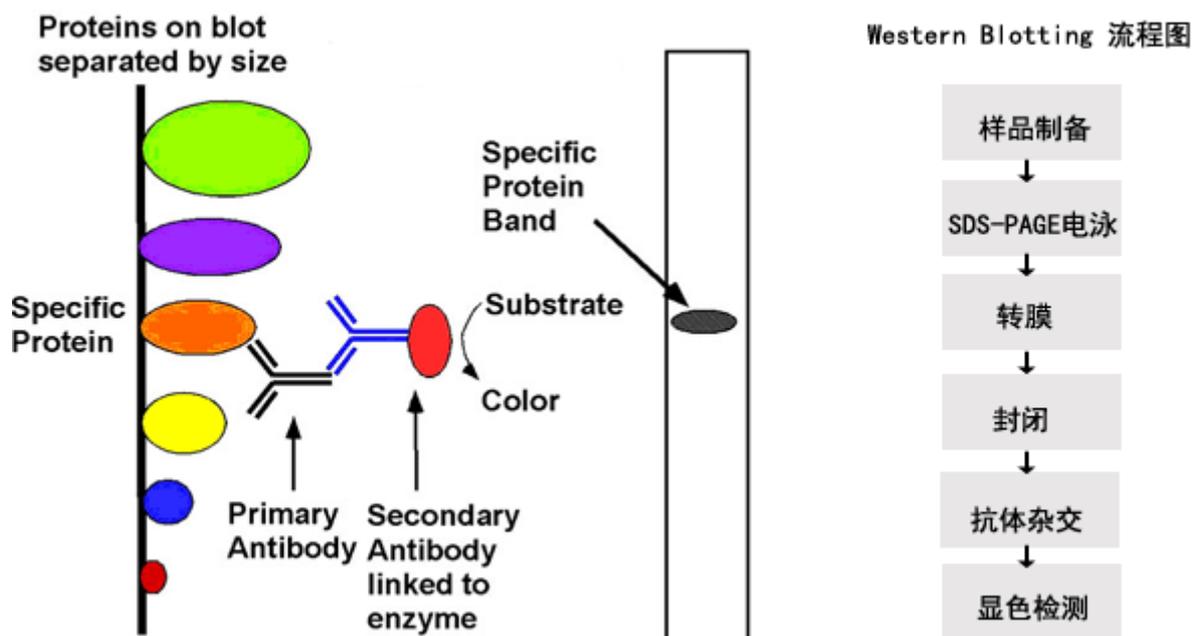


Western Blotting 实验指南

- Western Blotting 实验原理及应用
- Western Blotting 检测操作手册
- Western Blotting Q&A
- Troubleshooting for Western Blotting

Western Blotting 实验原理及应用

免疫印迹是一个用于蛋白质分析的常规技术，在电场的作用下将电泳分离的蛋白从凝胶转移至一种固相支持物，然后利用抗原-抗体的特异性反应，从蛋白混合物中检测出目标蛋白，从而定量或定性的确定正常或实验条件下细胞或组织中目标蛋白的表达情况。Western blotting 还可用于蛋白-蛋白、蛋白-DNA 和蛋白-RNA 相互作用的后续分析，作为一种廉价、便捷、可靠的研究工具，将与质谱和蛋白质芯片等技术一起在蛋白质组时代发挥重要作用。



Western Blotting 的 protocol 种类繁多，但大同小异，基本为上述几个步骤。要得到一个完美的实验结果，不仅需要优质的抗体，同时应对整个实验流程和体系进行严格的质量控制，才能最终达到你的实验目的。影响免疫印迹成败的一个主要因素是抗原分子中可被抗体识别的表位性质。因为涉及到抗原样品的变性，只有那些识别变性表位的抗体可以与抗原结合。多数多克隆抗体中或多或少含有这种类型的抗体，所以在免疫印迹中常选用多克隆抗体。第二个影响因素是蛋白原液中抗原的浓度。一些表达量低的蛋白在免疫印迹前常需要通过免疫沉淀，亚细胞分离等手段富集。

Western Blotting 检测操作手册

一. 实验器材：

1. 实验器具：电泳仪、转膜仪、移液枪，摇床，暗盒，杂交盒，50 ml 离心管，2/4 ml EP 管
2. 实验试剂：1×电泳缓冲液，蛋白样品，蛋白预染 marker，2×loading buffer，1%丽春红，1×PBST(含 0.1% 的 Tween-20) 5%脱脂牛奶(溶于 1×PBST) 75%酒精，甲醇，转膜液(Tris-甘氨酸 PH8.0)

