

WB技术指南

Technical Guide



LEADER IN BIOMOLECULAR
SOLUTIONS FOR LIFE SCIENCE

WB (WESTERN BLOT)

蛋白印迹法

WB (Western Blot) 即蛋白印迹法, 其原理是通过特异性抗体对凝胶电泳处理过的细胞或生物组织样品进行着色。通过分析着色的位置和着色深度获得特定蛋白质在所分析的细胞或组织中的表达情况的信息。

实验流程

蛋白免疫印迹一般由样本处理、凝胶电泳、样品的印迹和免疫学检测组成, 见图1。

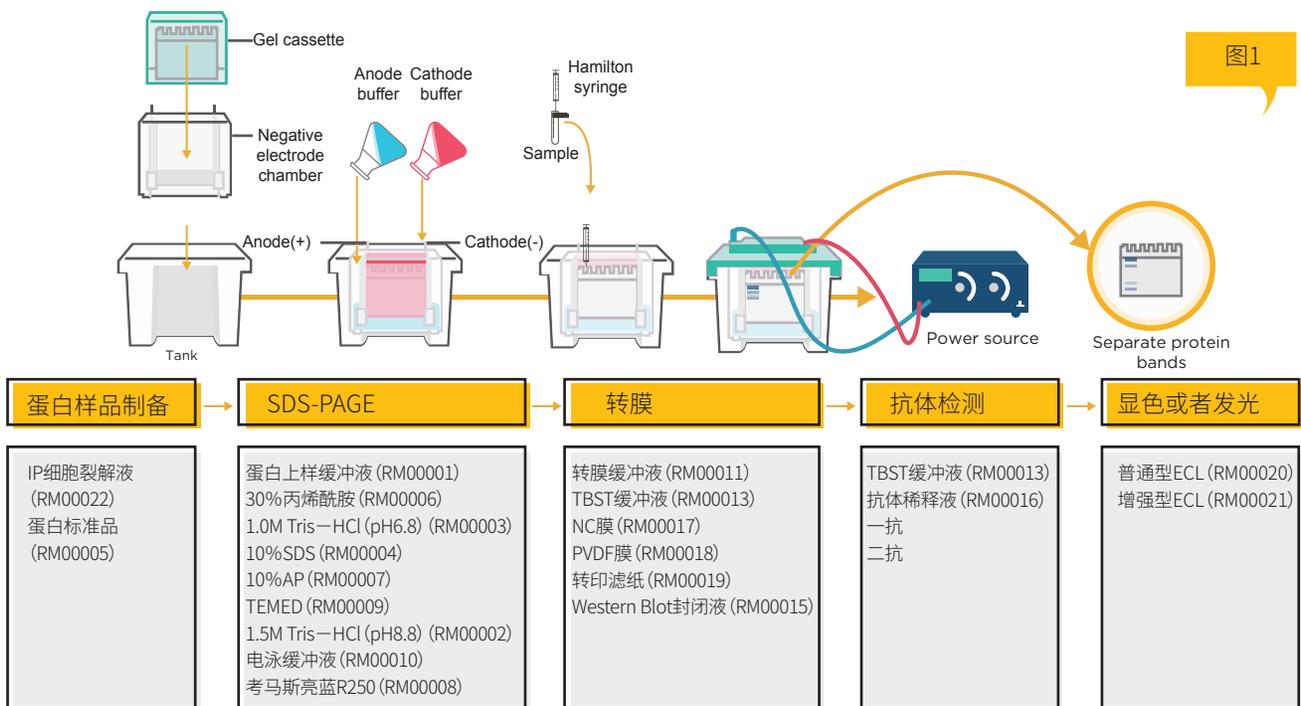


图1



01

样本处理: 样本经过处理后, 使样本中的蛋白能够解离出来, 用于后续的检测;

02

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;

03

转膜: 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) (RM00017) 和聚偏二氟乙烯膜 (PVDF 膜) (RM00018), 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;

