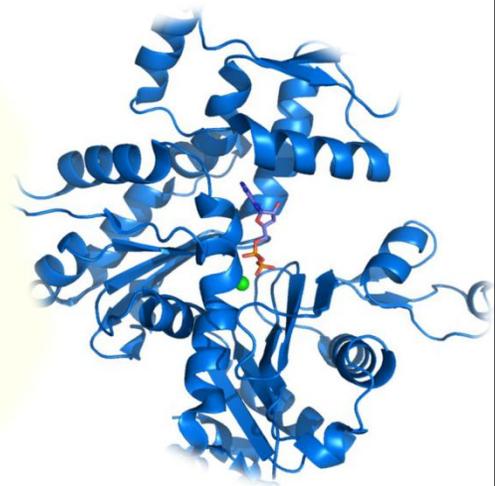
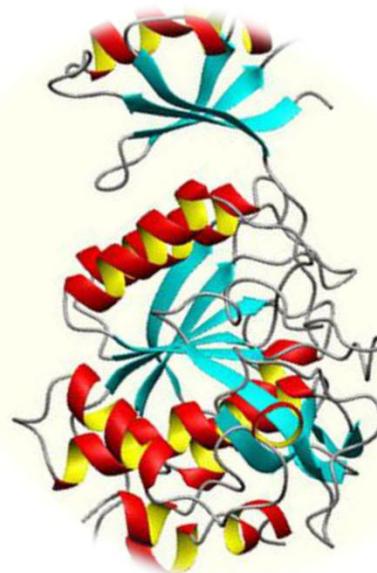


# 翊圣科技



# Western Blot标准实验流程及难点解析

翊圣生物产品部

时间：2018

# 目录

01

Western Blot原理及应用

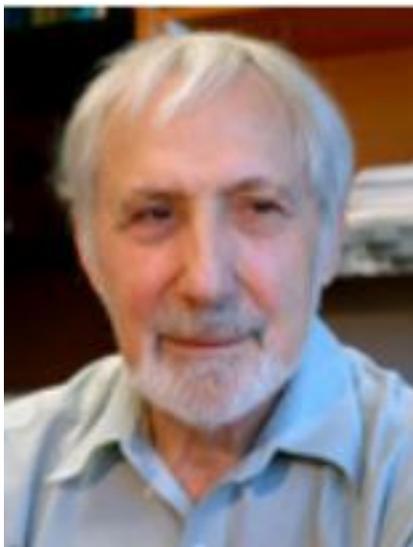
02

基本实验流程

03

案例分析及优化方案





Stark

首次发现蛋白印迹方法

[1] Renart J, Reiser J, Stark GR. Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. PNAS. 1979, 76: 3116-3120.



Towbin

发明“三明治”转膜结构

[2] Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. PNAS. 1979, 76: 4350-4354.



Burnette

命名和推广了western blot

[3] Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Analytical Biochemistry. 1981, 112: 195-203.

## 原理

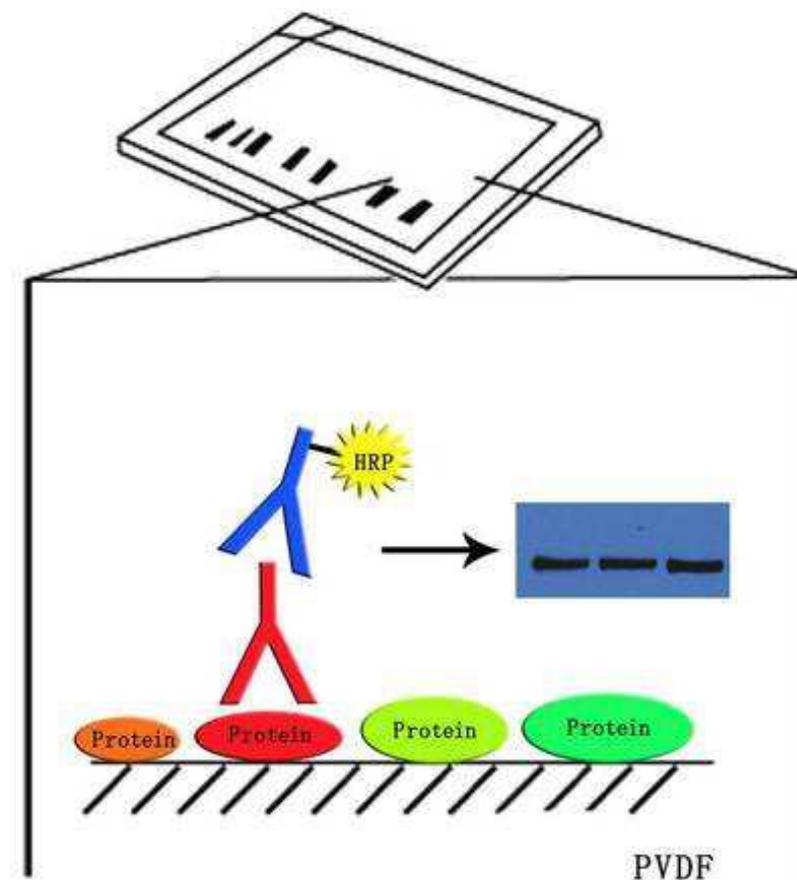
Western Blot (WB) 又叫蛋白印记法/免疫印迹试验，是将蛋白质转移到上，然后利用抗体对靶蛋白进行检测的技术