二. 实验步骤：

1. **制胶：** 按照分子克隆上面的配方，依据实验验证蛋白的分子量大小选择制备相应浓度的 SDS-PAGE 胶
2. **蛋白样品预处理：** 已经融化的待检测蛋白样品等体积加入 2×loading buffer，100℃，5 min(注意：如果是膜蛋白裂解液，不可进行高温加热操作，置于 37℃培养箱中，温浴 30 min。)将加热完毕的样品在室温平衡 1-2 min，加热后的样品涡旋混匀 30s，然后进行离心，在高速离心机上 10000 rpm 2 分钟。按顺序放置在架子上待用。
3. **上样：** 从4℃取出蛋白预染marker，待溶解后，按照实验需要和顺序上样(样品上样量：以过表达WB实验为例，蛋白样品浓度>1mg/ml，20 μl/孔)。每块胶上样完毕后需用2×loading补齐marker和空白的胶孔(marker胶孔内补5 μl，空白胶孔内补上和左右孔相同体积2×loading)，
4. **电泳：** 开始设置为恒压150 V(大约电流为300mA)。待前沿(溴酚蓝)进入分离胶1cm左右，将电压调高到180 V，根据实验验证的蛋白大小控制电泳时间。
5. **膜的活化：** 将膜放在甲醇中，放置2 min。
6. **转膜：** 本实验采用天能湿转转膜仪300mA恒流转移1h(客户也可根据自身蛋白大小和实验需要设置转膜电压/电流和转膜时间)
7. **丽春红预染：** 将已转上蛋白的PVDF膜，用1%的丽春红，预染2min，以显示转膜结果。
8. **洗膜：** 在杂交盒里倒上1×PBST溶液，将适当大小的PVDF膜放入杂交盒中，在摇床上80 rpm，5 min洗膜。然后关闭摇床，倒去1×PBST，加入甲醇，40 rpm，活化5 min。然后倒出甲醇溶液，先用1×PBST润洗一下，再用1×PBST洗3次。每次80 rpm，5 min。
9. **封闭：** 在杂交盒里倒上1×PBST溶液，将由丽春红预染的PVDF膜，在摇床上80 rpm，5 min洗膜(洗去丽春红)再换新的1×PBST洗3次。每次80 rpm，5 min。随后倒掉1×PBST，在杂交盒中用5%脱脂牛奶，水平摇床上40 rpm 室温封闭1 h。
10. **一抗稀释：** 按照实验要求用5%脱脂牛奶稀释一抗。
11. **膜的活化：** 在杂交盒里倒上1×PBST溶液，将适当大小的PVDF膜放入杂交盒中，在摇床上80 rpm，5 min洗膜。然后关闭摇床，倒去1×PBST，加入甲醇，40 rpm，活化5 min。然后倒出甲醇溶液，先用1×PBST润洗一下，

再用1×PBST洗3次。每次80 rpm，5 min。

12. **一抗孵育：**用微型台式真空泵或滴管等吸尽封闭液，立即加入稀释好的一抗，室温或4℃在侧摆摇床上缓慢摇动孵育一小时。如果一抗孵育一小时效果不佳，可以4℃缓慢摇动孵育过夜。或根据抗体的说明选择适当的孵育温度和时间。
13. **二抗孵育：**先用1×PBST，80 rpm，10min洗膜3次，按实验要求将稀释好的二抗加入相应的杂交盒中，在摇床上40rpm，反应30min。
14. **洗涤：**吸除剩余的二抗，换新鲜的1×PBST洗3次，每次10 min。
15. **曝光：**此过程公司选用的显色系统是GE Healthcare ECL Plus Western blotting Reagent Pack(在模式系统用胶片可检测到5pg蛋白量样品，扫描仪可检测到40pg蛋白量样品)，采取胶片手工曝光。

Western Blotting Q&A

Q：Western Blotting 一般用于什么样的实验？

A: Western blotting 是一个用于蛋白质分析的常规技术，它可以从蛋白混合物中检测出目标蛋白，从而半定量或定性(无法绝对定量)的确定正常或实验条件下细胞或组织中目标蛋白的表达情况。另外，Western blotting 还可用于蛋白-蛋白、蛋白-DNA 和蛋白-RNA 相互作用的后续分析，并结合组分分离技术，检测目标蛋白的定位情况，成为免疫荧光实验的补充。同时，在后基因组时代，随着质谱和蛋白质芯片等技术的不断完善，作为一种廉价、便捷、可靠的研究工具，Western blotting 将与其他技术一起相互配合，发挥更重要的作用。

Q：Western Blotting的实验结果如何优化？

A: Western Blotting由于实验步骤较多，每一步操作都会对最终结果产生影响。样品制备时，样品量多少非常重要，如果目标蛋白的绝对量较少，则需通过组分分离、IP等方法进行富集；上样量应适中，过多会导致信号过强，分辨率降低，过少会导致信号过弱。电泳时，应选择合适的胶浓度和电压电流参数，确保蛋白有效分离，条带清晰整齐。转膜时，应根据蛋白大小，选择合适的转膜体系及电流参数和时间，通过调整缓冲液成分，提高转膜效率及蛋白与膜的结合力。封闭时，应根据实际情况，选择合适的封闭物和缓冲液，以及封闭液浓度和封闭时间，以降低非特异性反应，达到最高的信噪比。选择抗体时，有条件的话可以尝试多种抗体(单抗、多抗，甚至可以使用多种抗体联用) 不同的稀释比例、反应温度和时间，以确定一个最佳的组合。显色时，可以尝试不同灵敏度的显色液以及信号采集系统，力争获得分辨率、对比度和区分度最佳的结果。

