



免疫印迹 western blot



培训人：马芳
2018年5月27日

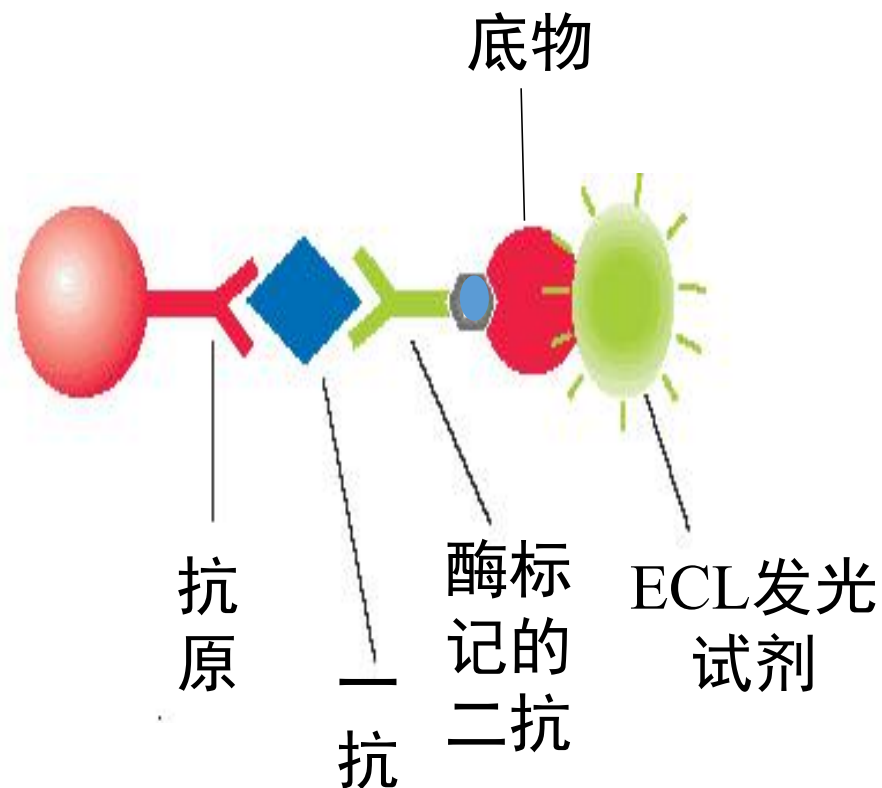
目录

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

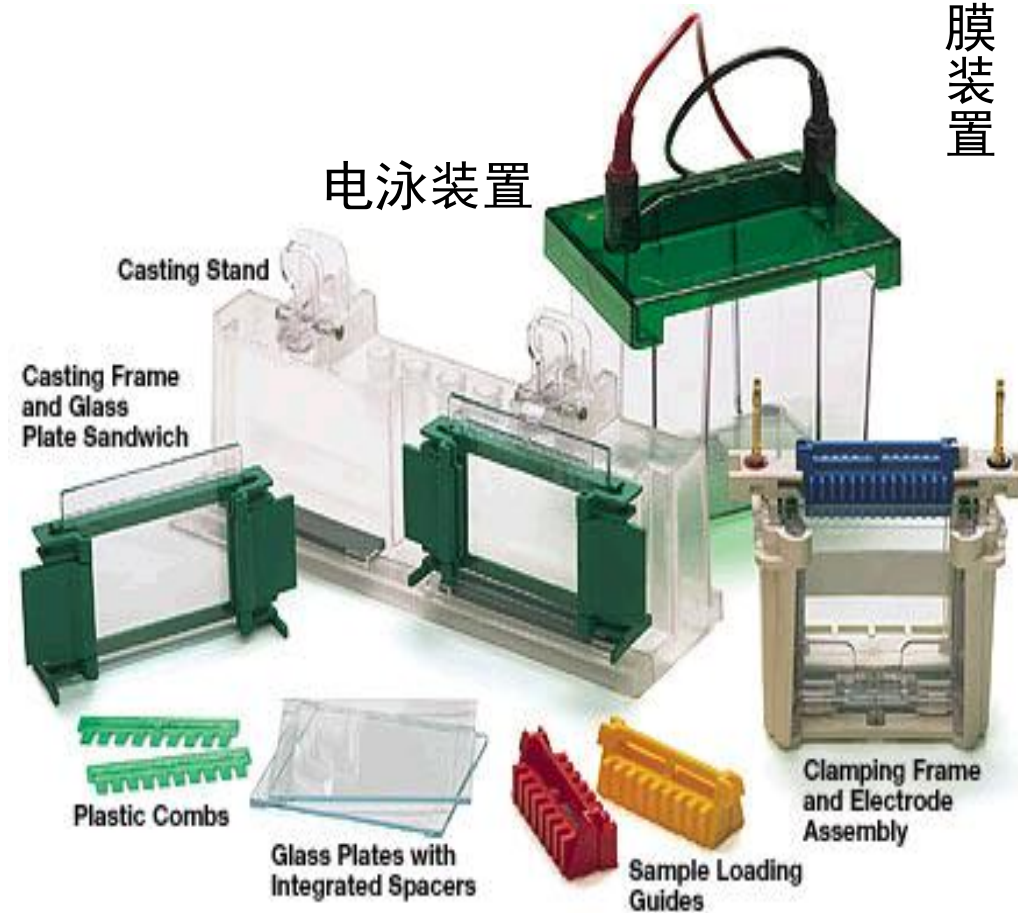