## 用途

**定性检测：** 目的蛋白有无，目的蛋白分子量大小，蛋白修饰

**定量检测：** 目的蛋白含量

常配合ELISA、FACS、IHC、IF等技术使用



# 目录

01

Western Blot原理及应用

02

基本实验流程

03

案例分析及优化方案

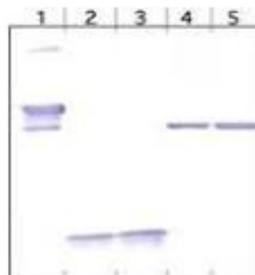


# Western Blot基本流程

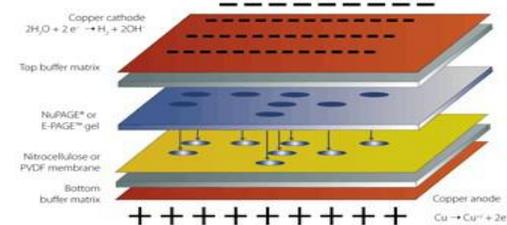
## 样本制备



## SDS-PAGE



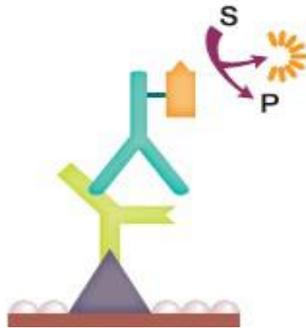
## 转膜



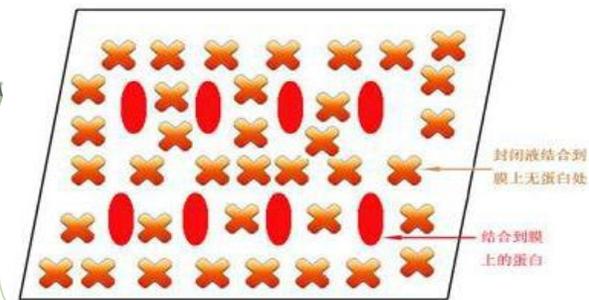
## 蛋白检测



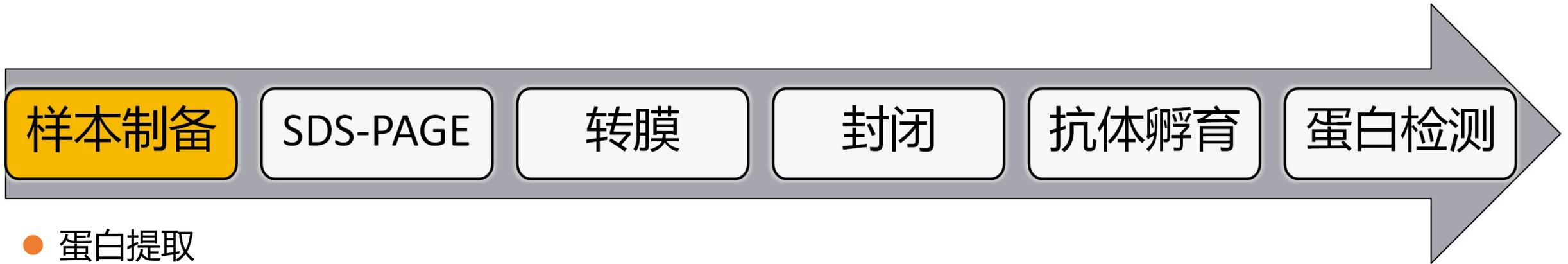
## 抗体孵育



## 封闭

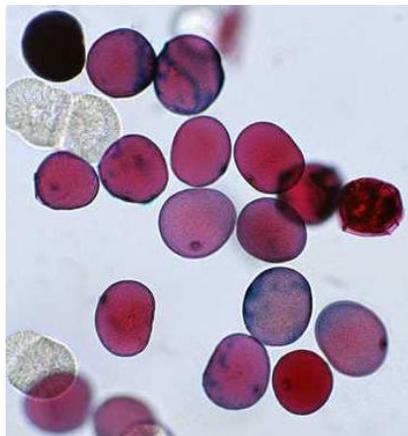


# Western Blot基本流程



- 蛋白提取
- 蛋白定量

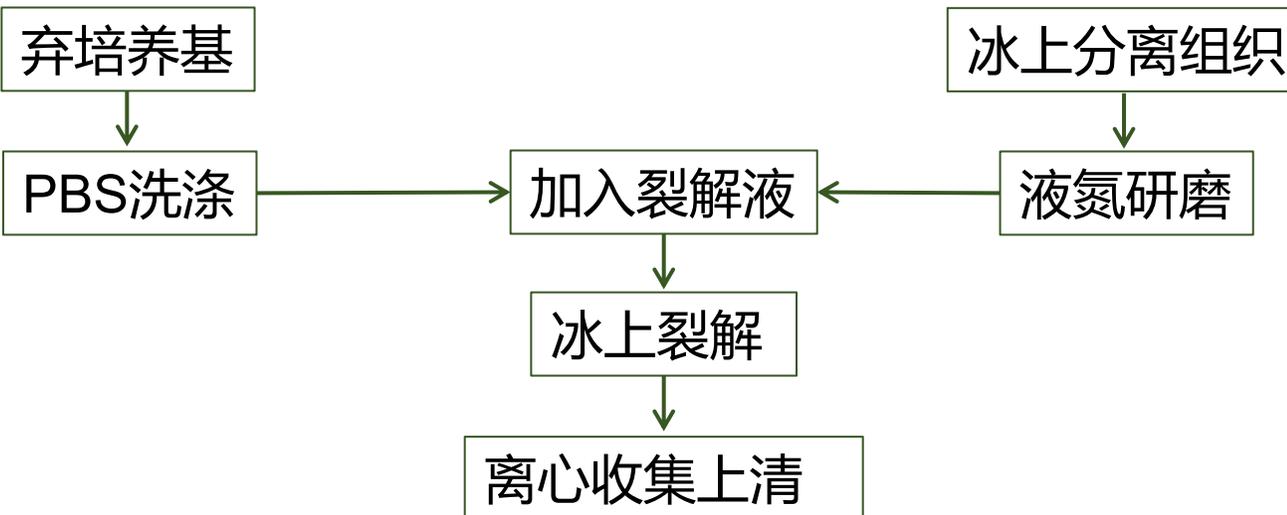
- 蛋白提取



培养细胞的裂解



植物/动物组织的裂解



- 蛋白提取

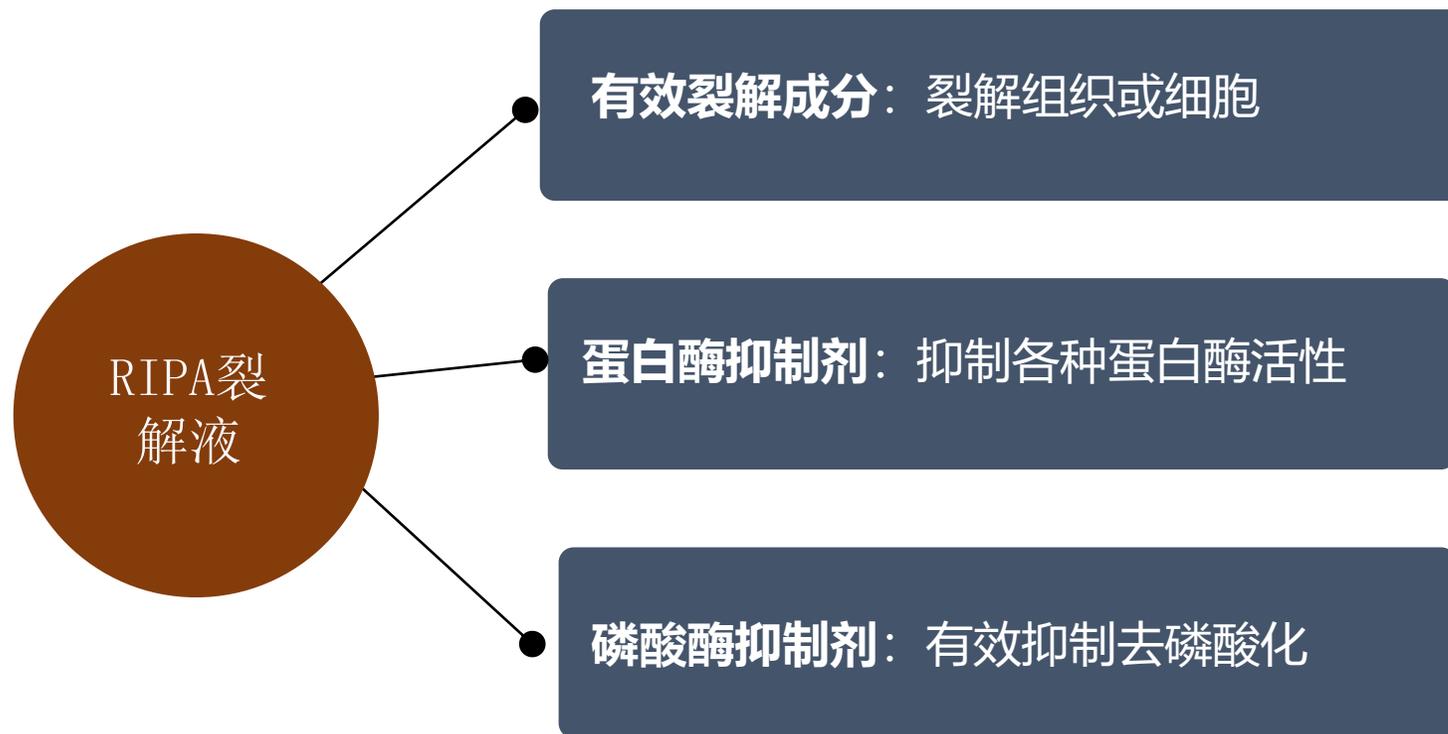
➤原则：根据**靶蛋白的定位**选择合适的裂解液

蛋白定位	裂解液
全细胞	NP-40或 <b>RIPA</b>
细胞质（可溶蛋白）	Tris-HCl
细胞质（细胞骨架等不溶蛋白）	Tris-Triton
细胞膜	NP-40或 <b>RIPA</b>
细胞核	<b>RIPA</b>
线粒体	<b>RIPA</b>

## ● 蛋白提取——RIPA裂解液

➤ **原理:** RIPA裂解液(RIPA Lysis buffer), 利用**表面活性剂**等裂解细胞膜, 从组织或细胞中抽取可溶性蛋白。

### ➤ 组分



**PMSF?**

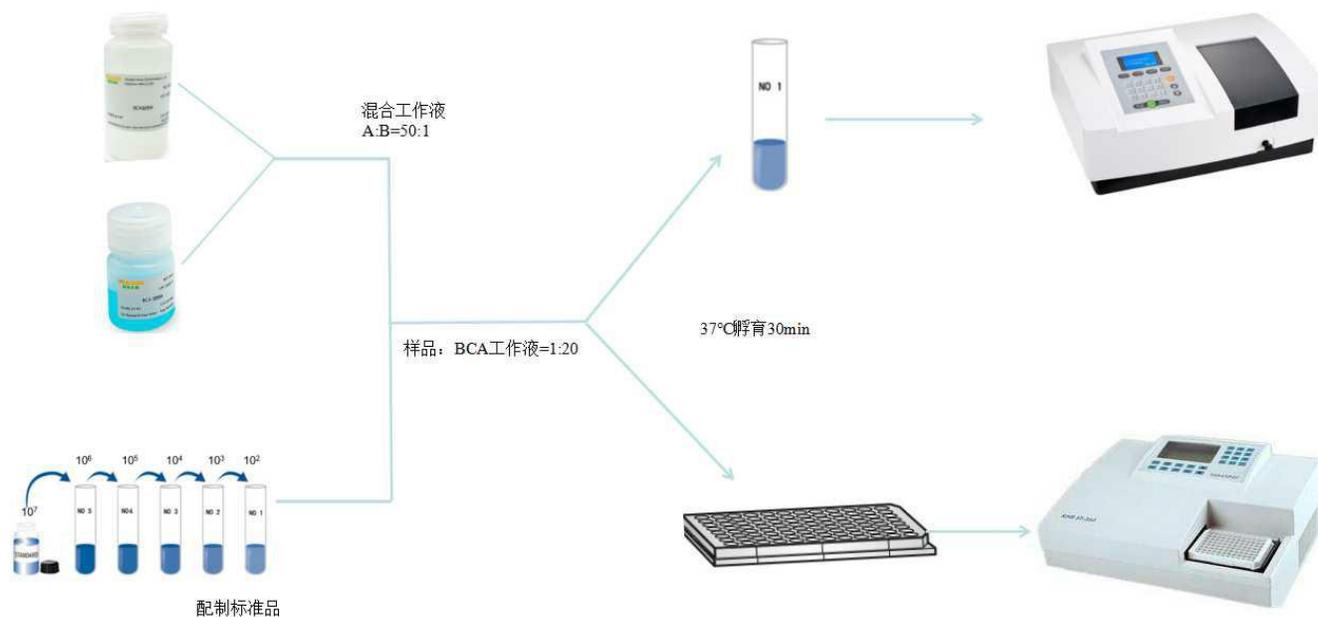
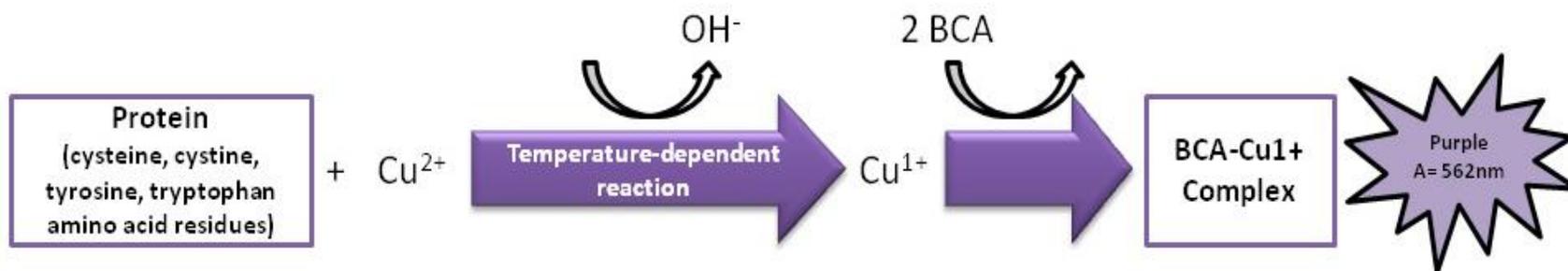
## ● RIPA裂解液种类

种类	RIPA裂解液 (强)	RIPA裂解液 (中)	RIPA裂解液 (弱)
主要用途	WB、IP	WB、IP	WB、IP、Co-IP
有效裂解成分	Triton X-100 SDS Sodium pyrophosphate	NP-40 SDS Sodium pyrophosphate	NP-40 sodium pyrophosphate
裂解强度	强	中	温和
提取膜蛋白	很好	较好	一般
提取胞浆蛋白	很好	很好	很好
提取核蛋白	很好	较好	较好

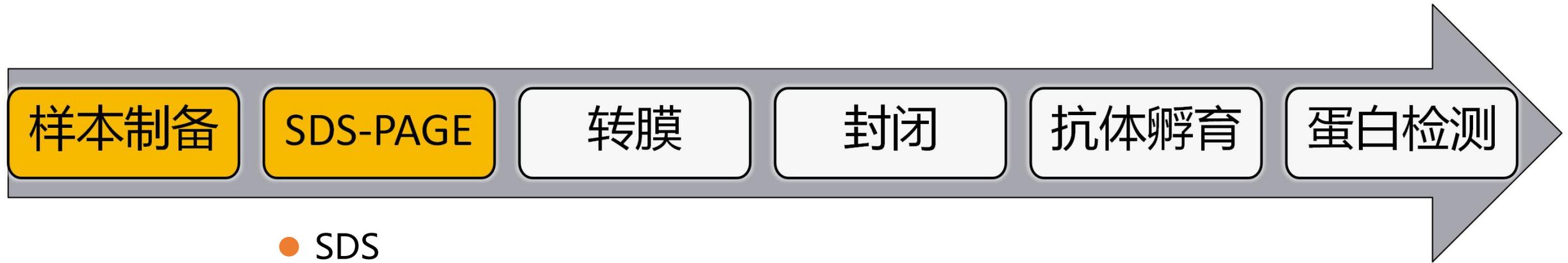
- **蛋白定量目的：**确保蛋白样品上样量一致
- **常用蛋白定量方法**

方法	吸收波长	原理	检测范围	优点	缺点
分光光度计	280 nm	络氨酸和色氨酸吸收光	0.1-100 mg/ml	样本量小，快速，成本低	不兼容去污剂和变性剂，变异高
BCA	562 nm	铜还原，BCA与Cu <sup>1+</sup> 反应	20-2000 mg/ml	兼容去污剂和变性剂，变异低	低或不兼容还原剂
Bradford	595 nm	考马斯亮蓝染料与蛋白质形成复合物	20-2000 mg/ml	兼容还原剂，快速	不兼容去污剂
Lowry	750 nm	蛋白质还原铜，铜-蛋白质复合物还原Folin-Ciocalteu	10-1000 mg/ml	高灵敏度和准确性	不兼容去污剂和还原剂，过程长

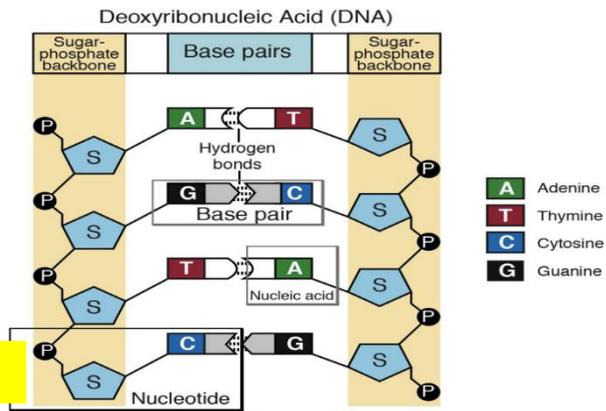
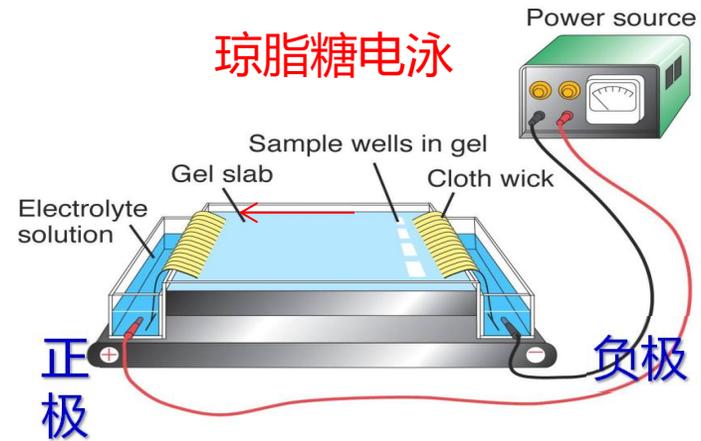
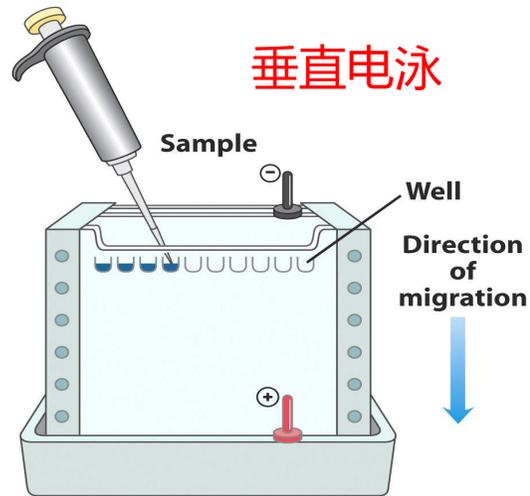
- **BCA法**: 蛋白在碱性条件下将 $\text{Cu}^{2+}$ 还原为 $\text{Cu}^+$ ， $\text{Cu}^+$ 与BCA形成稳定的紫色络合物，在562 nm处有最大吸光值，该络合物的颜色深浅与蛋白浓度成正比，通过与标准曲线对比，测得蛋白含量。