04

免疫学检测: 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 (RM00020, RM00021) 或者通过膜上的颜色或X光底片上曝光的条带来显示抗原的存在。

实验步骤

(1) 样本制备

WB中检测样本来源主要是细胞、组织、微生物、植物等蛋白样本；

在WB检测中，样本中蛋白提取的是否充分，在整个WB检测中非常的重要。现在样品提取的方法是机械法、物理法和化学及生物化学方法。具体分类如下图所示：

A: 机械法

a 高速组织捣碎机(转速可达10000rpm, 具高速转动的锋利的刀片), 宜用于动物内脏组织的破碎;
b 玻璃匀浆器(用两个磨砂面相互摩擦, 将细胞磨碎), 适用于少量材料, 对细胞破碎程度较高速捣碎机高, 机械切力对分子破坏较小;

B: 物理法

反复冻融法、冷热交替法、超声波法、加压破碎法;

C: 化学及生物化学方法

有机溶媒法、自溶法、酶法、表面活性剂处理;
组织和细胞破碎过程用的常用的裂解液为RIPA裂解液。其中根据蛋白性质的不同, 我们选择的裂解液也不一样(见表1)。

表1

产品名称	Western及IP 细胞裂解液	RIPA裂解液(强)	RIPA裂解液(中)	RIPA裂解液(弱)	NP-40裂解液	SDS裂解液
有效裂解成分	1% Triton X-100	1% Triton X-100. 1% deoxycholate. 0.1% SDS(RM00004)	1% NP-40. 0.5% deoxycholate. 0.1% SDS	1% NP-40. 0.25% deoxycholate	1% NP-40	1% NP-40
裂解强度	温和	强	中	温和	温和	强
对膜蛋白的提取	一般	很好	较好	一般	一般	很好
对胞浆蛋白的提取	很好	很好	很好	很好	很好	很好
对核蛋白的提取	较好	很好	较好	较好	较好	很好
胞浆磷酸化蛋白提取	很好	很好	很好	很好	很好	很好
细胞核转录因子提取	很好	很好	很好	很好	很好	很好
含蛋白酶抑制剂	是	是	是	是	是	是
含磷酸酯酶抑制剂	是	是	是	是	是	是
主要用途	WB、IP、Co-IP	WB、IP	WB、IP	WB、IP、Co-IP	WB、IP、Co-IP	WB、ChIP

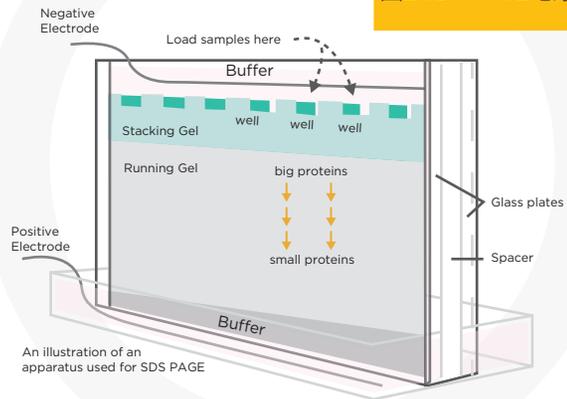
(2) SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

基本原理: 凝胶由两种不同的凝胶层组成。上层为浓缩胶, 下层为分离胶。浓缩胶为大孔胶, 缓冲液pH6.7, 分离胶为小孔胶, 缓冲液pH8.9。

在上下电泳槽内充以Tris—甘氨酸缓冲液(pH8.3), 这样便形成了凝胶孔径和缓冲液pH值的不连续性。在浓缩胶中HCl几乎全部解离为Cl⁻, 但只有极少部分甘氨酸解离为H₂NCH₂COO⁻。蛋白质的等电点一般在pH5左右, 在此条件下其解离度在HCl和甘氨酸之间。当电泳系统通电后, 这3种离子同向阳极移动。其有效泳动率依次为Cl⁻>蛋白质>H₂NCH₂COO⁻, 故Cl⁻称为快离子, 而H₂NCH₂COO⁻称为慢离子。电泳开始后, 快离子在前, 在它后面形成离子浓度低的区域即低电导区。电导与电压梯度成反比, 所以低电导区有较高的电压梯度。这种高电压梯度使蛋白质和慢离子在快离子后面加速移动。在快离子和慢离子之间形成一个稳定而不断向阳极移动的界面。由于蛋白质的有效移动率恰好介于快慢离子之间, 因此蛋白质离子就集聚在快慢离子之间被浓缩成一条狭窄带。