一抗

二抗

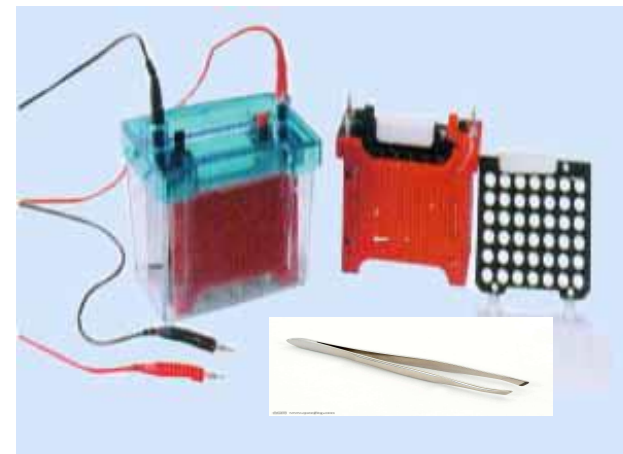
显色液

PVDF膜

中心可提供如下设备：

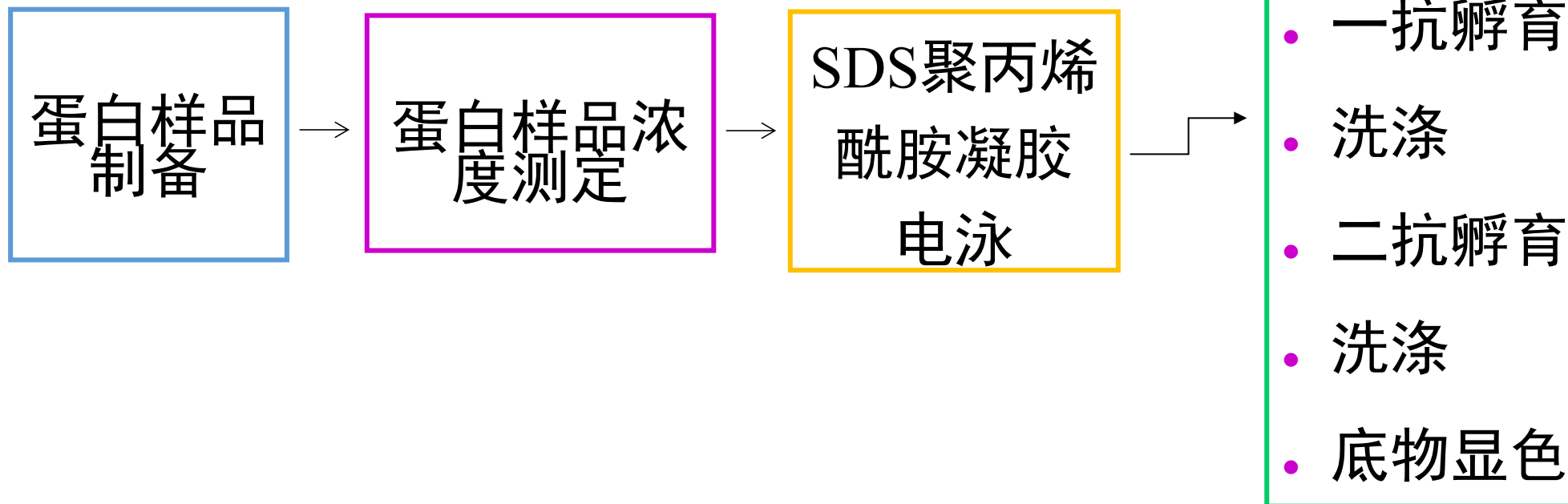


转膜装置



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 