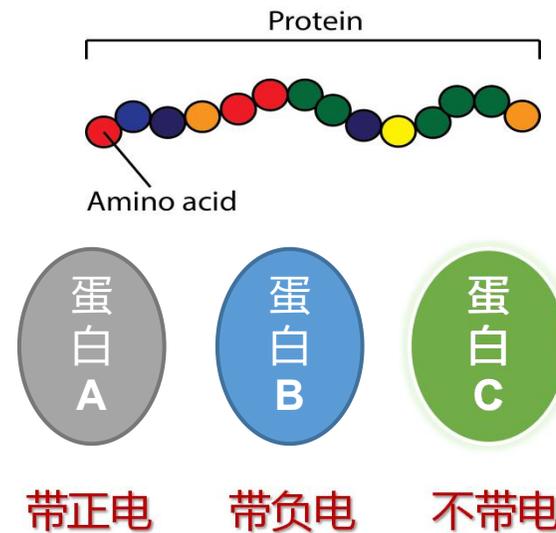
# Western Blot基本流程



- SDS
- PAGE
- 电泳过程



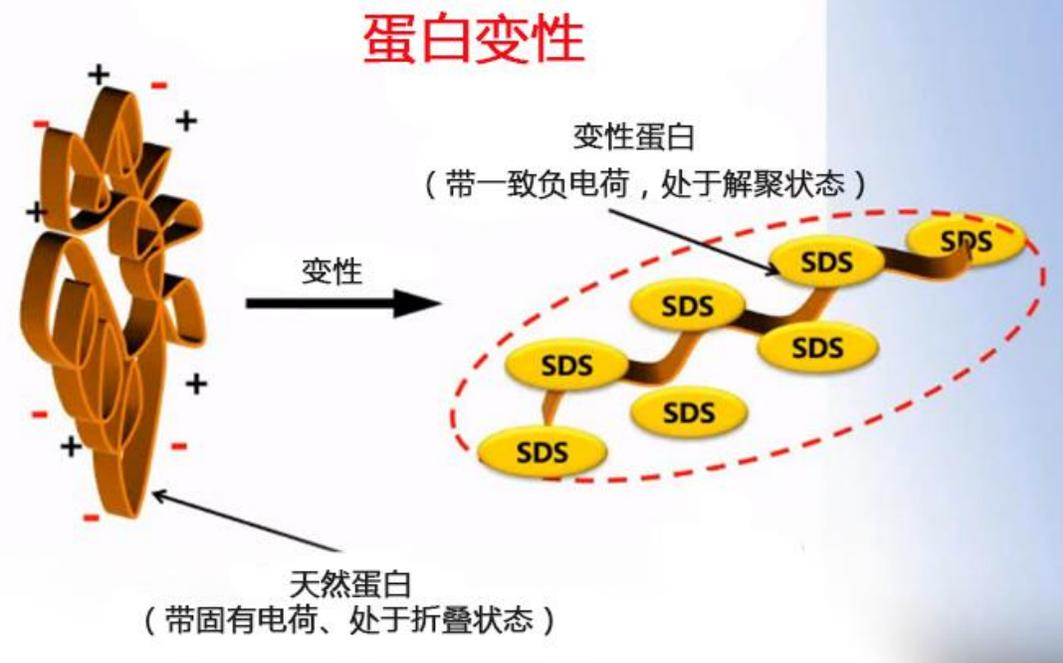
带负电



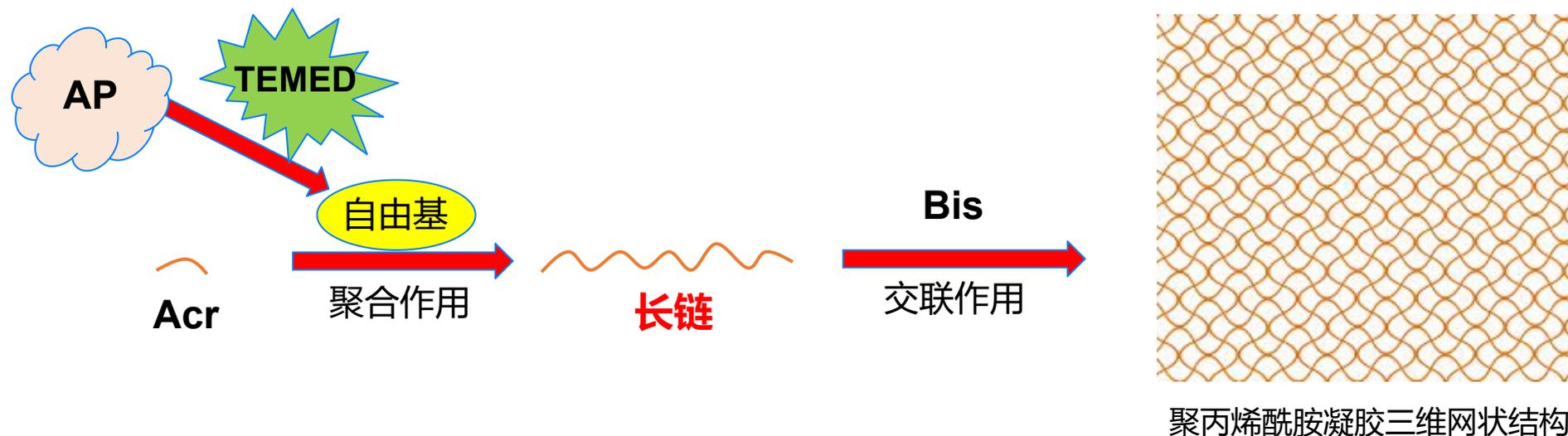
➤ **SDS**: 十二烷基硫酸钠, 一种阴离子表面活性剂, 可作为变性剂

➤ **作用**: 使蛋白-SDS复合物迁移率只取决于蛋白分子量大小

- (1) 破坏蛋白质二三级结构, 使蛋白处于解聚状态
- (2) 使蛋白表面均带负电



- **聚丙烯酰胺凝胶电泳**: PAGE, 以聚丙烯酰胺凝胶作为支持介质 (三维网状结构), 分离蛋白质的一种技术
- **组分**: 过硫酸铵(AP)、四甲基乙二胺(TEMED)、丙烯酰胺(Acr)、甲叉双丙烯酰胺(Bis)、ddH<sub>2</sub>O、SDS、Tris-HCl缓冲液



➤ **不连续电泳:** 电泳缓冲液、浓缩胶、分离胶

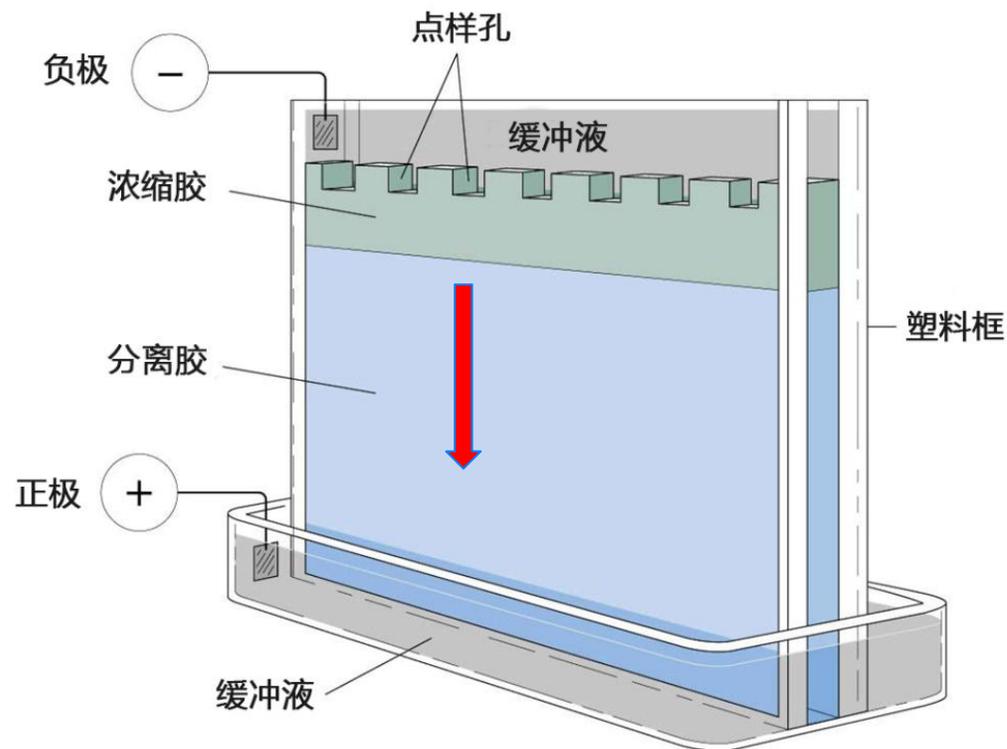
➤ **电泳缓冲液系统:** Tris-Gly、Bis-Tris、Tris-Acetate、Tricine、HEPES等

➤ **凝胶体系**

凝胶类型	制胶缓冲液pH	凝胶浓度	作用
浓缩胶	pH 6.8 Tris-HCl	较低 (2-5%)	浓缩蛋白
分离胶	pH 8.8 Tris-HCl	较高 (根据蛋白大小选择)	分离蛋白

➤ **分离胶选择**

凝胶浓度 (%)	线性分离范围 (KD)
20	4-40
15	12-45
12	10-70
10	15-100
8	25-200
5.0	57-212



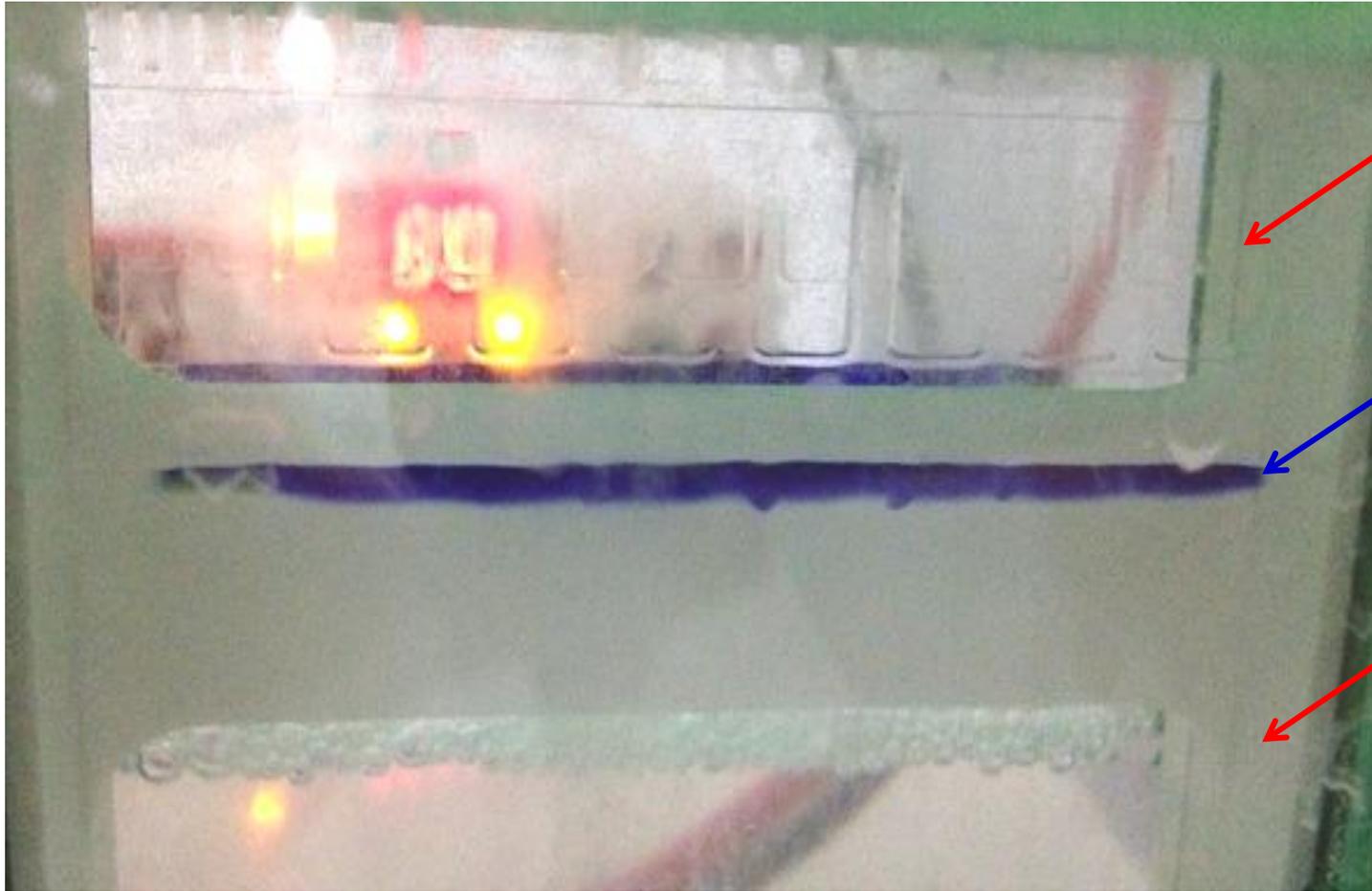
**电泳体系**

## ✓ 连续电泳

带电颗粒在电场中的迁移主要靠**电荷**和**分子筛**效应。

## ✓ 不连续电泳

由于缓冲液离子成分、pH、凝胶浓度和电位梯度的不连续性，使带电颗粒在电场中的迁移不仅有电荷和分子筛效应，还有**浓缩效应**，使分离的条带更清晰，分辨率更高，目前应用较为广泛。