样品进入分离胶后,慢离子甘氨酸全部解离为负离子,泳动速率加快,很快超过蛋白质,高电压梯度随即消失。此时蛋白质在均一的外加电场下泳动,但由于蛋白质分子所带的有效电荷不同,使得各种蛋白质的泳动速率不同而形成一条条区带。但在SDS-PAGE电泳中,由于SDS这种阴离子表面活性剂以一定比例和蛋白质结合成复合物,使蛋白质分子带负电荷,这种负电荷远远超过了蛋白质分子原有的电荷差别,从而降低或消除了蛋白质天然电荷的差别;此外,由多亚基组成的蛋白质和SDS结合后都解离成亚单位,这是因为SDS破坏了蛋白质氢键、疏水键等非共价键。与SDS结合的蛋白质的构象也发生变化,在水溶液中SDS-蛋白质复合物都具有相似的形状,使得SDS-PAGE电泳的泳动率不再受蛋白质原有电荷与形状的影响。因此,各种SDS-蛋白质复合物在电泳中不同的泳动率只反映了蛋白质分子量的不同(见图2)。

图2:SDS-PAGE电泳图



在一定浓度的凝胶中,由于分子筛效应,则电泳迁移率就成为蛋白质分子量的函数,蛋白分子量在15KD~200 KD的范围内,电泳迁移与分子量的对数呈直线关系(见图3)。根据蛋白分子量大小的不同,选择不同浓度的分离胶用于实验(见表2)。

图3 电泳迁移与分子量的对数呈直线关系

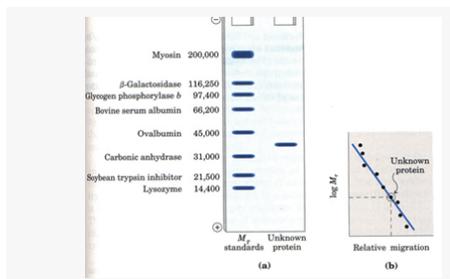


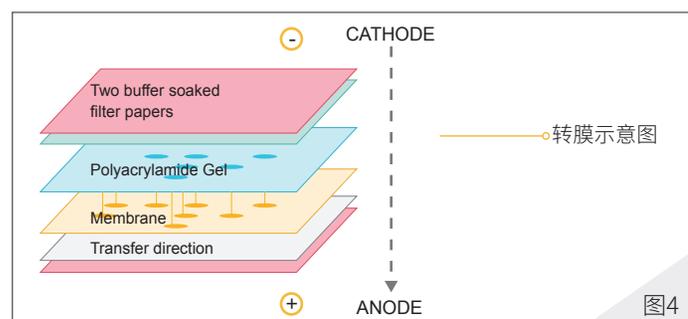
表2分子量范围与凝胶浓度的关系

分子量 (KD)	分离胶浓度
$X \leq 10$	15%
$10 < X \leq 15$	15%
$15 < X \leq 25$	13.5%
$25 < X \leq 35$	12%
$35 < X \leq 40$	11%
$40 < X \leq 55$	10%
$55 < X \leq 70$	9%
$70 < X \leq 100$	8%
$100 < X \leq 130$	7%
$X > 130$	6%

备注:X为目的蛋白大小

(3) 转膜

基本原理:SDS-PAGE凝胶中的蛋白带有SDS负电,在电场的作用下,带负电的蛋白会转移到膜上,如图4。



转膜方法一般有半干转法和湿转法。两者原理完全相同,只是用于固定胶/膜叠层和施加电场的机械装置不同。前者操作容易,转移效率高;而后者适用于分子量较大的蛋白(一般>100KD)转移,所用缓冲液多,见图5。