μ 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 ²⁺ 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 ²⁺ 络合并将Cu ²⁺ 还原成Cu ⁺
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

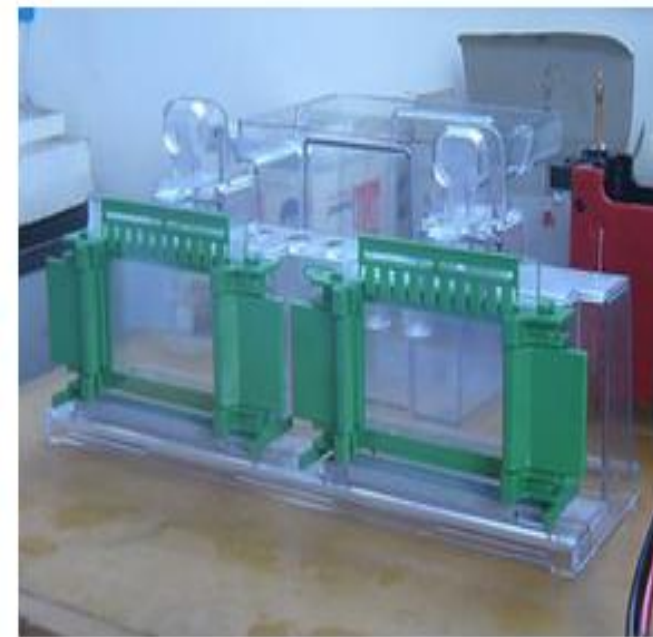
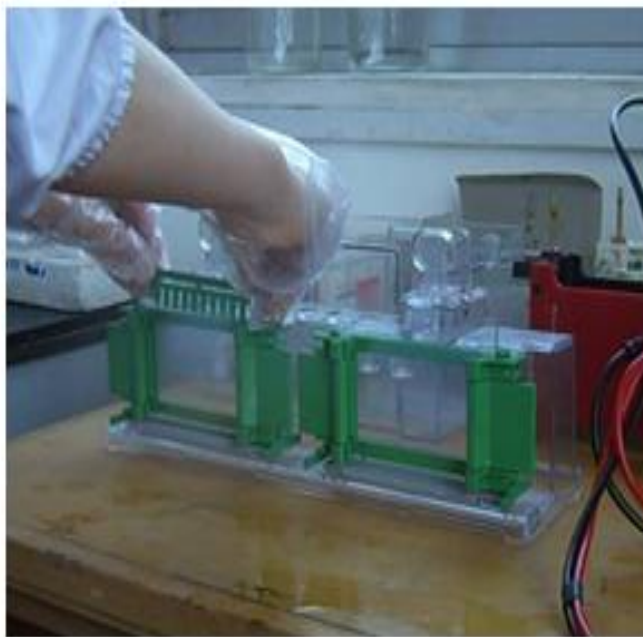
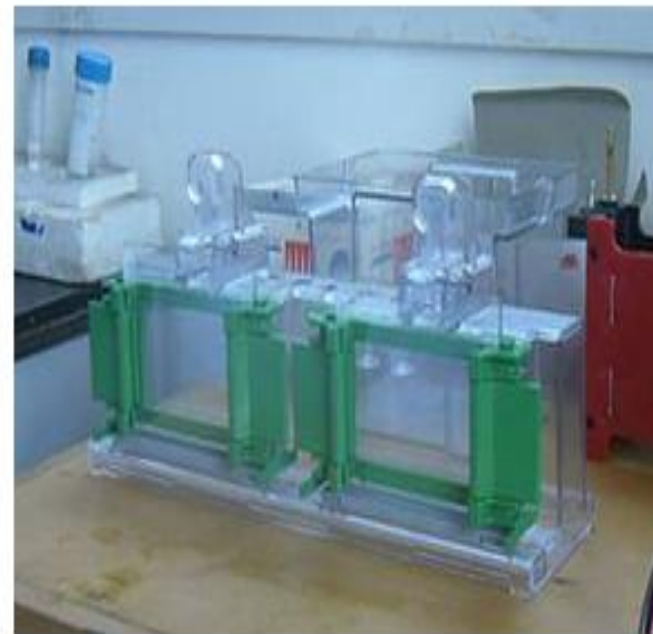
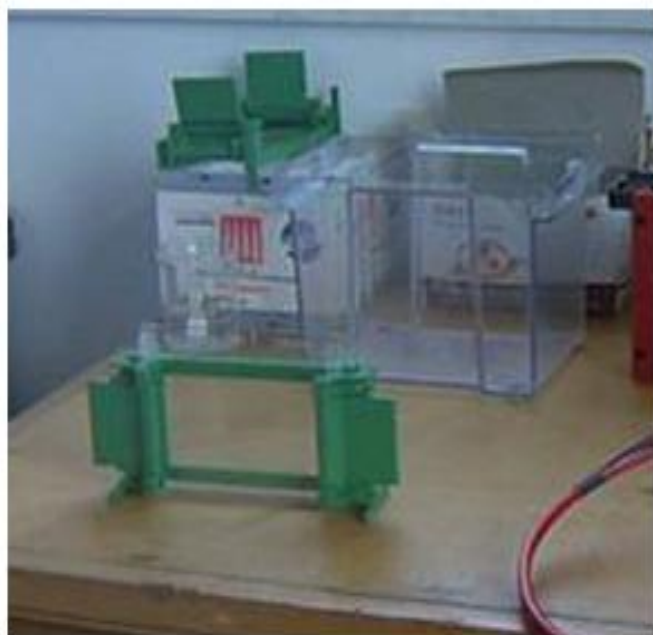
制浓缩胶，1h凝固