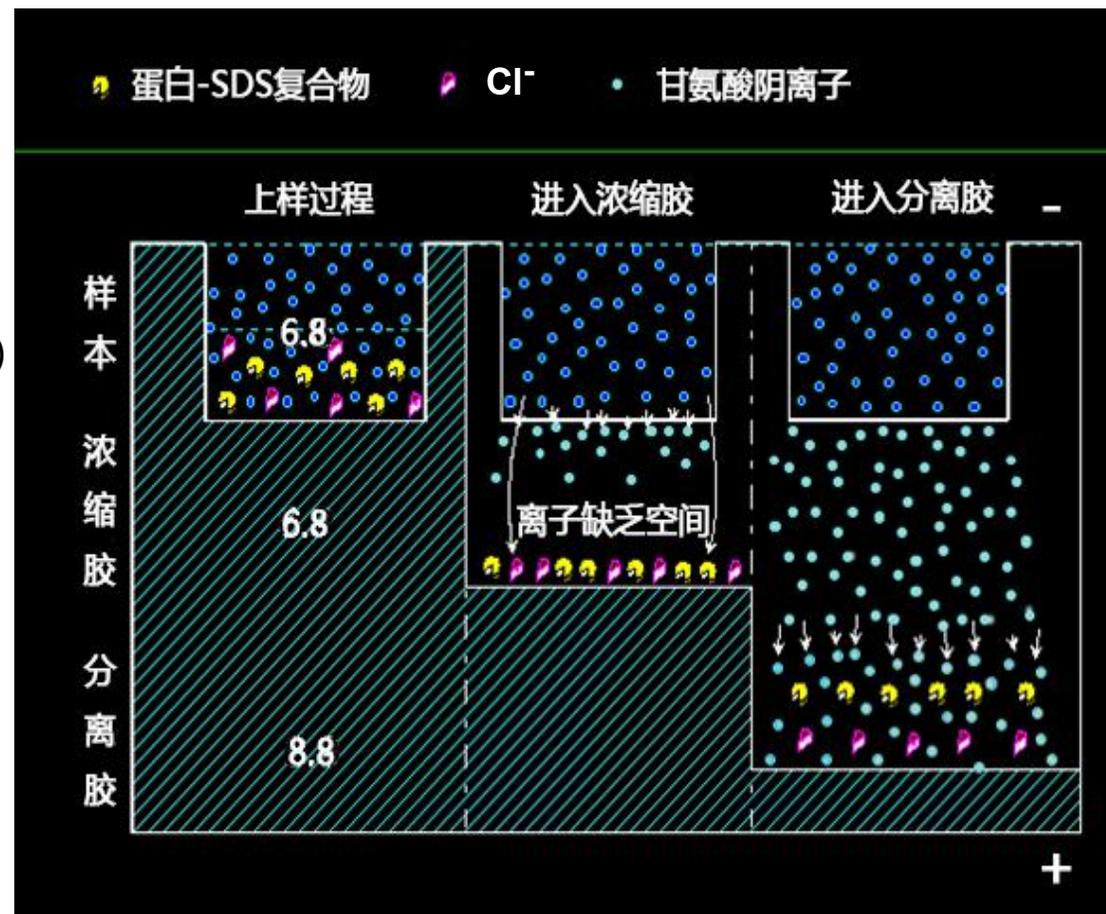
浓缩胶

同一起跑线

分离胶

## ●电泳过程

- ▶ **阴离子**：蛋白-SDS复合物、Cl<sup>-</sup>和甘氨酸阴离子
- ▶ **进入浓缩胶( pH 6.8)**：Cl<sup>-</sup>最先到达界面 → 低离子浓度区域（低电导区）  
→ 蛋白-SDS复合物和甘氨酸阴离子快速聚集在界面 → 形成很窄的区带。
- ▶ **进入分离胶( pH 8.8)**：甘氨酸解离速度加快 → 甘氨酸阴离子和Cl<sup>-</sup>电泳速度 > 蛋白-SDS复合物 → 蛋白-SDS复合物通过**自身的迁移速度**进行电泳 → 蛋白根据自身**分子量大小**而进行分离。



# Western Blot基本流程



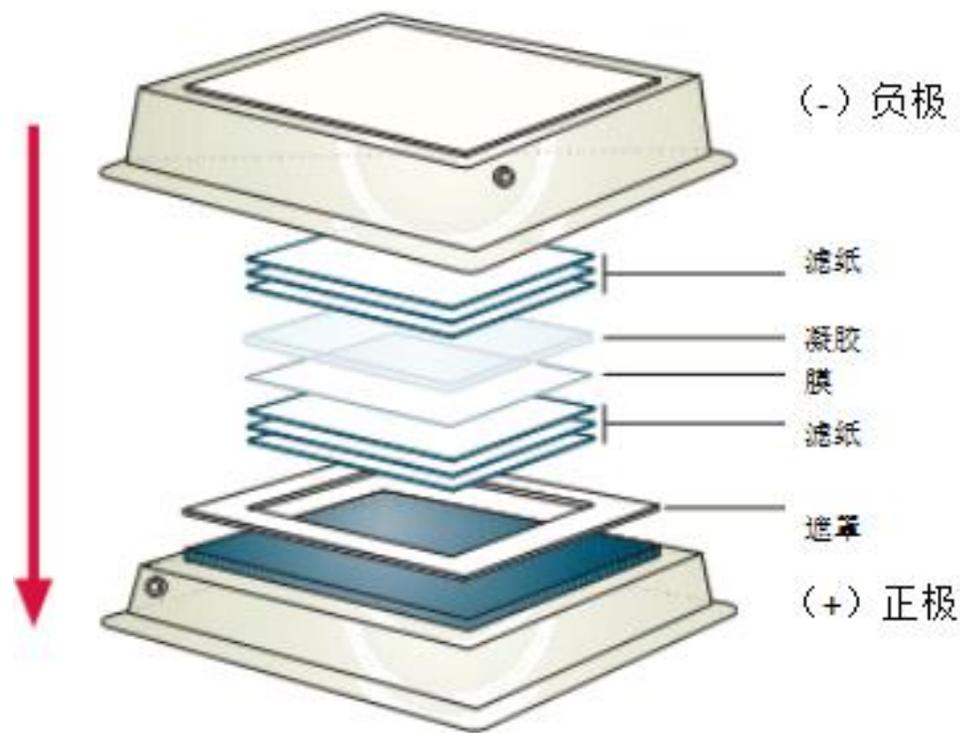
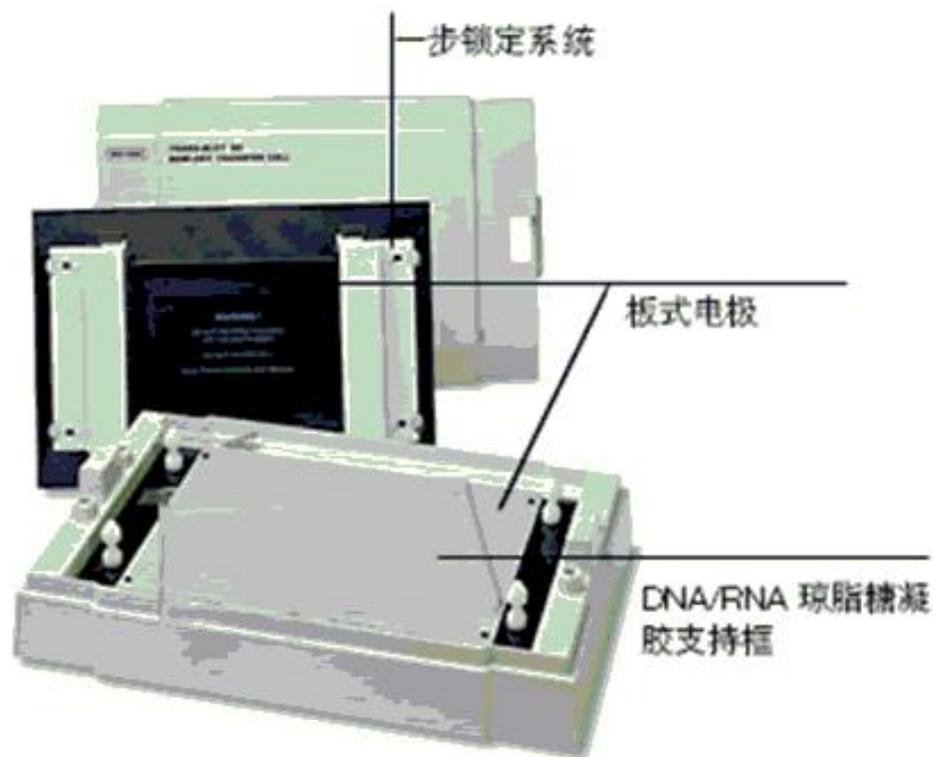
- 膜类型
- 转膜方法
- 转膜效果的判断

	NC膜	PVDF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	80-110 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	125-200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	大于400 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$
机械强度	干的膜易碎	强	软而结实
溶剂耐受性	差	强	差
浸润	缓冲液湿润	使用前100%甲醇湿润	缓冲液湿润
适用检测方式	常规染色, 可用放射性和非放射性检测	常规染色, 比较于NC膜, 可用于考马斯亮蓝染色, ECL检测和快速免疫检测	显色法、化学发光、放射性
适用范围	普通WB、0.45 $\mu\text{m}$ 一般蛋白, 0.2 $\mu\text{m}$ 分子量小于20kD蛋白, 0.1 $\mu\text{m}$ 分子量小于7kD蛋白	普通WB、糖蛋白检测和蛋白质测序	低浓度小分子蛋白、酸性蛋白、糖蛋白、核酸检测常用
价格	较便宜	较贵	较便宜