在转膜过程中,膜的选择非常重要。现在常用的有NC膜(RM00017)和PVDF膜(RM00018)。

NC膜:NC膜与蛋白质靠疏水作用结合,无需预先活化,对蛋白质的活性影响小;非特异性本底显色浅;价格低廉,使用方便。但小分子蛋白与NC膜结合力较差,洗涤时易丢失,同时NC膜韧性较差,易损坏;

PVDF膜:与蛋白质亲和力高,用前需在甲醇中浸泡,以活化膜上的正电基团,使其更容易与带负电荷蛋白结合。

几种膜的特点如下表3:

表3

	PVDF膜	NC膜	尼龙膜
背景	低	低	较高
蛋白结合能力	100-200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	80-100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	>400 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$
机械强度	强	膜干时很脆	软而结实
溶剂抗性	强	差	差
使用前处理	甲醛润湿	缓冲液润湿	缓冲液润湿
适用范围	糖蛋白检测和蛋白质测序	0.45 μm -一般蛋白 0.2 μm -分子量小于20KD蛋白 0.1 μm -分子量小于7KD蛋白	低浓度小分子蛋白、酸性蛋白、糖蛋白 和蛋白多糖(主要用在核酸检测中)
价格	高	较低	低

转膜效率验证

带负电荷的丽春红染料能够与膜上带正电的氨基酸发生可逆结合,以判断转膜效率。

转膜中的要点及建议

大分子量蛋白	转膜缓冲液里加入0.1%的SDS;甲醇浓度降到10%甚至更少,用4°C湿转过夜代替半干法转膜;增加转膜时间、电流/电压
小分子量蛋白	去净缓冲液里的SDS;保持甲醇浓度在20%;用小孔径的膜;降低转膜时间、电流/电压
膜的方向确定	转移后剪角做标记,分清正反面;用铅笔做记号或电泳时Marker上成非对称的
转膜后背景高	选择NC膜
转膜时污染	避免手指触碰膜,可以用镊子来取膜,油脂和蛋白质会弄脏膜
滤纸的大小	确保滤纸和膜的大小与胶一致,当使用半干法转膜时,过多的部分会阻碍电流穿过膜

(4) 免疫学检测

原理就是利用抗原和抗体的特异性反应,检测目的蛋白。实验流程如下:

- 01** 封闭:将转印膜取出, TBST(RM00013)洗一次5 min后,加入3%的脱脂牛奶封闭,于室温封闭1小时(封闭时间不得超过50-80min范围,时间过长和过短都会影响后期的结果)。洗膜1次, 10 min;
注意:膜取下之后很快会变干,如果是使用的PVDF膜,干了之后必须再次用甲醇进行活化,NC膜则无需此过程。
- 02** 一抗孵育:一抗(3%脱脂牛奶抗体稀释液)(RM00016),摇床“SPEED”档位调到20,4度孵育过夜。摇床“SPEED”档位调到40, TBST洗膜3次,每次5 min;
- 03** 二抗孵育:按说明书推荐的浓度稀释二抗(稀释液为TBST),摇床“SPEED”档位调到20,室温孵育60min。摇床“SPEED”档位调到40, TBST洗膜4次,每次5 min。一般用的二抗都是HRP(辣根过氧化物酶)标记的。
- 04** 显影:WB检测中显影的常用方法根据催化底物不同,可以分为化学发光法和底物显色法。