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 ₂ 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 μ l

将混合液迅速加入玻璃板间隙，预留1.5cm加入异丙醇

4%的浓缩胶

总体积 2ml

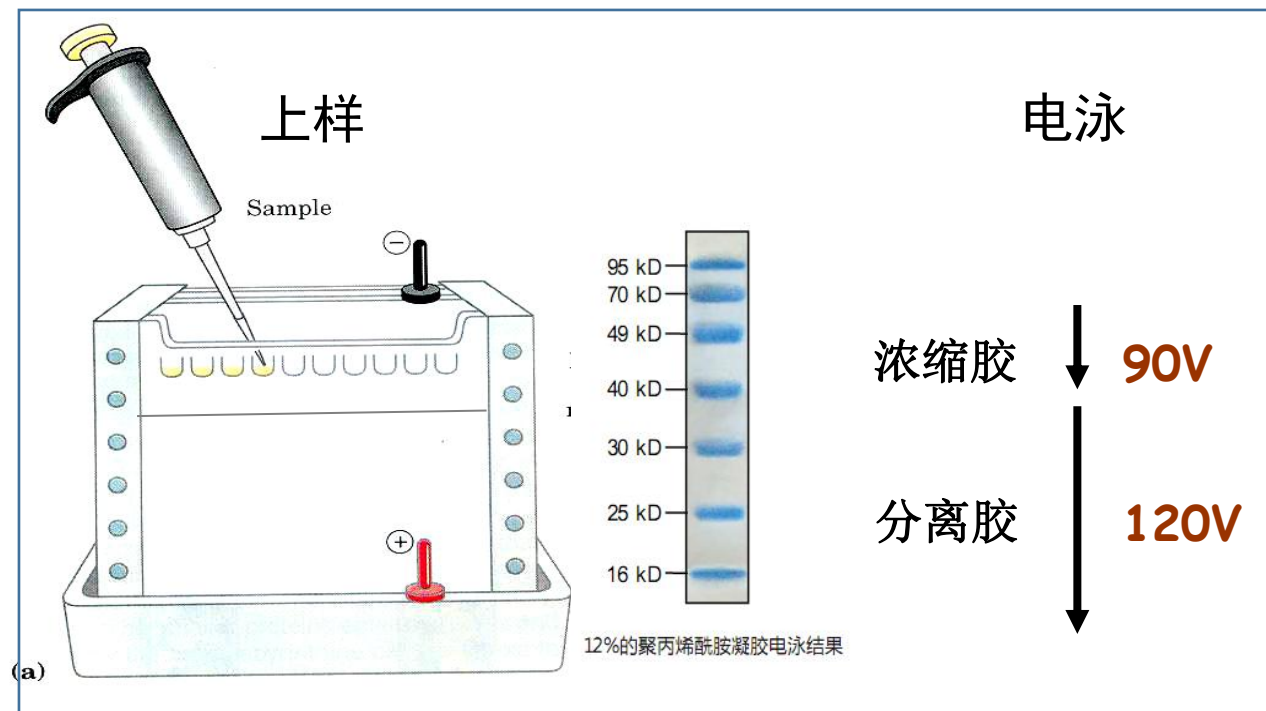
ddH ₂ O	1.4 ml
30%Acr-Bis	0.33 ml
1M Tris-HCl (pH 6.8)	0.25 ml
10%SDS	0.02 ml
10%AP	0.02 ml
TEMED	2 μ l

