

蛋白质 Western Blot 标准操作规程

方案来源:

分子克隆实验指南（第四版），第十九章，方案9 蛋白质的免疫印迹分析

*有修改，具体原理及方法参考末尾文献

*电泳参见 SDS-PAGE 相关实验操作规程，**本文重点介绍转膜及其后续操作**

*Western Blot 主要使用硝酸纤维素膜（NC）和聚偏二氟乙烯膜（PVDF）。在低离子转膜缓冲液环境下，大多数带负电荷蛋白质会与膜发生疏水作用而高亲和结合；在非离子型去污剂作用下，结合的蛋白还可以被洗脱下来。NC 膜可直接使用但易破损。PVDF 膜在使用前需用甲醇浸泡活化。PVDF 膜不易破裂或卷曲，所以使用更广泛。根据被转移的蛋白分子量大小，选择不同孔径的 NC 膜或 PVDF 膜。通常使用 0.45 μm 和 0.2 μm 两种规格，大于 20 kDa 的蛋白可用 0.45 μm 的膜，小于 20 kDa 的蛋白则应选用 0.2 μm 的膜。

*蛋白质常用转移方法主要有：槽式湿转和半干转移。前者转移效率高，但操作繁琐；后者所用缓冲液少，时间短（约 20min），操作简便，但仪器成本高。

本实验方案采用槽式湿转。

实验器材和试剂（试剂及各种缓冲液配制方法详见附录 1）：

- ✓ 湿转系统（含 PVDF 膜、滤纸等配套设施）、化学发光检测系统及分析软件、搪瓷盘、方形塑料盒若干、PE 手套、镊子（平口）、玻棒
- *蛋白印迹和检测设备多个厂家均有生产销售，建议选用同一制造商的配套设备，如 Bio-rad Wet/Tank Blotting Systems、Imaging Systems and Software 等，并按照制造商提供的操作手册组装使用。
- *PVDF 膜除 Biorad 和 Thermo scientific 产品外，Millipore 0.45 μm (IPVH 00010) 和 0.22 μm (ISEQ 00010)。
- *滤纸除 Biorad 产品外，也可适用 Whatman 滤纸 0.34mm 三层或 1mm 单层。
- ✓ 抗体（一抗根据具体实验进行选择，二抗可使用辣根过氧化物酶耦联的抗体）
- ✓ 转膜缓冲液
- ✓ 脱脂奶粉或 BSA
- ✓ TBS
- ✓ Tween 20
- ✓ DAB 显色液

转膜

- ① 将 PVDF 膜在甲醇溶液中浸泡 5 sec, 使膜表面充分和甲醇接触 (可观察到膜变为半透明)。
- ② 准备转移缓冲液, 依据胶的大小剪取膜和滤纸 6 片, 将凝胶和 PVDF 膜和滤纸放入转移缓冲液中平衡 5 min。
- ③ 装配转移三明治 (海绵→滤纸→胶→膜→滤纸→海绵): 在加有转移液的搪瓷盘里放入转膜用的夹子、两块海绵垫、一支玻棒、滤纸和浸泡过的膜; 将夹子打开使一面保持水平 (规定为正极)。在上面垫一张海绵垫, 用玻棒来回擀几遍以擀走里面的气泡。在垫子上垫三层滤纸, 一手固定滤纸一手用玻棒擀去其中的气泡。依次加膜、加胶, 再在膜上盖 3 张滤纸并除去气泡, 如下图 1。