在WB检测中，常用的酶是HRP（辣根过氧化物酶）和AP（碱性磷酸酶）。其中用的较多的是HRP。选用不同底物，出现的结果也不一样。具体如下表4：

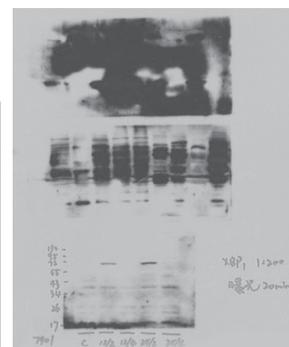
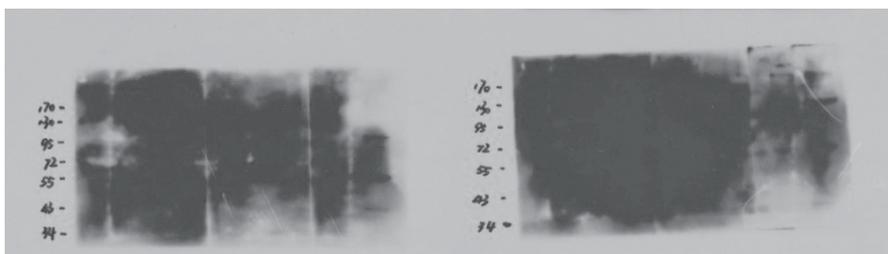
表4

底物	DAB	4-CN	AEC	TMB	ECL
稳定性	好	一般	避光	好	避光
灵敏度	250pg	1ng		100pg	10pg
背景	一般	低	高	高	低
终产物成像性	不能很好的成像	容易成像	蓝紫色	容易成像	容易成像
颜色	褐色	介于蓝色与蓝紫色之间	棕红色	蓝紫色	发光
毒性	有	无	有	无	有

WB操作不当案例分析

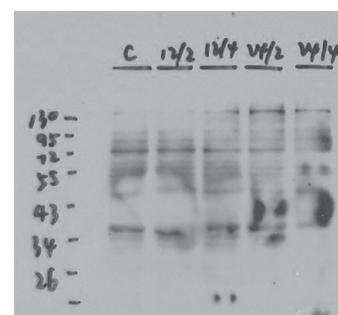
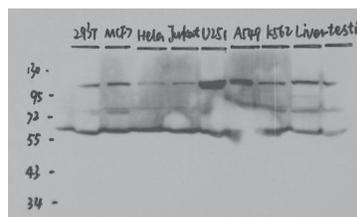
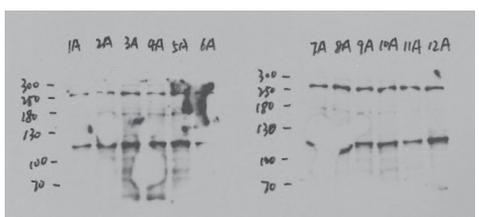
A

封闭不完全；抗体或血清非特异结合；



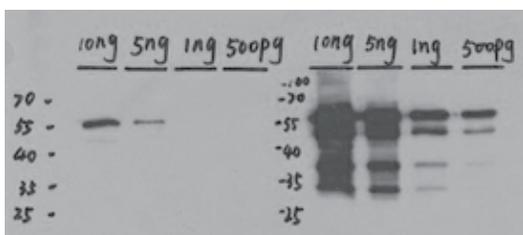
B

转膜未转完全、抗体效价过低或目的蛋白丰度过低（导致信号弱、部分信号、条带不完整），以及转膜不当造成气泡（转膜过程中，凝胶和膜没有充分贴合，出现空泡现象。检测结果中此区域的信号会较弱，影响结果判定）；