将混合液迅速加入玻璃板间隙，并立即插入梳子

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

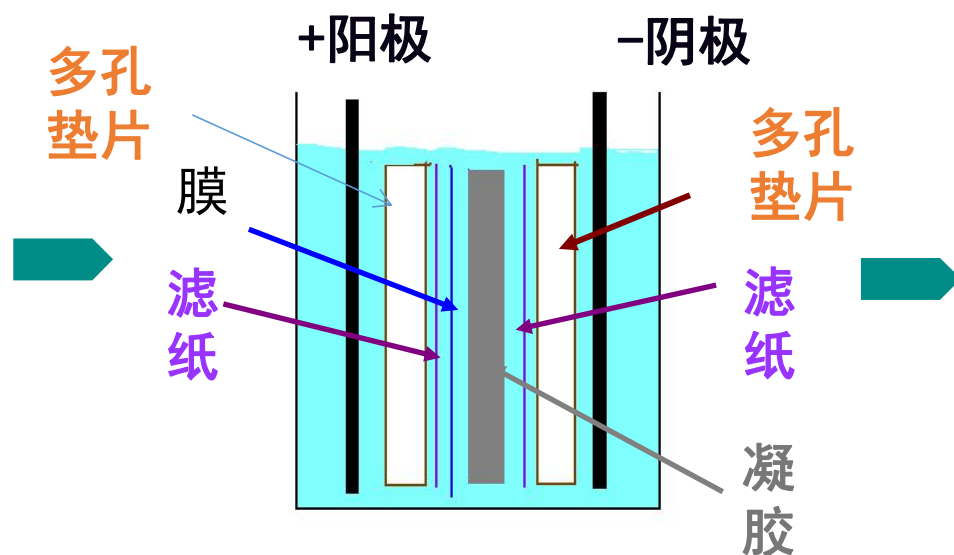


第三部分 主要步骤

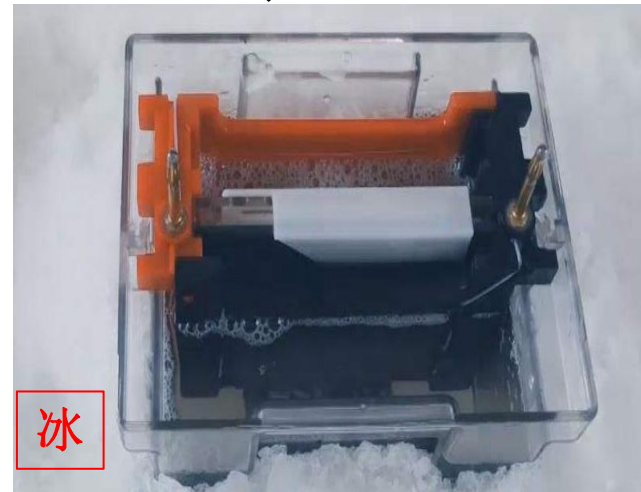
转膜

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。

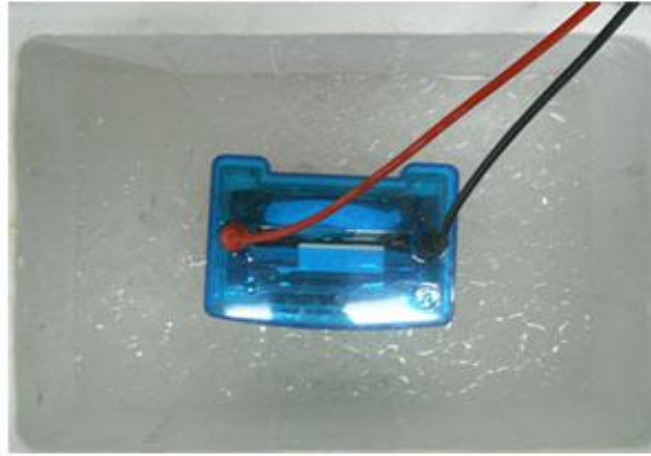
