$ l。

7、兔抗猪 R 蛋白抗体、HRP 标记羊抗兔 IgG (二抗)。

## [操作步骤]

1、蛋白质样品获得：细菌诱导表达后，可通过电泳上样缓冲液直接裂解细胞，真核细胞加匀浆缓冲液，机械或超声波室温匀浆 0.5-1min。然后 4℃，13,000g 离心 15min。取上

清液作为样品。

2、电泳：制备电泳凝胶，进行 SDS-PAGE。

3、转移（半干式转移）：

(1) 电泳结束后将胶条割至合适大小，用转膜缓冲液平衡，5min×3次。

(2) 膜处理：预先裁好与胶条同样大小的滤纸和 NC 膜，浸入转膜缓冲液中 10min。

(3) 转膜：转膜装置从下至上依次按阳极碳板、24 层滤纸、NC 膜、凝胶、24 层滤纸、阴极碳板的顺序放好，滤纸、凝胶、NC 膜精确对齐，每一步去除气泡，上压 500g 重物，将碳板上多余的液体吸干。接通电源，恒流 1mA/cm<sup>2</sup>，转移 1.5hr。转移结束后，断开电源将膜取出，割取待测膜条做免疫印迹。将有蛋白标准的条带染色，放入膜染色液中 50s 后，在 50% 甲醇中多次脱色，至背景清晰，然后用双蒸水洗，风干夹于两层滤纸中保存，留与显色结果作对比。

4、免疫反应：

(1) 用 0.01M PBS 洗膜，5min ×3 次。

(2) 加入包被液，平稳摇动，室温 2hr。

(3) 弃包被液，用 0.01M PBS 洗膜，5min×3 次。

(4) 加入一抗（按合适稀释比例用 0.01M PBS 稀释，液体必须覆盖膜的全部），4℃ 放置 12hr 以上。阴性对照，以 1%BSA 取代一抗，其余步骤与实验组相同。

(5) 弃一抗和 1%BSA，用 0.01M PBS 分别洗膜，5min×4 次。

(6) 加入辣根过氧化物酶偶联的二抗（按合适稀释比例用 0.01M PBS 稀释），平稳摇动，室温 2hr。

(7) 弃二抗，用 0.01M PBS 洗膜，5min×4 次。

(8) 加入显色液，避光显色至出现条带时放入双蒸水中终止反应。

### [注意事项]

1、一抗、二抗的稀释度、作用时间和温度对不同的蛋白要经过预实验确定最佳条件。

2、显色液必须新鲜配置使用，最后加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。

3、DAB 有致癌的潜在可能，操作时要小心仔细。

### Buffers for Western blot

4x Resolving gel buffer: 1000ml

182g Tris-base (= 3 M)

Adjust pH to 8.8 with concentrated HCl

4g SDS (add last)

4x Stacking gel buffer: 100 ml

6.05 g Trise base (= 0.5 M)

Adjust pH to 6.8

0.4 g SDS (add last)

1xSample buffer:

50mM Tris-Cl pH 6.8

2%	SDS
10%	glycerol
0.02%	Bromophenol blue
0.7%	2-mercaptoethanol

## Running buffer:

Tris-base	3.g
glycine	14.4g
10%SDS	10ml

add ddH<sub>2</sub>O to 1000ml, Do not adjust the pH!!

## Transfer buffer:

Tris-base	3.g
Glycine	14.4g
methanol	200ml

add ddH<sub>2</sub>O to 1000ml, Do not adjust the pH!!

## TBST buffer:

20mM	Tris-Cl	pH 7.4
0.15M	NaCl	
10%Tween-20	1~5ml	

add ddH<sub>2</sub>O to 1000ml, Do not adjust the pH!!

## Western Blot 全套技术服务

印迹(immunoblotting)又称蛋白质印迹(western blot),它是根据抗原抗体的特异性结合检测复杂样品中的某种蛋白的方法。western blot 是在凝胶电泳和固相免疫测定技术基础上发展起来的一种新的免疫生化技术。由于免疫印迹(western blot)具有 SDS-PAGE 的高分辨力和固相免疫测定的高特异性和敏感性,现已成为蛋白分析的一种常规技术。免疫印迹(western blot)常用于鉴定某种蛋白,并能对蛋白进行定性和半定量分析。

闪晶生物为您提供全套免疫印迹(western blot)技术服务和相关的试剂耗材。主要实验步骤如下:

### • 蛋白质抽提

- 实验对象为组织样品,取适量(250~500mg)新鲜组织样品或正确保存的组织样品,加 1ml 含蛋白酶抑制剂的总蛋白抽提试剂(或核蛋白抽提试剂),匀浆后抽提总蛋白(或核蛋白)。
- 实验对象为细胞样品,每份样品取  $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$  细胞, PBS 清洗细胞,去 PBS 加 0.1ml~1ml 含蛋白酶抑制剂的总蛋白抽提试剂(或核蛋白抽提试剂)抽提总蛋白(或核蛋白)。

2. **蛋白质定量:**按 BCA 蛋白质定量试剂盒操作说明操作,测定样品浓度。

3. **变性聚丙烯酰胺不连续凝胶电泳(SDS-PAGE):**将准备好的样品液和预染蛋白 marker 分别上样,标准加进第一个孔中,电泳分离蛋白。

4. 蛋白质转移到 PVDF 膜,按 Bio-Rad 蛋白转移装置说明组装滤纸凝胶纤维素夹层,30mA 恒流条件下,4° C 转移过夜。

5. western blot 膜的封闭和抗体孵育

- 膜在 5% 脱脂奶粉溶液中室温孵育 1 小时以封闭膜上的非特异结合。
- 封闭过的膜加入一抗室温孵育 1.5 小时,抗原抗体结合。
- 加入 HRP 标记的二抗体以结合一抗,室温孵育膜 1 小时。加入 HRP 标记的 GAPDH 抗体可同时检测 GAPDH 含量。

6. western blot 结果检测:化学发光法检测,膜与化学发光底物孵育,经 X 胶片曝光显影。图片扫描保存为电脑文件,并用 GIS1000 分析软件将图片上每个特异条带灰度值的数字化。

7. western blot 数据分析:目的蛋白的灰度值除以内参 GAPDH 的灰度值以校正误差,所得结果代表某样品的目的蛋白相对含量。

8. 提供实验报告,包括详细的实验方法及免疫印迹实验结果的相关数据。

**western blot 费用:**每张膜上做一种目的蛋白和相应的内参蛋白。每张膜上可以做 8 个样品。每张膜的费用是:1500.00 元。一抗另计,其它试剂免费,一抗订购时间约为 3 周。乘车路线:火车站坐 1 号地铁到终点站,然后换 5 号地铁坐到北桥站即可。

时间:约 2—3 周。

联系:master@shinegene.org.cn shinegene@vip.163.com 电话:021-54460831-11



## Western Blot 相关试剂

产 品 名 称	包 装	单 价(RMB)
Trypsin-EDTA	0.25%, 100ml	150.00
蛋白裂解液(蛋白提取液)	10ml	60.00
PMSF	100mM 10ml	86.00
40% Acr/Bis (37.5:1)	100ml	100.00
40% Acr/Bis (29:1)	100ml	100.00
40% Acr/Bis (19:1)	100ml	100.00
SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液	2x, 1ml	28.00
SDS-PAGE 电泳缓冲液	10x, 500ml	100.00
蛋白胶快速染色液	100ml	120.00
蛋白转移缓冲液	10x, 500ml	100.00
可逆型转移膜染色液	100ml	120.00
Tris-HCl Buffer, PH6.8(配浓缩胶)	0.5M, 250ml	100.00
Tris-HCl Buffer, PH8.8(配分离胶)	1.5M, 250ml	100.00
PBS buffer	20x, 500ml	100.00
PBST buffer	20x, 500ml	100.00
TBST buffer	20x, 500ml	100.00
TBS buffer	20x, 500ml	100.00
SDS	10%, 100ml	100.00
洗脱抗体缓冲液(膜再生液)	100ml	100.00
二抗-HRP	0.2mg	175.00
预染 Marker (20~120kDa)	250ul	200.00
<a href="#">ECL 化学发光试剂</a>	25ml	200.00
显影液	250ml	45.00
定影液	250ml	45.00
硝酸纤维素膜 NC 膜	15cm*20cm	60.00
PVDF 膜	13.5cm*15cm	80.00
3MM 滤纸	27cm*1M	40.00
X 线暗盒	5*7int.	600.00
柯达 X 光胶片	5*7int. 100/pk	200.00
乳胶手套	100/pk	65.00

PE 薄膜手套	100/pk	5.00
---------	--------	------



## 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：54460832 800-988-1995

E-mail:master@shinegene.org.cn

网址：www.synthesigene.com