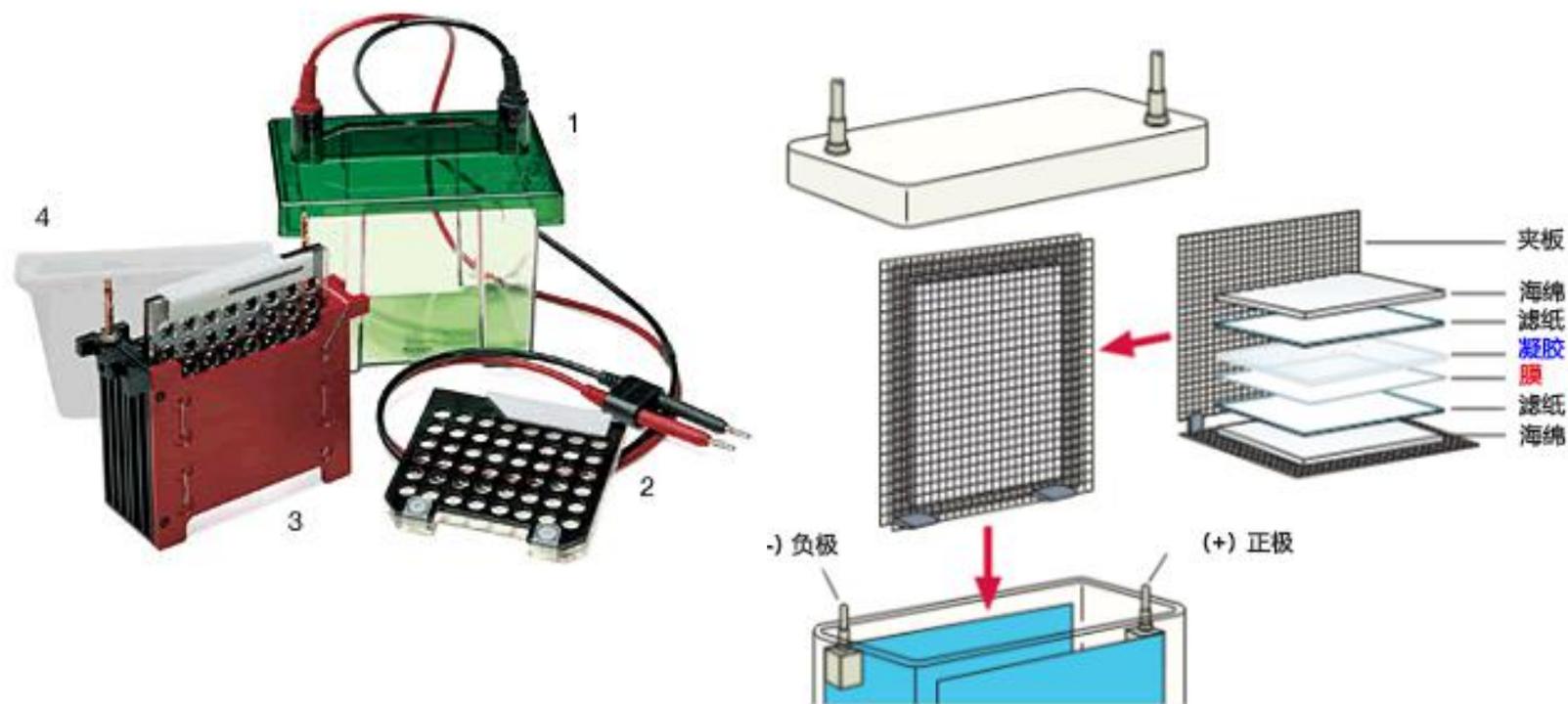
常用的转膜方法：**半干转**和**湿转**，原理完全相同，只是用于固定胶/膜叠层和施加电场的机械装置不同。

**半干转特点**：转膜速度快，适合小分子蛋白。

**湿转**：转膜成功率高，适合分子量较大的蛋白，**应用广泛**。



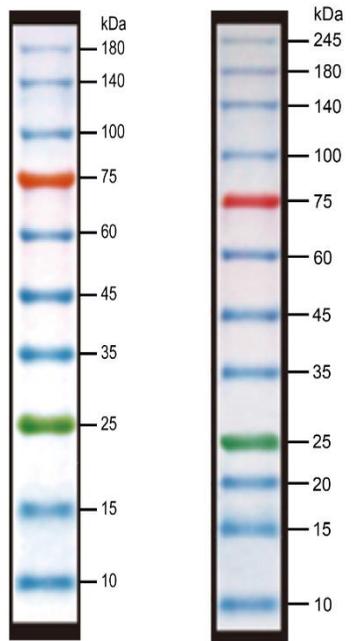
## 湿转——“三明治”转膜层的制备



### 注意

- 胶在负极，膜在正极
- 保证每层之间没有气泡
- 转膜过程产生大量热量，需冰浴

## ➤ 蛋白Marker



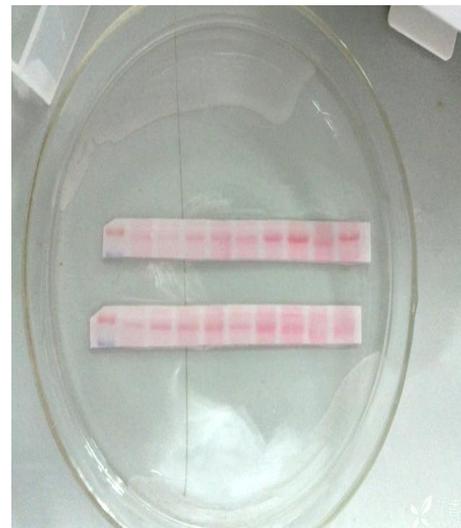
15% Tris-Glycine  
20351ES76

4-20% Tris-Glycine  
20352ES76

## ➤ 考马斯亮蓝



## ➤ 丽春红





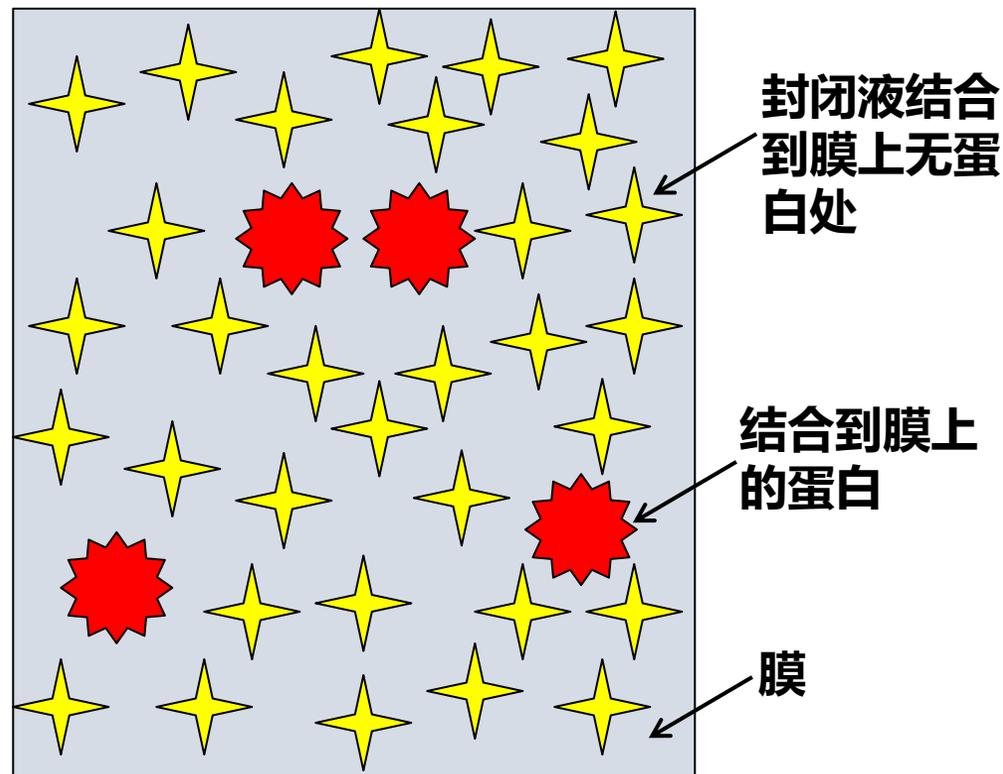
- 封闭作用
- 封闭剂的选择

## ➤ 封闭作用

封闭膜上未结合蛋白的区域，防止抗体非特异性结合  
降低背景，提高灵敏度

## ➤ 封闭时间

室温或者37°C缓慢摇荡1~2 h，特殊情况也可4°C过夜



## ● 封闭剂的选择

➤ 封闭剂种类：5%脱脂奶粉，BSA，动物血清等

➤ 封闭剂使用注意事项

1) 做**免疫组化**和**免疫荧光**实验建议用血清封闭

2) 某些抗体使用BSA封闭可能会产生比脱脂奶粉更强的信号，具体需阅读说明书

3) 以下情况不用脱脂奶粉

– **生物素化**标记的抗体

– **磷酸化**抗体检测蛋白磷酸化

– **碱性磷酸酶 (AP)** 显色方法



YEASEN 翊圣生物  
100%品质保证



样本制备

SDS-PAGE

转膜

封闭

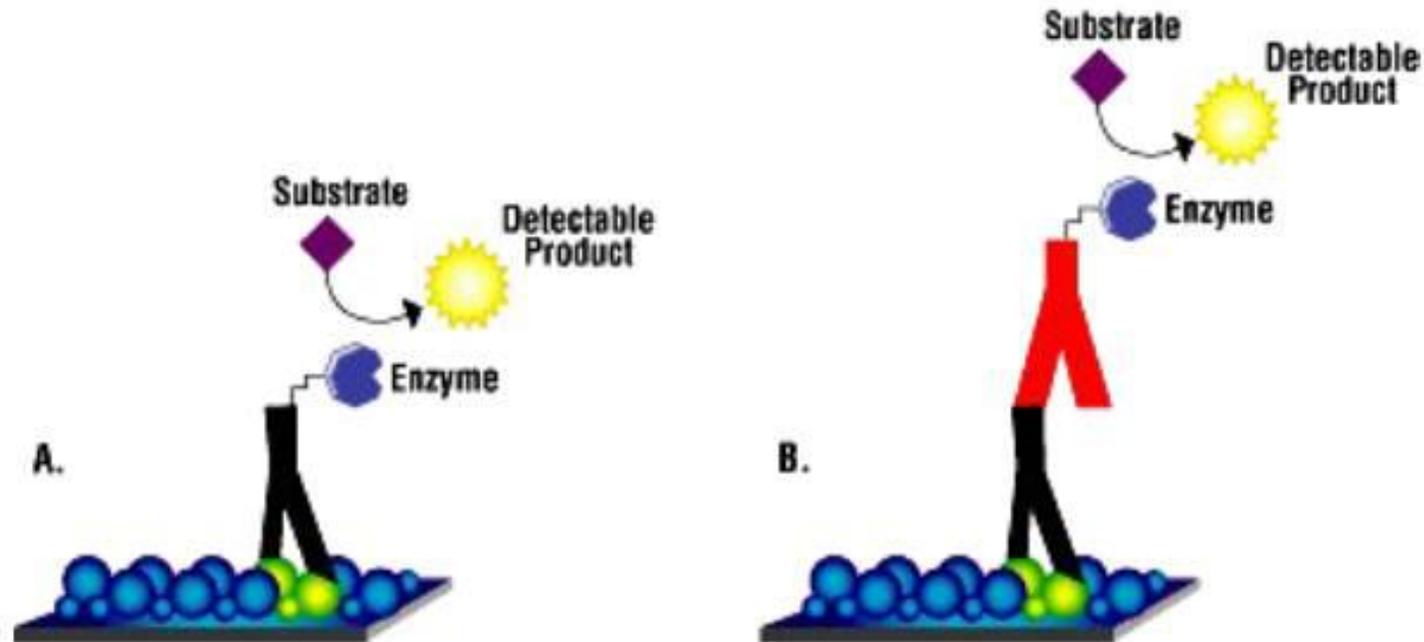
抗体孵育

蛋白检测

- 抗体选择
- 内参抗体选择

## ● 抗体选择

### ➢ 直标法和间标法



#### 直标法

##### 优点

- 1.快速（只需要敷一种抗体）
- 2.没有二抗交叉反应引起的非特异性条带

##### 缺点

- 1.免疫反应性降低
- 2.无信号二级放大
- 3.抗体标记费时昂贵，使用不便

#### 间标法

- 1.多种标记的二抗可供选择
- 2.信号放大灵敏度高（多个二抗结合位点）

- 1.交叉反应引起非特异性条带
- 2.额外的二抗孵育及条件优化

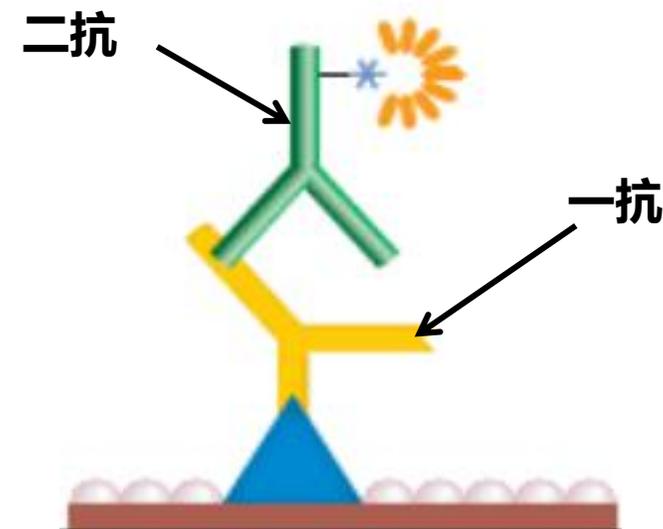
## ➤ 抗体选择

### ● 一抗的选择

	单克隆抗体	多克隆抗体
抗原类别	多肽/蛋白	多肽/蛋白
特异性	高	较低
批次间是否一致	完全一致	不能保证
最适用范围	WB / IP / ELISA / IF / ICC / IHC / FCM	WB / IP / ELISA