Q：如何较好地设置 Western Blotting 内参？

A: 内参即是内部参照，对于哺乳动物细胞表达来说一般是指由管家基因编码表达的蛋白，它们在各组织和细胞中的表达相对恒定，在检测蛋白的表达水平变化时常用它来做参照物。其作用是校正蛋白定量、上样过程中存在的实验误差，保证实验结果的准确性。在 Western-Blotting 中使用内参其实就是在 WB 过程中另外用内参对应的抗体

检测内参，这样在检测目的产物的同时可以检测内参的表达，由于内参在各组织和细胞中的表达相对恒定，借助检测每个样品内参的量就可以用于校正上样误差，这样半定量的结果才更为可信。此外使用内参可以作为空白对照，检测蛋白转膜情况是否完全、整个 Western-Blotting 显色或者发光体系是否正常。常用的蛋白内参有 GAPDH 和细胞骨架蛋白 beta-actin 或 beta-tubulin。一般要选择一个在处理因素作用的条件下蛋白含量不会发生改变的蛋白作内参。为了让实验更加严谨有更说服力都要设计对照实验，对照分为：阳性对照（最好有标准品（如 β -actin、GAPDH 或阳性血清））阴性对照（测血时用相应小鼠未免疫血清（即正常血））空白对照（不加一抗，用 PBS 代替）无关对照（用无关抗体）

Q: 我该选择什么样的抗体？

A: 由于抗体及公司种类繁多，针对同一种蛋白常常会有多种不同的抗体。首先应根据自己的实验需要（WB，IF，IP，IHC 等）进行筛选，不同实验目的的抗体有时无法通用（参照抗体说明书）其次，可以参照已发表文献中所用抗体，或向已用实验者进行征询；如果目标蛋白无相应的商业化抗体，或商业化抗体效果均不佳，可考虑寻找合适的抗体公司进行定制。

常见问题及解决办法

问题	可能原因	可采取的措施
电泳条带呈笑脸状	凝胶不均匀冷却，中间冷却不好；电泳系统温度偏高。	重新制胶，电泳时电压可适当降低。
电泳条带呈皱眉状	可能是由于装置不合适，特别可能是凝胶和玻璃挡板底部有气泡，或者两边聚合不完全。	重新电泳，注意气泡问题。
电泳条带拖尾	样品溶解不好。	重新溶解样品，上样前可离心。
电泳条带纹理（纵向条纹）	样品中含有不溶性颗粒。	重新溶解样品，上样前可离心。
电泳条带偏斜	电极不平衡或者加样位置偏斜。	确保电极水平。
电泳条带两边扩散	加样量过多。	减少上样量
Western blot 结果中背景较高	膜封闭不够	延长封闭的时间；选择更加适合的封闭液。
	一抗稀释度不适宜	对抗体进行滴度测试，选择最适宜的抗体稀释度。
	一抗孵育的温度偏高	建议 4℃ 结合过夜。
	选择的膜容易产生高背景	一般硝酸纤维素膜的背景会比 PVDF 膜低。
	膜在实验过程中干过	实验过程中要注意保持膜的湿润。
	检测时曝光时间过长	减少曝光时间。

Western blot 结果中杂带较多	目的蛋白有多个修饰位点(磷酸化位点、糖基化位点、乙酰化位点等)本身可以呈现多条带。	查阅文献或进行生物信息学分析,获得蛋白序列的修饰位点信息,通过去修饰确定蛋白实际大小。
	目的蛋白有其它剪切本	查阅文献或生物信息学分析可能性。
	样本处理过程中目的蛋白发生降解	加入蛋白酶抑制剂;样本处理时在冰上操作。
	上样量过高,太敏感	适当减少上样量。
	一抗特异性不高	重新选择或制备高特异性的抗体。
	一抗不纯	纯化抗体
	一抗或者二抗浓度偏高	降低抗体浓度。
Western blot 结果中无信号或显示信号弱	检测样本不表达目的蛋白	选择表达量高的细胞作为阳性对照,用于确定检测样本是否为阴性。
	检测样本低表达目的蛋白	提高上样量,裂解液中注意加入蛋白酶抑制剂。
	转移不完全或过转移	可以用丽春红染膜并结合染胶(考马斯亮蓝)后确定条带是否转至膜上或转移过头;适当调整转膜的时间和电流。
	抗体不能识别测试种属的相关蛋白	购买抗体前应当认真阅读抗体说明书,确定其是否能够交叉识别测试种属的对应蛋白。
	一抗孵育时间不足	建议 4℃ 结合过夜。
	二抗与一抗不匹配	选择针对一抗来源的种属的抗体。
	洗膜过度	洗膜时间不宜过长,加入的去垢剂不宜过强或过多,建议使用 0.1% 的弱去垢剂 Tween-20。
仅局部区域有信号	转膜不完全	确保在胶和膜之间没有气泡
		根据厂商指导将膜彻底浸润
		避免徒手操作,应配戴手套,使用镊子
		更换新膜
		膜过多时,应避免相互堆叠