



Western Blot

免疫印迹 (Western Blot) 是将蛋白质转移到膜上, 然后利用抗体-抗原特异反应进行检测。对已知表达蛋白, 可用相应抗体作为一抗进行检测; 对新基因的表达产物, 可通过融合部分的抗体检测。从下面原理, 主要步骤, 常见问题以及蛋白定量几个方面来介绍下 WB。

一、原理

与 Southern 或 Northern 杂交方法类似, 但 Western Blot 采用的是 PAGE, 被检测物是蛋白质, “探针”是抗体, “显色”用标记的二抗。经过 PAGE 分离的蛋白质样品, 转移到固相载体 (NC 或者 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。以固相载体上的蛋白质或多肽作为抗原, 与对应的抗体起免疫反应, 再与酶或同位素标记的第二抗体起反应, 经过底物显色或放射自显影以检测电泳分离的特异性目的基因表达的蛋白成分。该技术也广泛应用于检测蛋白水平的表达。

现常用的有底物化学发光 ECL 和底物 DAB 呈色, 底物化学发光 ECL 比较通常, 操作也比较简单, 基本原理是由于二抗用 HRP 标记, 其反应底物为过氧化物+鲁米诺, 也就是 HRP 标记的二抗用 ECL 底物检测, 即发光, 可使胶片曝光, 就可洗出条带。

二、主要步骤

1. **蛋白质抽提**: RIPA Buffer 或者其他蛋白提取方法。
2. **蛋白质定量**: 按 Bradford 蛋白质定量试剂盒 (或者 BCA 等其他蛋白定量方法) 操作说明操作, 测定样品浓度。
3. **SDS-PAGE**: 将准备好的样品液和预染蛋白 marker 分别上样, 标准加进第一个孔中, 电泳分离蛋白。
4. **转膜**: 蛋白质转移到 PVDF 膜, 按 Bio-Rad 蛋白转移装置说明组装滤纸凝胶纤维素夹层, 300mA 恒流条件下, 2h。
5. **Western blot 膜的封闭和抗体孵育**:
膜在 5% 脱脂奶粉溶液中室温孵育 1 小时以封闭膜上的非特异结合。
封闭过的膜加入一抗室温孵育 1.5 小时或者 4 度过夜, 抗原抗体结合。
加入 HRP 标记的二抗体以结合一抗, 室温孵育膜 1 小时。
6. **Western blot 结果检测**: 化学发光法检测, 膜与化学发光底物孵育, 经 X 胶片曝光显影。图片扫描保存为电脑文件, 并灰度分析。
7. **内参标定**: Stripping buffer 洗去目的蛋白抗体, 重新标定内参 Tubulin/Histone。
8. **Western blot 数据分析**: 目的蛋白的灰度值除以内参 Tubulin/Histone 的灰度值以校正误差, 所得结果代表某样品的目的蛋白相对含量。

三、实验常见的问题分析

1. 同一蛋白样品能同时进行两种因子的 Western Blot 检测吗?
解答: 当然可以, 有的甚至可以同时测几十种样品; 如果分子量相差比较多, 可以把膜从中间剪开; 如果相差较小, 可以标定完一个表达量低的; stripping 之后, 再标定表达量较高的。
2. 如果目标蛋白是膜蛋白或是胞浆蛋白, 操作需要注意什么?
解答: 如果是膜蛋白和胞浆蛋白, 所用的去垢剂就要温和得多。
3. 样品的蛋白含量很低, 每微升不到 1 微克, 但是在转膜时经常会发现只有一部分蛋白转到了膜上, 就是在转膜后染胶发现有的孔所有的蛋白条带都在, 只是颜色变淡了, 有什么办



法可以解决?

解答: 加大上样量; 减少电流延长时间; 多加 5-10% 甲醇。

4. 想分离的蛋白是分子量 260kd 的, SDS-PAGE 电泳的分离胶浓度多大合适? 积层胶的浓度又该用多少? 这么大分子量的蛋白容易作 Western Blot 吗?

解答: 260kd 的蛋白不好做, 分离胶用 6-8%, Stacking Gel 3.5-4%。

5. 蛋白变性后可以存放多久?

解答: -80°C, 一两年没有问题。最关键两条: 不要被蛋白酶水解掉; 不要被细菌消化掉(也是被酶水解了)。

6. 一次上样的蛋白总量是多少, 跟目的蛋白的表达量有关系吗?

解答: Western Blot 一般上样 30-100 微克不等, 结果跟目的蛋白的丰度、上样量、一二抗的量和抚育时间都有关系, 也与显色时间长短有关。开始摸条件时, 为了拿到阳性结果, 各个步骤都可以量多一点时间长一点, 当然背景也就出来了。要拿到好的结果, 如果抗体好的话比较容易, 抗体不好的话就需要反复地试了, 当然有的不适合 Western Blot 的怎样做也不行。所以拿到好的结果不容易。

7. 一抗, 二抗的比例是否重要?