C

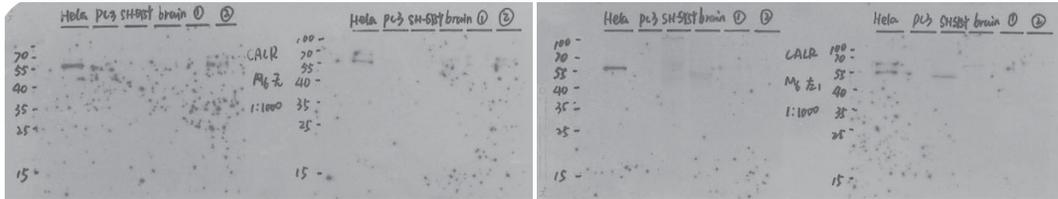
蛋白样本降解（蛋白样本降解后，检测到弥散或多条带）；



D

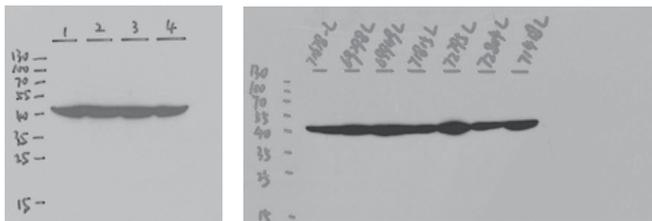
封闭液中奶粉未完全溶解；

封闭液中脱脂奶粉未完全溶解，溶液中的颗粒吸附在膜表面，颗粒占据的位置就没有封闭完全，检测结果中就会出现斑斑点点；



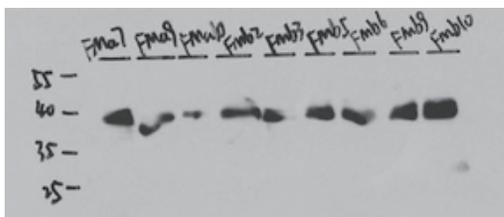
E

样本上样量过大或抗体稀释度过小，检测结果中，条带连成一片；



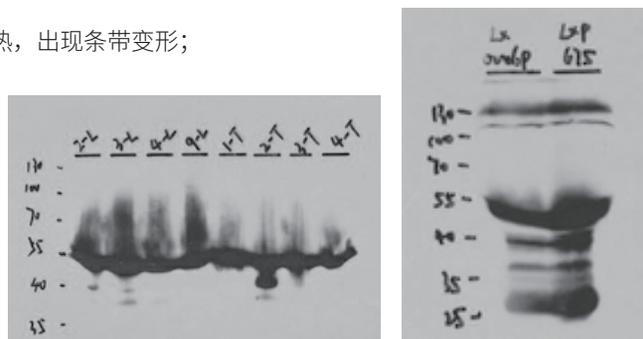
F

制备凝胶不均匀（在不均匀的位置，检测的条带形状会出现变形）；部分信号淬灭（可能膜放较长时间）导致曝光不好；



G

样品浓度太高；电压不稳或凝胶在电泳过程中过热，出现条带变形；



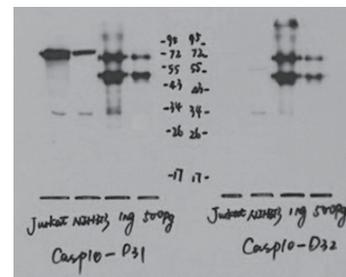
H

胶片过度曝光；封闭不完全；



I

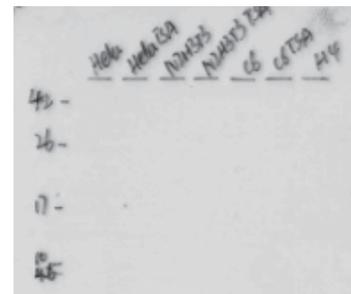
膜变形，容易造成膜表面吸附蛋白的能力不均匀，使得检测结果中条带有空洞，条带粗细不均一等现象；封闭牛奶太多，抗体吸附到牛奶上；



J

无带。原因：比较多，如果单纯一张没有任何显色的X光片，最可能是一抗加成其他抗体，或者二抗种属加错了，比如兔的加成鼠的。

经验：上面的图片展示的是一点信号都没有，如果是这样大部分情况是抗体加错了。如果中间出现了细微的条带，可能原因是蛋白上样量太少，一抗浓度过低，ECL发光液失效。对于小分子的蛋白，确定是否是转膜时间较长，蛋白已穿透膜，为避免，小分子转膜时可用两张膜叠放在一起，转膜结束之后确定第二张膜上是否有预染MARKER，以确定转膜时间。