### ● 二抗的选择

- 原则：根据一抗的种属来源选择二抗  
例：一抗来自鼠源，二抗就要用抗鼠的二抗
- 标记种类：HRP、生物素、荧光



## 抗体选择—内参抗体

### ➤ 内参作用

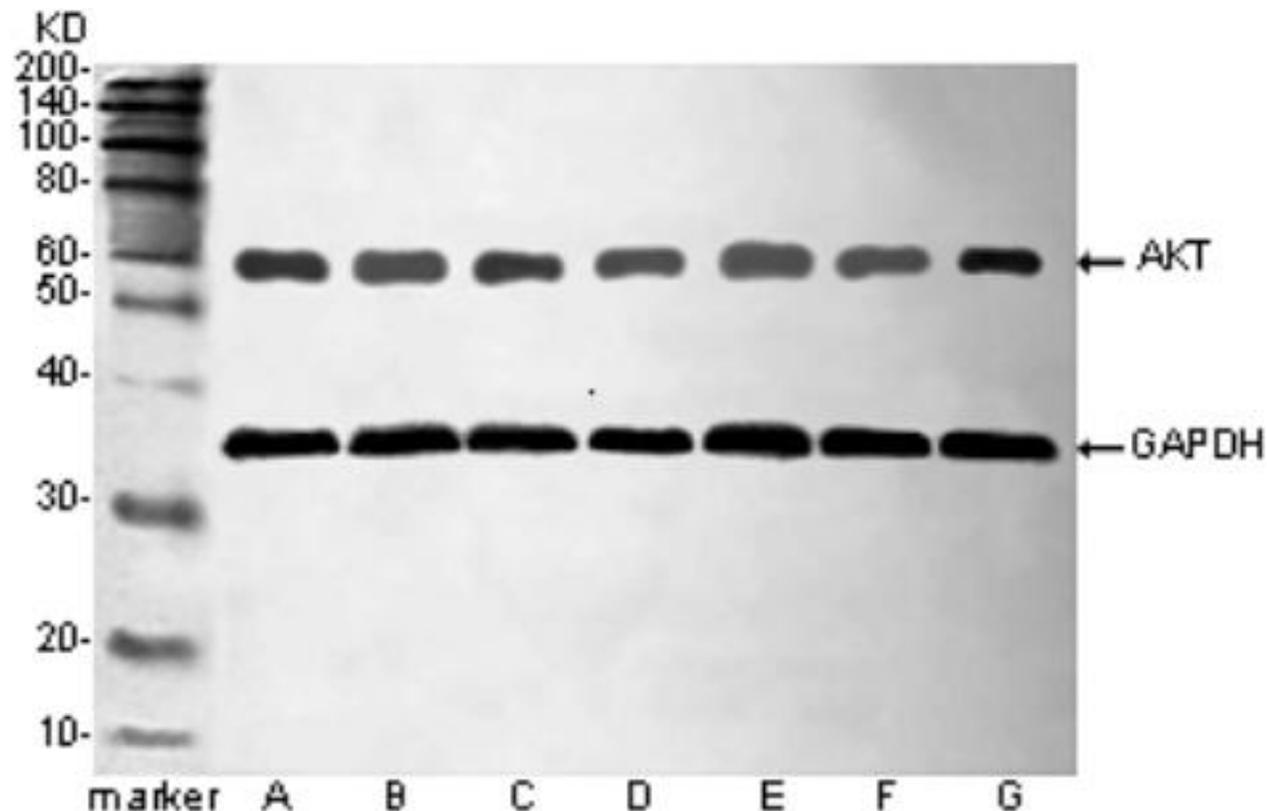
- 1) 检测整个WB流程是否正常;
- 2) 比较表达产物量的相对变化;
- 3) 校正上样误差, 确保蛋白半定量结果的可信度。

### ➤ 常用内参

GAPDH ~ 36kDa

Actin ~ 42kDa

Tubulin ~ 50kDa



## ➤ 抗体选择—内参抗体

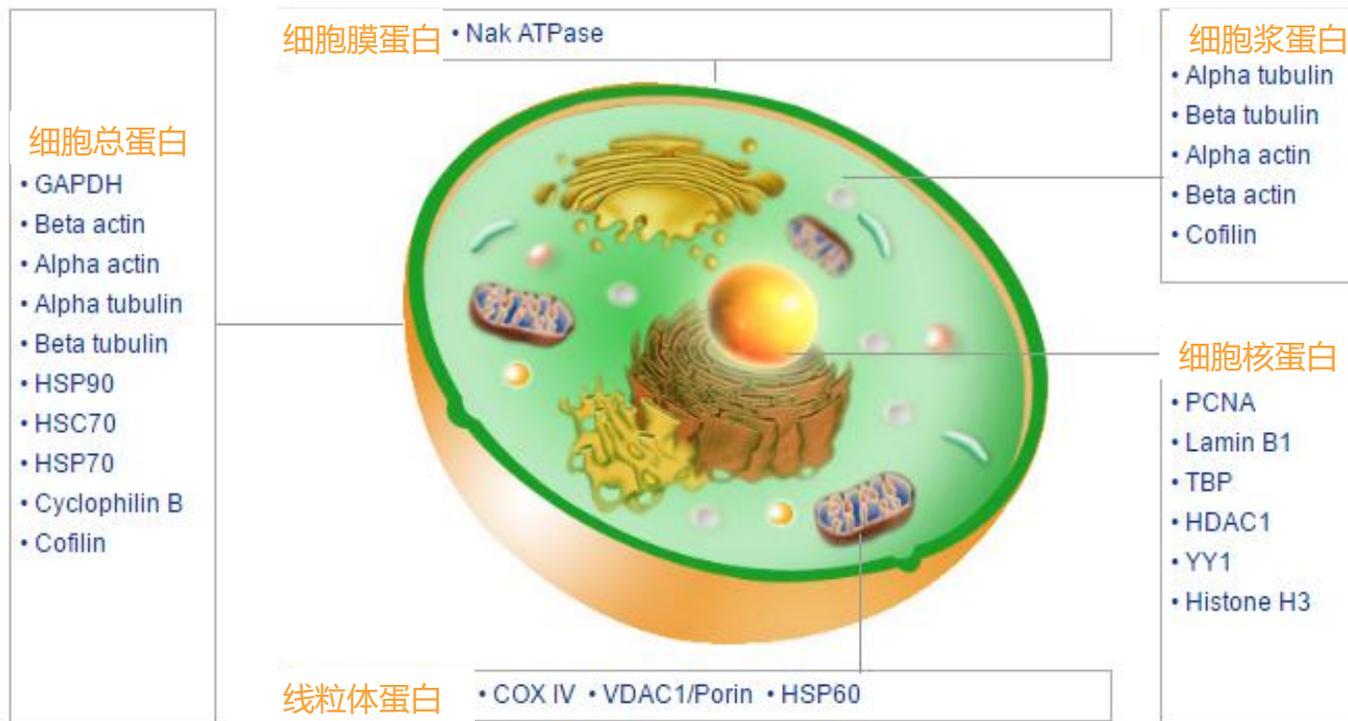
### ➤ 内参选择标准

**靶蛋白种属来源:** 动物或植物

**靶蛋白分子量大小:** 一般同内参至少相差5 kDa

**靶蛋白定位:** 核、膜、胞质、线粒体定位

**内参丰度:** 如 $\beta$ -actin在肌肉组织中含量很少



样本制备

SDS-PAGE

转膜

封闭

抗体孵育

蛋白检测

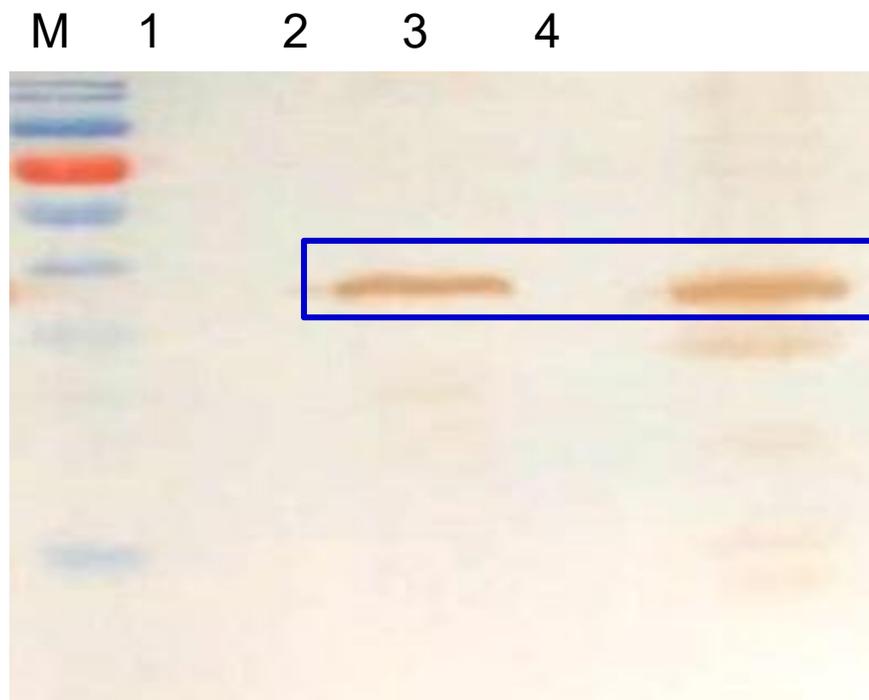
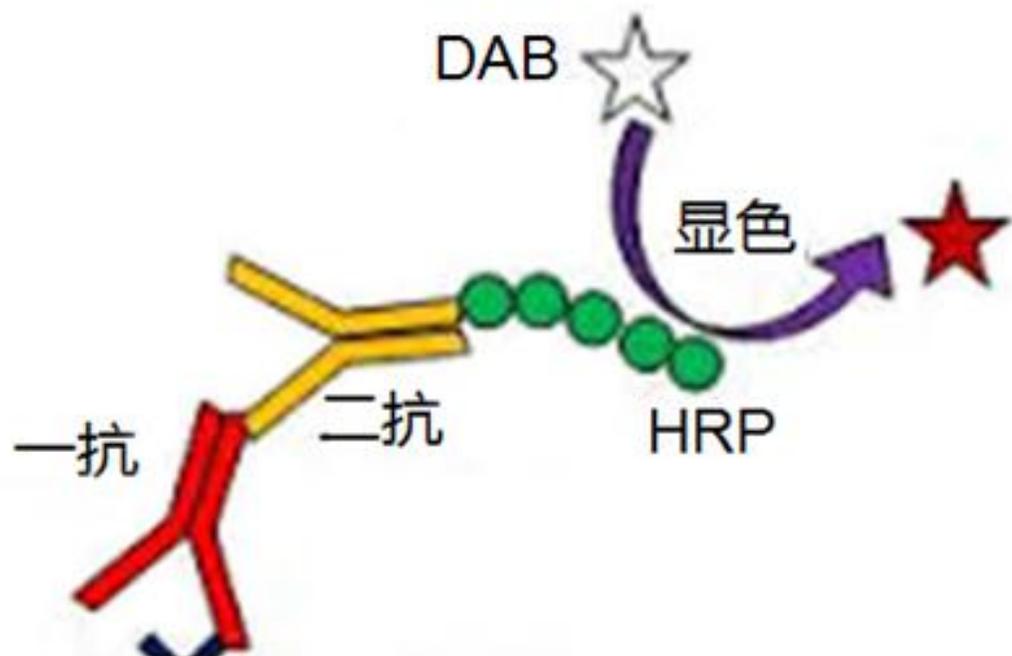
- 常用检测方法
- DAB显色法
- ECL发光法
- ECL产品选择指南