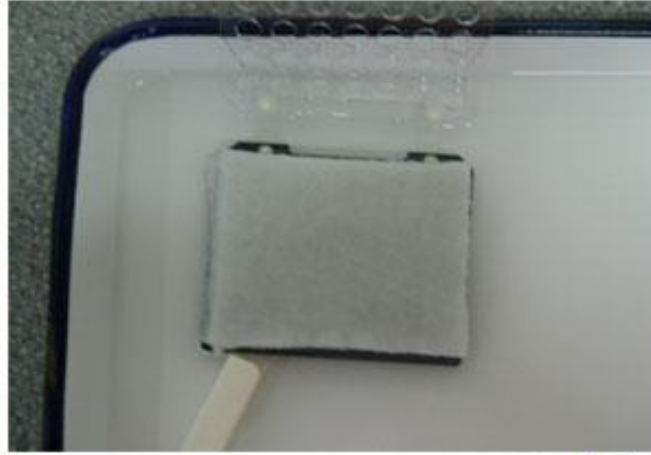
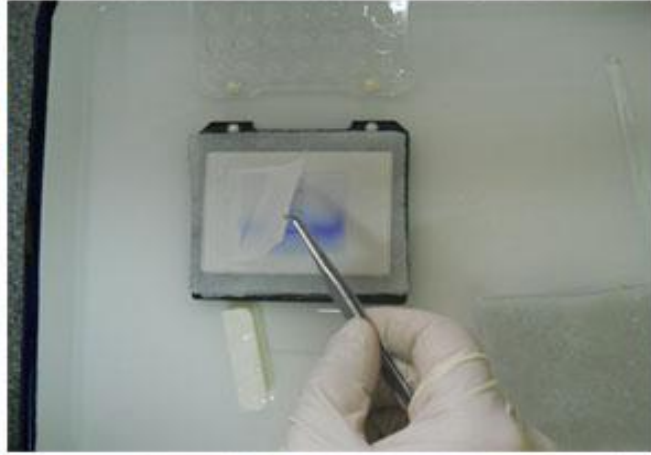
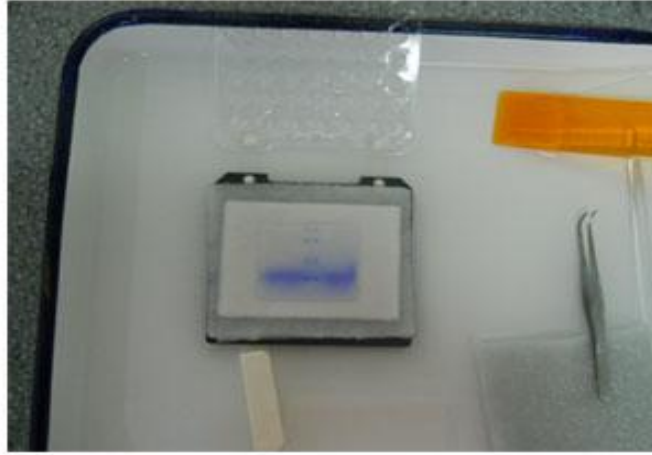
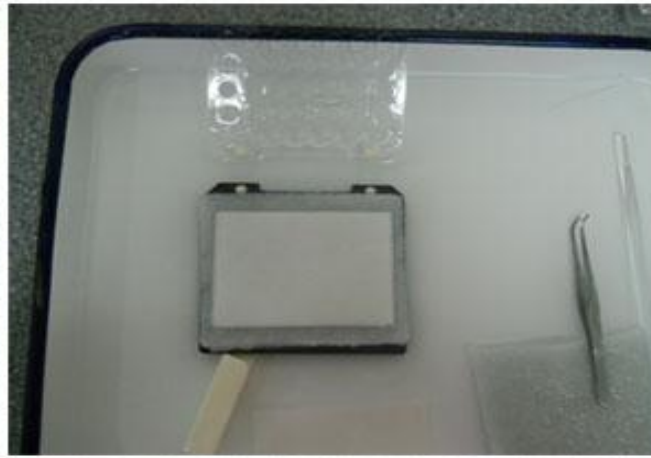
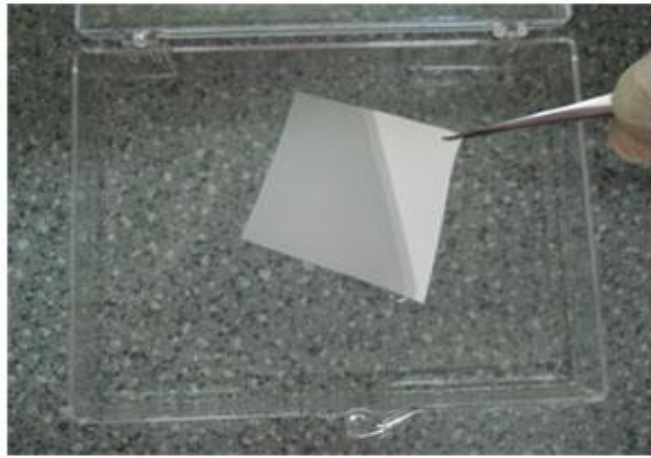
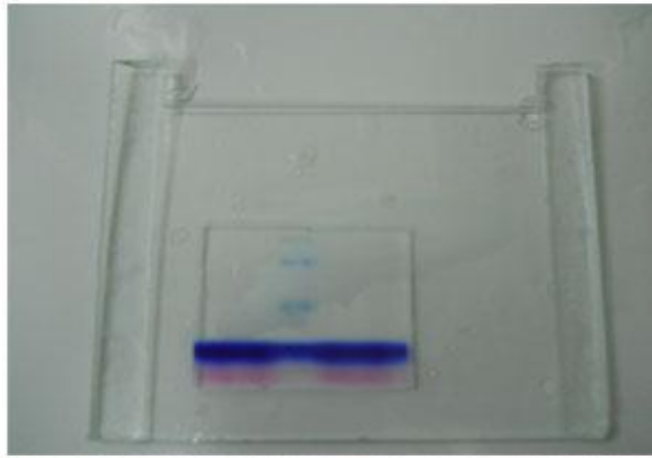
PVDF膜用甲醇浸泡5s