总结:高背景

原因

上样量过多

封闭不足

抗体过强

洗涤不充分

修饰、剪切

蛋白降解

建议

减少上样量

封闭剂选择优化;封闭浓度增加,溶解充分,增长时间

降低抗体浓度,使用单抗;一抗4度孵育,二抗减少孵育时间

充分洗涤及防止干燥

查阅数据库文献,了解目的蛋白;换用特异性一抗

加入蛋白酶抑制剂;制样冰上操作;用新鲜样本

总结:条带大小不正确

原因	建议
修饰、剪切	抗体说明书、数据库文献,了解蛋白
多聚体	样品充分变性还原(确定样本变性过程中是否加入还原剂),70°C煮样
重组蛋白	检测是否存在外源重组蛋白
特殊蛋白	仔细阅读抗体说明书,了解蛋白的背景知识,明确蛋白检测大小
目的蛋白被降解	用蛋白酶抑制剂

生化试剂目录

货号	产品名称	规格	价格
RM00001-1	SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (5*)	1mL	20 ¥ /mL
RM00002-100	1.5M Tris-HCl(pH8.8)	100mL	30 ¥ /100mL
RM00002-250	1.5M Tris-HCl(pH8.8)	250mL	60 ¥ /250mL
RM00003-100	1 M Tris-HCl(pH6.8)	100mL	30 ¥ /100mL
RM00003-250	1 M Tris-HCl(pH6.8)	250mL	60 ¥ /250mL
RM00004-50	10% SDS	50mL	50 ¥ /100mL
RM00004-100	10% SDS	100mL	100 ¥ /250mL
RM00005-1	蛋白标准品	1mL	20 ¥ /mL
RM00006-250	30% Acr-Bis(29:1)	250mL	150 ¥ /250mL
RM00006-500	30% Acr-Bis(29:1)	500mL	250 ¥ /500mL
RM00007-1	AP	1g	10 ¥ /1g
RM00007-5	AP	5g	40 ¥ /5g
RM00008-5	Coomassie brilliant blue R250	5g	80 ¥ /5g
RM00008-10	Coomassie brilliant blue R250	10g	150 ¥ /10g
RM00009-5	TEMED	5mL	40 ¥ /10mL
RM00009-10	TEMED	10mL	20 ¥ /5mL
RM00010-2	Tris-glycine-SDS 电泳缓冲液 (1*)	2L	50 ¥ /2L
RM00010-5	Tris-glycine-SDS 电泳缓冲液 (1*)	5L	100 ¥ /5L
RM00011-2	转膜缓冲液 (1*)	2L	50 ¥ /2L
RM00011-5	转膜缓冲液 (1*)	5L	100 ¥ /5L
RM00012-2	PBS 缓冲液 (1*)	2L	10 ¥ /2L
RM00012-5	PBS 缓冲液 (1*)	5L	20 ¥ /5L
RM00013-2	TBST 缓冲液 (1*)	2L	80 ¥ /2L
RM00013-5	TBST 缓冲液 (1*)	5L	160 ¥ /5L
RM00014-25	脱脂奶粉	25g	10 ¥ /25g
RM00015-100	Western Blot 封闭液	100mL	100 ¥ /100mL
RM00015-250	Western Blot 封闭液	250mL	200 ¥ /250mL

货号	产品名称	规格	价格
RM00016-100	抗体稀释液	100mL	100 ¥/100mL
RM00016-250	抗体稀释液	250mL	200 ¥/250mL
RM00017-1	NC 膜	6.3×8.3cm, 0.45μm, 20 pcs	300 ¥/20 张
RM00018-1	PVDF 膜	6.3×8.3cm, 0.2μm, 20 pcs	500 ¥/20 张
RM00019-1	转印滤纸	7.5×10cm, 100 pcs	60 ¥/100 张
RM00020-1	ECL 化学发光底物 (普通型)	50mL	260 ¥/ (50+50) mL
RM00020-2			
RM00021-1	ECL 化学发光底物 (增强型)	50mL	300 ¥/ (50+50) mL
RM00021-2			
RM00022-100	IP 细胞裂解液	100mL	150 ¥/100mL