## 检测方法



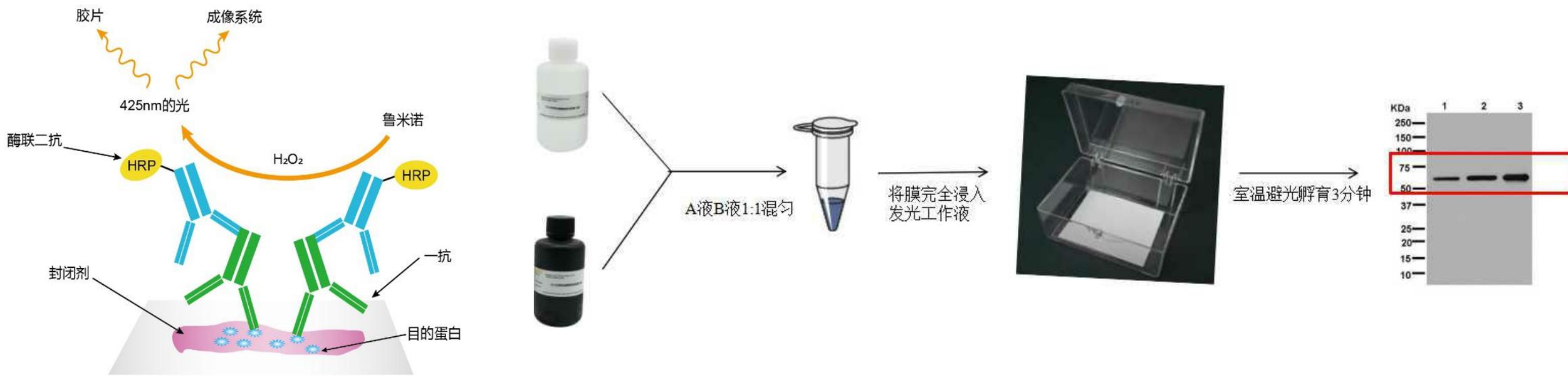
## ➤ DAB显色法

DAB即二胺基联苯胺，是过氧化物酶(如HRP)的**生色底物**，在过氧化氢的存在下失去电子而呈现出颜色的变化和积累，形成浅棕色不溶物。



## ➤ ECL发光法

ECL(Enhanced Chemiluminescence)：原理是鲁米诺被HRP和 $H_2O_2$ 氧化，产生荧光，这个过程被发光增强剂加强，具有稳定性好，灵敏度高、背景低等特点。



## ECL产品选择指南

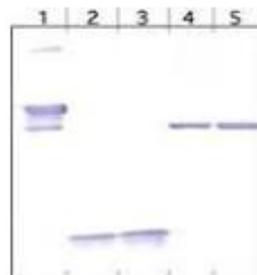
Yeasen	Enhanced ECL增强型	Super ECL超敏型	SuperDura持久型	MaxiSignal最高灵敏度型
适用样本	靶点丰度较高, 常规蛋白样本	靶点丰度低, 样本有限	靶点丰度较低, 样本有限	靶点丰度极低, 样品珍贵
检测灵敏度	中等皮克级	低皮克级	中等飞克级	低飞克级
信号持续时间	< 2 h	< 12 h	< 24 h	< 8 h
推荐用膜	NC膜	NC膜或PVDF膜	NC膜或PVDF膜	NC膜或PVDF膜
优势	同一级别灵敏度中信号最强	性价比最高, 适用于多数WB实验	最长信号持续时间, 极其适用于多次曝光	卓越灵敏度, 极其适用于痕量蛋白检测

# Western Blot基本流程

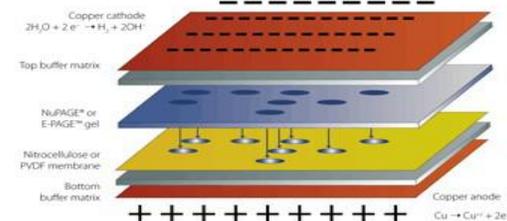
## 样本制备



## SDS-PAGE



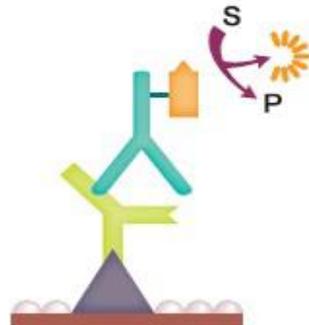
## 转膜



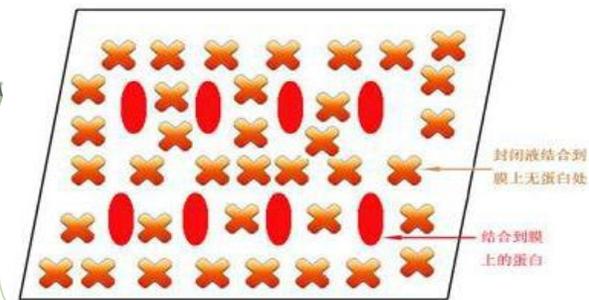
## 蛋白检测



## 抗体孵育



## 封闭



# 目录

01

Western Blot原理及应用

02

基本实验流程

03

案例分析及优化方案

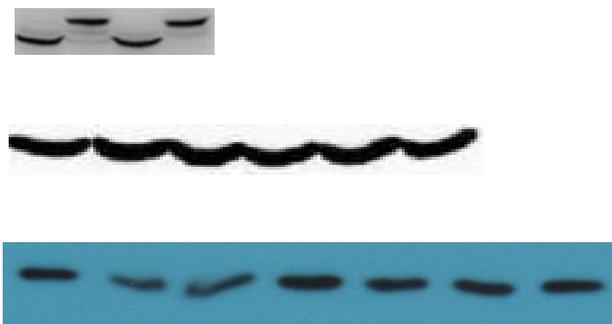


- 蛋白电泳条带异常
- 蛋白marker指示不准确
- 转膜不成功
- 显色条带异常

显色条带形状异常  
显色条带大小不符合预期  
内参条带不整齐



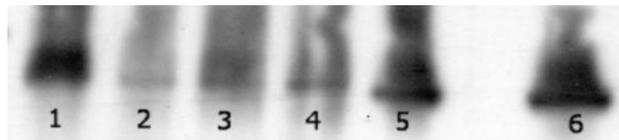
“微笑”条带



“皱眉”条带



条带拖尾

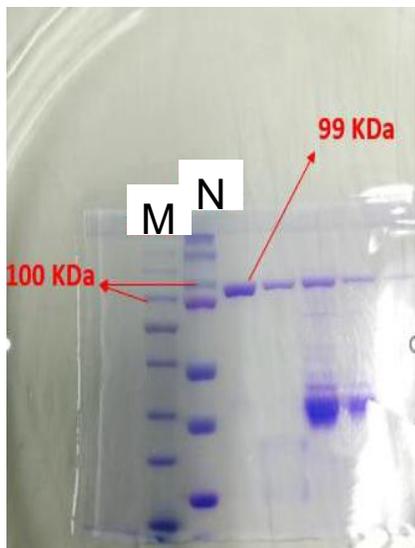
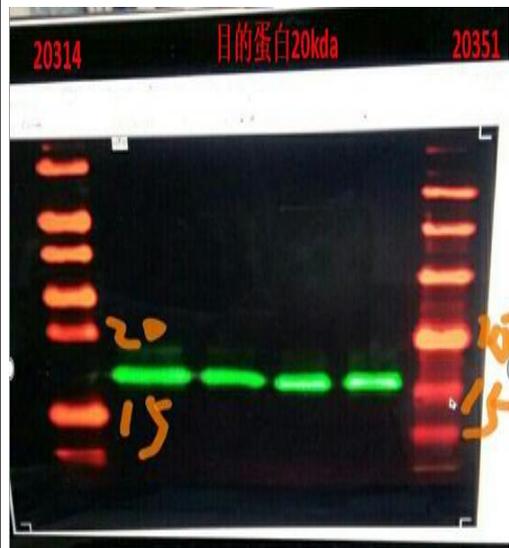


垂直纹理

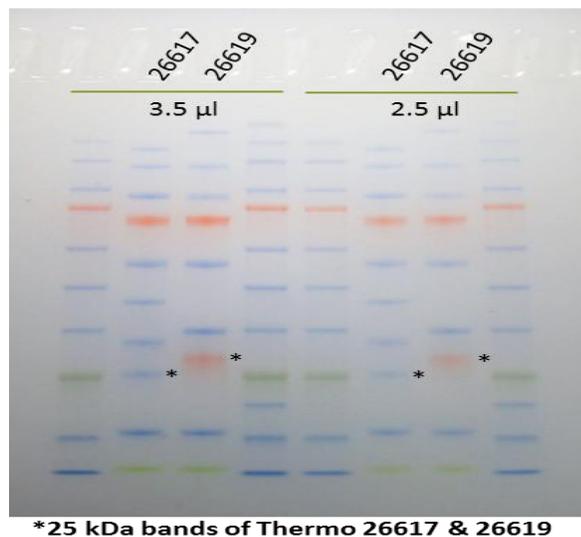


异常条带	可能原因	优化方案
“微笑”条带	凝胶不充分; 电压过高; 温度过高; 电泳速度过快	待充分凝胶后再电泳; 降低电压; 低温电泳; 减慢电泳速度
“皱眉”条带	凝胶与玻璃挡板质之间有汽包	在两板间加入适量缓冲液以排除气泡
条带拖尾	凝胶浓度过高; 电泳缓冲液失效; 蛋白降解	重新配制电泳缓冲液; 降低凝胶浓度;
条带模糊	蛋白未完全变性; 电泳太快; 转膜问题	完全变性蛋白样品、降低电泳时间、电泳之后及时将凝胶浸泡在转膜液中
垂直纹理	样品裂解不充分; 样品有不溶性颗粒; 蛋白降解	加样前离心样品; 优化蛋白提取方法, 寻找合适裂解液

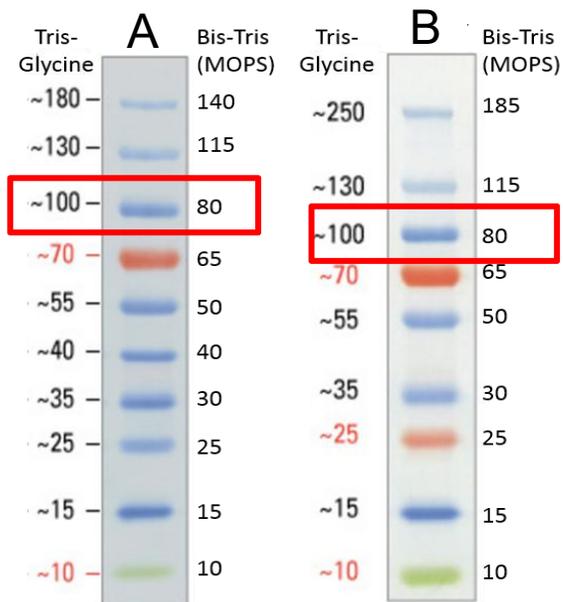
### 案例1



### 案例2



### 案例3



蛋白质会随电泳缓冲体系的不同而出现不同的条带迁移率

SDS-PAGE只能粗略估计蛋白大小，蛋白Marker的指示位置有差别也是可预估的

Virus PNT protein from *E. coli* (1)

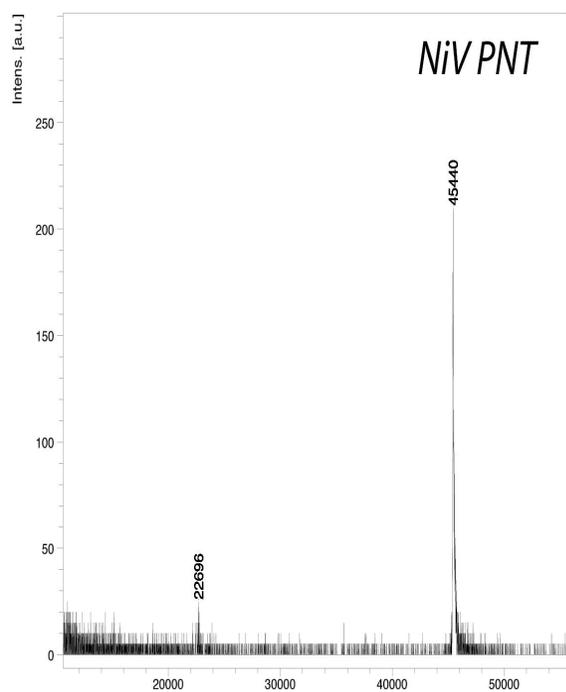
Virus NTAIL protein from *E. coli* (2)