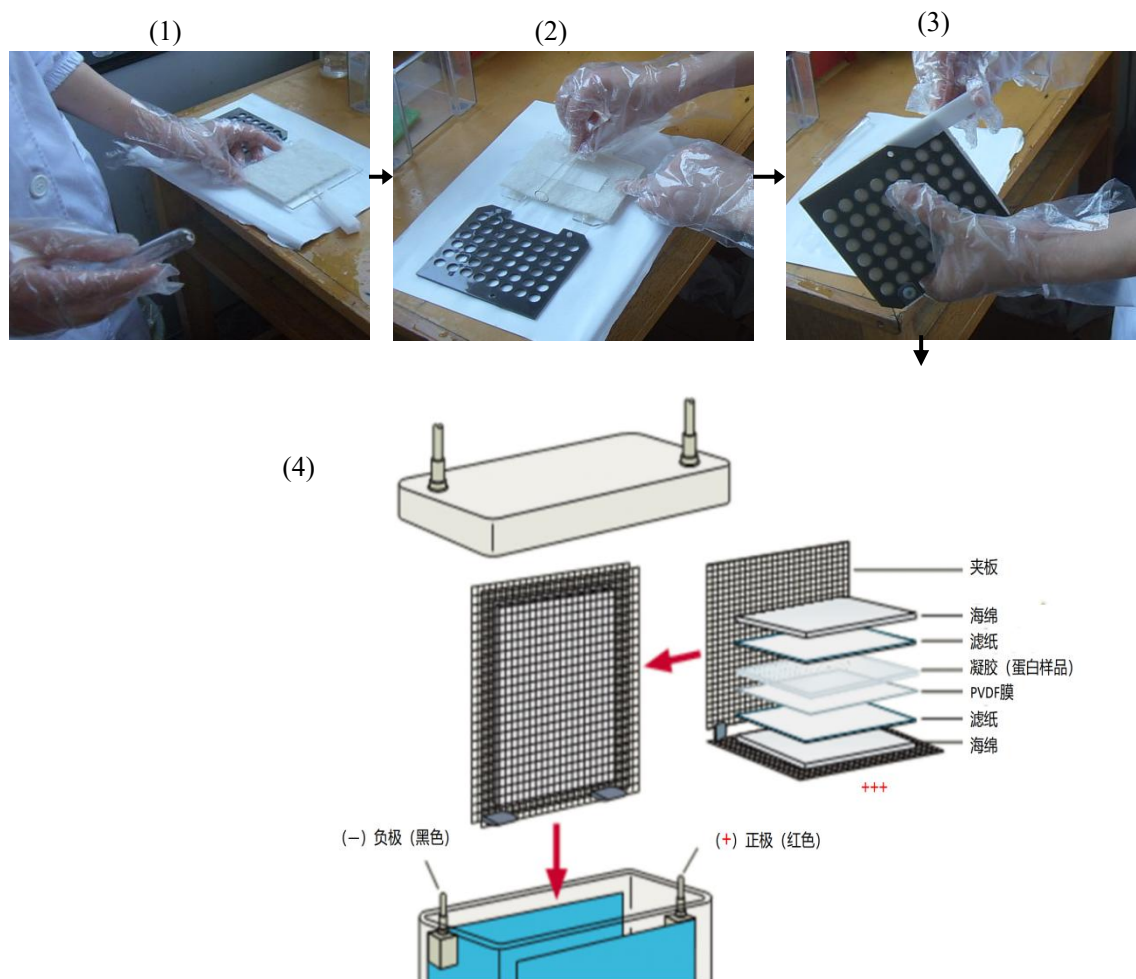


图 1 转膜电泳仪安装

- ④ 注入转移缓冲液, 放入转印三明治, 加入冰袋, 于 100V 电泳 45 min (电流约为 300 mA, 具体视样品蛋白大小而定)。
- ⑤ 电泳结束, 观察预染的蛋白质 Marker 是否转移到膜上。



图 2



图 3



图 4

杂交并显影

- ① 用 25 mL 洗涤缓冲液洗涤 PVDF 膜 1 次, 5 min。
- ② 封闭 PVDF 膜: 加封闭缓冲液 20 mL, 37℃ 封闭 1 h 或者 4℃ 封闭过夜。用量以浸没整张膜为准, 图 2。
- ③ PVDF 膜孵育一抗: 加抗体稀释液 20 mL, 将 20 μ L 一抗加入塑料盒中, 37℃ 孵育 2 h, 见图 3 和图 4。
(孵育时间视最终杂交结果而定, 也可以 4℃ 孵育过夜)
- ④ 用 25 mL 洗涤缓冲液振荡洗涤 PVDF 膜 3 次, 每次 5 min。
- ⑤ PVDF 膜孵育二抗: 加入 20 mL 抗体稀释液, 将 20 μ L 二抗加入培养皿中 (以完全覆盖膜为准), 37 °C 孵育 1.5 h。
- ⑥ 用 30 mL 洗涤缓冲液振荡洗涤 PVDF 膜 4 次, 每次 5 min。
- ⑦ DAB 显影 (6 mL): 按每 2 mL 蒸馏水加显色剂 A, B, C 各 1 滴。混匀后加至膜上, 室温显色 5-10 min。
若无背景出现则可继续显色, 显色后用蒸馏水洗涤以终止反应。
- ⑧ 采集图像。

注意事项:

- ① 操作中应戴手套, 不要用手触摸。
- ② 如检测小于 30 kDa 的蛋白应用 0.2 μ m 的膜, 并可省略转移时的平衡步骤。
- ③ 某些抗原和抗体可被 Tween-20 洗脱, 此时可用 1.0% BSA 代替 Tween-20。
- ④ 关于封闭剂的选择: 5% 脱脂奶/TBS or PBS: 能和某些抗原相互作用, 掩盖抗体结合能力; 0.3~3% BSA in PBS: 低的内源性交叉反应性。
- ⑤ 如要同时检测大分子量和 small 分子蛋白, 最好用梯度胶分离蛋白。
- ⑥ 抗体稀释倍数及显影方式依据各自说明书操作。

附录 1 转膜缓冲液 (10×)

➤ 配方 (1000mL) :

组分	用量	1X 终浓度
Tris (生工生物 A100826 ; MW: 121.14)	30.28g	25mM
Glycine (生工生物 A100167 ; MW: 75.07)	144.13g	192mM
ddH ₂ O	定容至 1000mL	

➤ 配制方法 (1000mL) :

- ✓ 称取 Tris 30.28g, 甘氨酸 144.13g, 加入 1000mL 烧杯中;
- ✓ 加 800mL 蒸馏水, 搅拌使其充分溶解;
- ✓ 倒入 1000mL 试剂瓶中, 用蒸馏水定容至 1000mL 刻度线, 4℃ 保存;
- ✓ 使用时取 100mL, 加蒸馏水 500mL, 甲醇 200mL 至工作浓度 (1×)。用去离子水调整体积至 1L。

TBS (20×)

组分	用量	1X 终浓度
NaCl (生工生物 A610476 ; MW: 58.44)	160g	137mM
KCl (生工生物 A100395; MW: 74.55)	4g	2.7mM
Tris base (生工生物 A100826 ; MW: 121.14)	60.6g	25mM
ddH ₂ O	定容至 1000mL	

用盐酸调节 pH 至 7.4

➤ 配制方法 (1000mL) :

- ✓ 称取 NaCl 160g, KCl 4g, Tris base 60.6g 加入 1000mL 烧杯中;
- ✓ 加 800mL 蒸馏水, 搅拌使其充分溶解; 用盐酸调节 pH 至 7.4;
- ✓ 倒入 1000mL 试剂瓶中, 用蒸馏水定容至 1000mL 刻度线, 4℃ 保存;
- ✓ 使用时取 50mL 20×TBS 储液, 用去离子水调整体积至 1L。

➤ 1 X TBST 配制方法 (1000mL)

取 50mL 20×TBS 储液, 加蒸馏水 500mL, 1mLTween20, 混合均匀。用去离子水调整体积至 1L。配制成 1×TBST 溶液。

丽春红染色液 (0.1% w/v 丽春红, 5% v/v 乙酸, ddH₂O)

封闭缓冲液 (1 X TBST, 5% w/v 脱脂奶粉或 1%-5% BSA)

*由于每对抗原-抗体有各自的特性, 因而没有一种封闭液是万能的。如果实验背景噪声高, 可适当调高封闭液里牛奶和 BSA 浓度。

一抗

选择特异性针对目标蛋白的抗体。一抗储备液可短期存放在 4℃。若需长期存放, 可分装后冻存于 -70℃。用封闭液按生产厂商的建议将一抗稀释至工作浓度, 通常在 (1: 1000) ~ (1: 10000), 或 0.2 ~ 1 μg/mL 的工作浓度。

HRP 偶联的二抗

选择能与一抗特异性结合的 HRP 偶联物。例如, 如果单克隆 IgG 抗体用作一抗, 那么二抗应为抗鼠 IgG 的抗体 (几乎所有的单克隆 IgG 抗体都是用小鼠生产)。某些其他类型的单抗如 IgM, 则需要与之类型相匹配的二抗。如果一抗是多克隆抗体, 需确定其由哪种动物 (多数是兔, 也可能是羊或者其他大动物) 产生, 再选择相应的 HRP 偶联的二抗。按生产厂商的建议, 用封闭液将二抗稀释至工作浓度, 通常在 (1: 5000) ~ (1: 50000), 或者 20 ~ 200 ng/mL。最佳的稀释度取决于特定的 HRP 偶联物、膜上的抗原量以及检测系统。

洗涤缓冲液 (1 X TBST)

参考文献

1. M.R. 格林, J. 萨姆布鲁克. 分子克隆实验指南 (第四版), 第十九章, 方案 9 蛋白质的免疫印迹分析.
2. Burnette, W.N. (1981). Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A, Anal. Biochem., 112 (2), 195-203.
3. Towbin, H., et al. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 4350-4354.