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/cm2	125-200ug/cm2 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℃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。



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

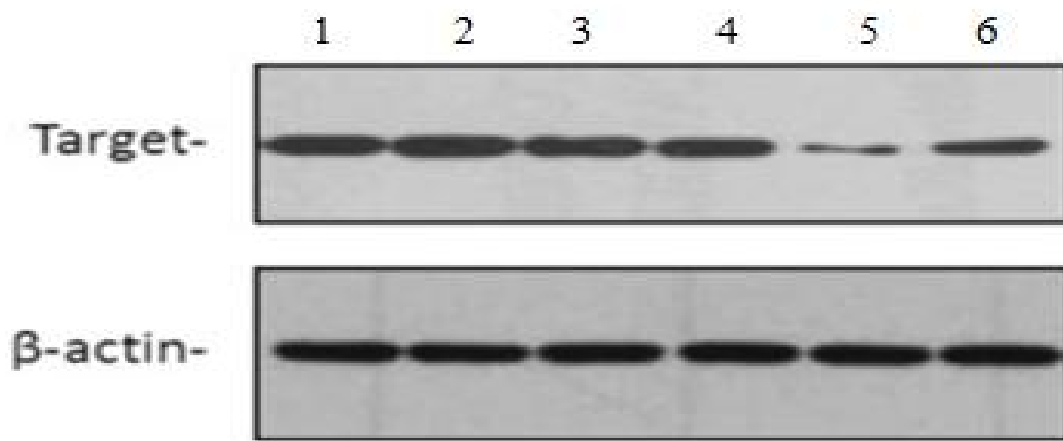
- 二抗的选择根据一抗的种属来源，如：一抗是兔抗大鼠，则二抗应选择抗兔的抗体。
- 二抗要有酶标记。

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。



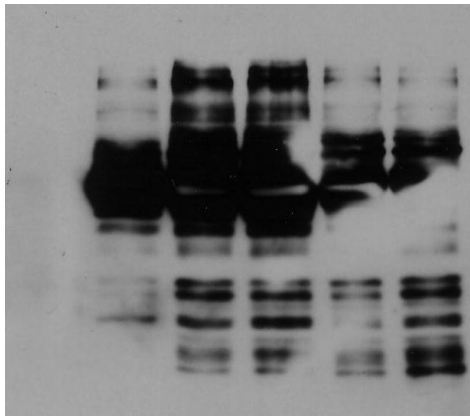
第四部分 注意事项

- 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。

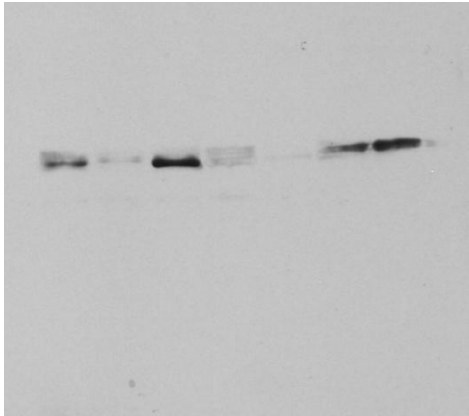
第五部分 常见问题及原因

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

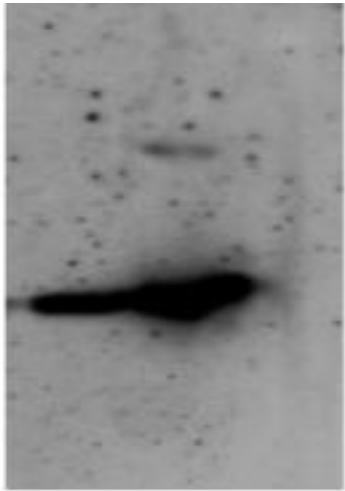


正常结果



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



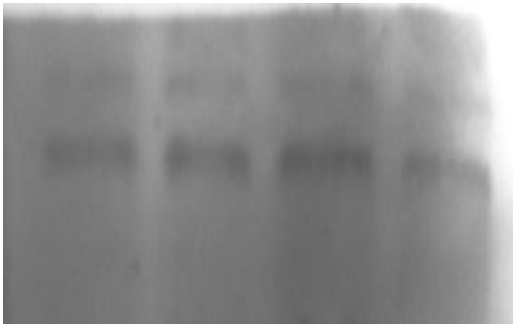
高背景



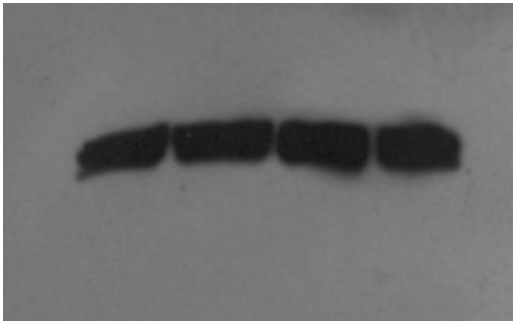
正常结果

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