A MALDI-TOF analysis

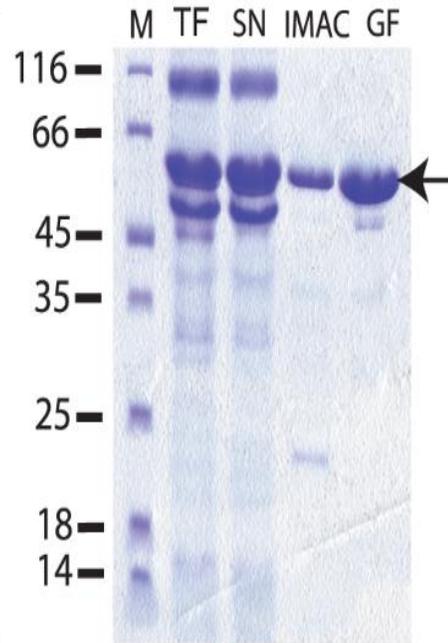
B SDS-PAGE analysis

A MALDI-TOF analysis

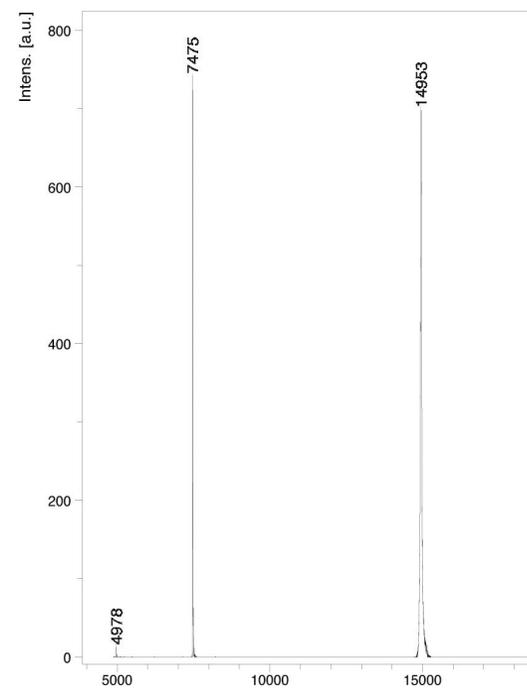
B SDS-PAGE analysis



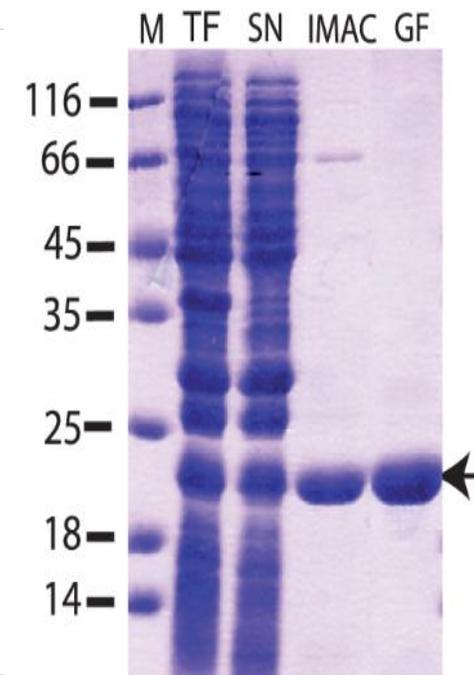
45.440 kDa



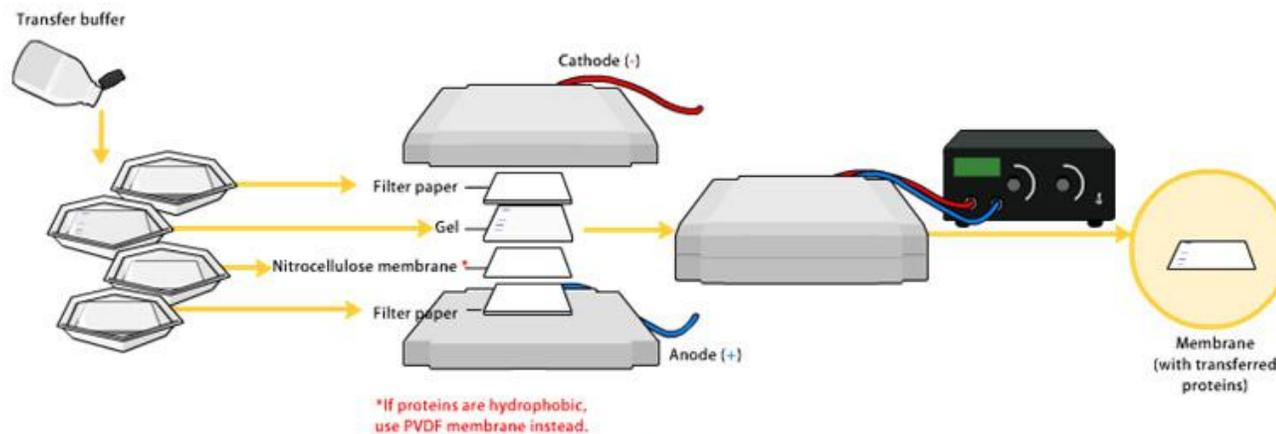
60 or 45.4 kDa?



14.953 kDa

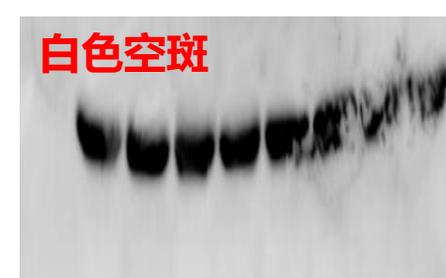
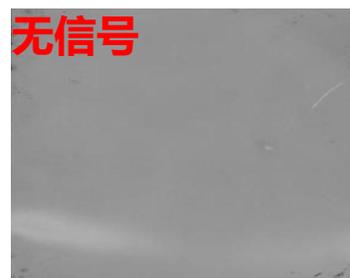


20 or 14.9 kDa?



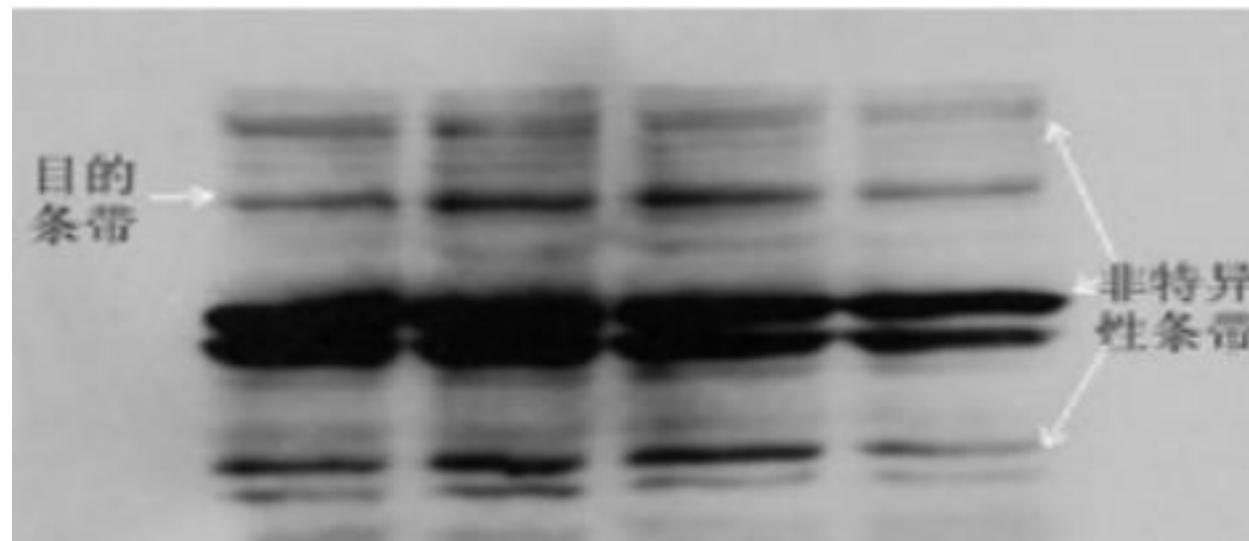
问题	可能原因	优化方案
膜上无大分子条带	转膜时间短; 蛋白太大转不过去	转膜条件 (延长时间)、选择湿转 (半干转不适合大分子条带)、选择PVDF膜, 降低凝胶浓度
膜上无小分子条带	膜孔径大于蛋白, 转膜时间过长	减少转膜时间, 更换孔径更小的膜
膜上无条带	操作原因; 膜的选择不适合, 蛋白与膜的结合能力弱	检查转膜条件、选取合适的膜
蛋白条带转到滤纸上	电压过高; 时间过长; 膜的孔径太大	降低电压, 减少转膜时间; 选择合适的膜

## 显色条带形状异常



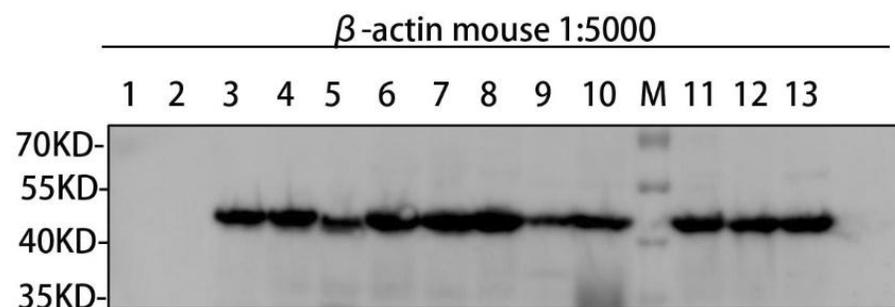
实验现象	可能原因	优化方案
无信号/信号弱	上样量太低；抗体浓度低；二抗失效，显色液失效；转膜出现问题	增加上样量；增加抗体浓度；延长抗体孵育时间抗体失效，增加对照，选用新抗体；更换新的显色液，检查转膜条件
背景高	封闭效果不好；抗体浓度太高；上样量太高；转膜缓冲液中SDS量太高	更换封闭液种类（脱脂奶粉可更换为BSA）；增加抗体稀释倍数；；减少蛋白上样量；降低SDS浓度
棕色条带	抗体浓度高	稀释抗体浓度
白色空斑	膜未充分浸润平衡；转膜过程有气泡	用缓冲液/甲醇充分浸膜；操作仔细，赶走气泡
好多斑点	封闭液有杂质	配好的脱脂奶粉静置一会，使较大不溶的颗粒沉淀下去

## 显色条带大小不符合预期



实验现象	可能的原因	优化方案
条带大小不对	蛋白存在翻译后修饰；蛋白含有特殊氨基酸；蛋白上样量太大；蛋白降解	糖基化，磷酸化，羧基化；含有较多碱性氨基酸会降低电泳速率 溶酶菌，含有较多酸性氨基酸会增加电泳速率 胃蛋白酶；
有非特异性条带	蛋白样品问题；抗体浓度过高；一抗特异性不够或二抗存在非特异性结合；封闭不彻底	蛋白样品存在二聚体和多聚体；降低抗体使用浓度；更换抗体；4°C过夜封闭

## 内参条带不整齐



可能原因	优化方案
蛋白浓度测定不准；上样量不同	重新测定蛋白浓度，调整移液器
内参的选择有问题	内参蛋白并非在所有情况下表达都是均一的； $\beta$ -actin不适用于骨骼肌细胞，细胞生长条件的改变和细胞外基质成分的相互作用可能会改变肌动蛋白的合成； gapdh一些生理因素例如缺氧症和糖尿病会增强gapdh在特定细胞中的表达； 微管蛋白：微管蛋白的表达随着抗菌和抗有丝分裂抗性药物而改变。

Western虐我千百遍，  
我待Western如初恋！

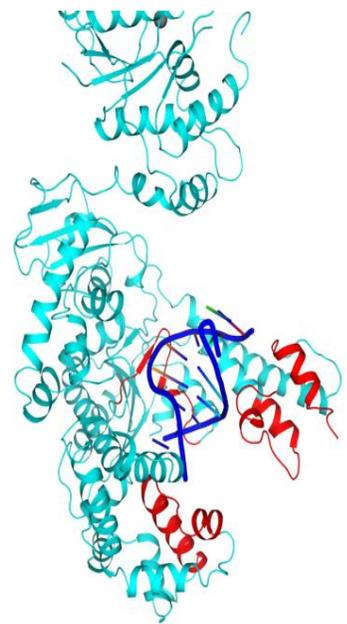
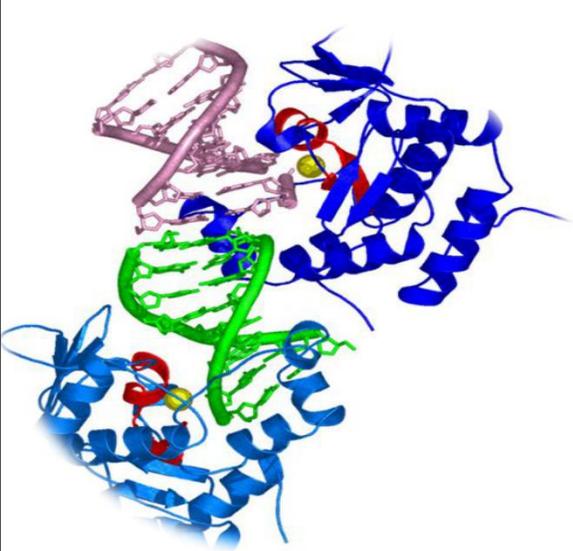
- 蛋白制备是关键
- 配胶细节定成败
- 蛋白定量要精准
- 跑胶上样要一致
- 还有时间和电压
- 封闭洗膜要充分
- 抗体选择和浓度
- 阳阴对照离不开





**THANK YOU!**

**扫描二维码，获得更多技术信息**



# 翊圣科技