解答: 比较重要, 调整好一抗, 二抗的比例, 可以去掉部分非特异的背景。可以先做几个梯度的预实验看看哪个比例合适, 再做正式实验。

8. Western Blot 中抗体的重复应用问题

解答: 抗体工作溶液一般不主张储存反复使用, 但是如抗体比较珍贵, 可反复使用 2-3 次。稀释后应在 2-3 天内使用, 4 度保存, 避免反复冻融。

9. 在做 Western Blot 时, PVDF 膜用甲醇浸泡的目的?

解答: PVDF 膜用甲醇泡的目的是为了活化 PVDF 膜上面的正电基团, 使它更容易跟带负电的蛋白质结合, 做小分子的蛋白转移时多加甲醇也是这个目的。

10. 蛋白预染 marker 8 条带, 电泳总跑不全 8 条带, 请问什么原因? 怎样改善?

解答: 一般来说, 是小分子量 Marker 跑走了, 增加胶浓度或减少电泳时间试试看。当然有时候 marker 也有可能降解。

11. 是否 Western Blot 实验半定量一定要加内参?

解答: 对于发表文章的实验最好加内参, 实验严谨。

12. 核内抗原 Western Blot 内参选择什么合适?

解答: 可选 Histone, 组蛋白在细胞核中的表达是很稳定的。信诺金达的 WB 技术服务选的是 Histone3.1。

13. 怎样才能把胶跑的非常漂亮, 泳道和 band 都能很直?

解答: 影响跑胶跑的质量, 有以下几个因素: 1、电压, 小的电压会使胶的分子筛效应得到充分发挥。电压越小, 条带越漂亮, 浓缩胶 80v, 分离胶 100v 就能跑得很好。2、胶的均匀度, 胶越均匀, 条带越窄, 分离越均匀。倒胶之前, 一定要充分混匀, 玻璃板一定要干净, 双蒸水隔离时, 一定要轻轻地加上去, 避免稀释上层的分离胶, 使胶不均匀。

小技巧: 把每条 lane 的上样量用 loading buffer 调成一样, 可使条带比较直!

14. 转膜时何为湿法, 何为半干法?

解答: 半干法和湿法转移是两种不同的转移装置下的转移系统, 将膜, 胶, 滤纸整个浸泡在 buffer 的 Tank 里转移的, 叫湿法; 用滤纸吸 buffer 来做转移体系的叫半干法。

15. 背景很花, 当然条带也很淡, 如果我在显影液中多洗一会儿, 背景就很深, 以致无法辨认, 但有时条带又很明显, 背底很淡。

解答: 这跟你 washing 的时间和强度有关, 很可能你在这方面没有掌握好。显影时间是有范围的, 久了肯定不行。



16. 怎样分析结果，需要什么软件？

解答：如果你做定量或办定量，至少要用到一个光密度扫描分析软件比如 ImageJ（下面会有专门介绍），如果不是，直接分析就可以。

17. 非特异条带比较多，如何分析？

解答：非特异性的条带和背景高：可能性太多了，一抗，二抗，封闭的原因都可能。

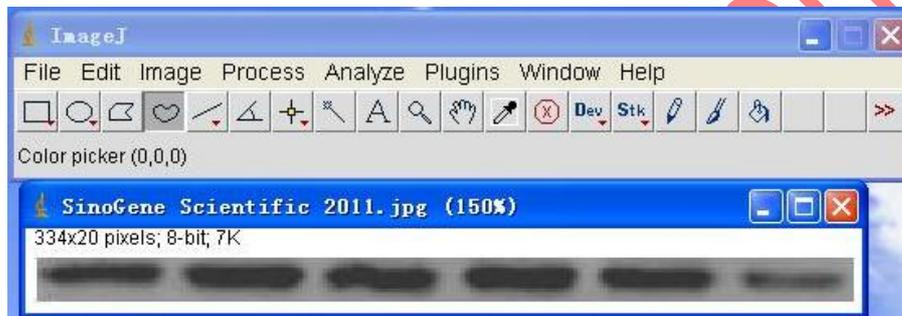
四、ImageJ 如何进行蛋白定量？

WB 是研究蛋白表达的一个经典方法。对于一些时间点或者是不同组织蛋白表达量的分析，就涉及到量的变化。一些凝胶成像软件带有此分析工具，比如 Bio-Rad, Kodak, Li-cor 等公司的成像系统。除了这些软件，还有一个比较简单的图像处理软件 ImageJ 可以很方便的进行灰度分析。ImageJ 主页是

<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>，更多资料可以访问。这里只是简单介绍一种灰度分析的方法。

很容易就能从主页下载并安装 ImageJ，从下面简单的几步操作就能完成 WB 定量分析。

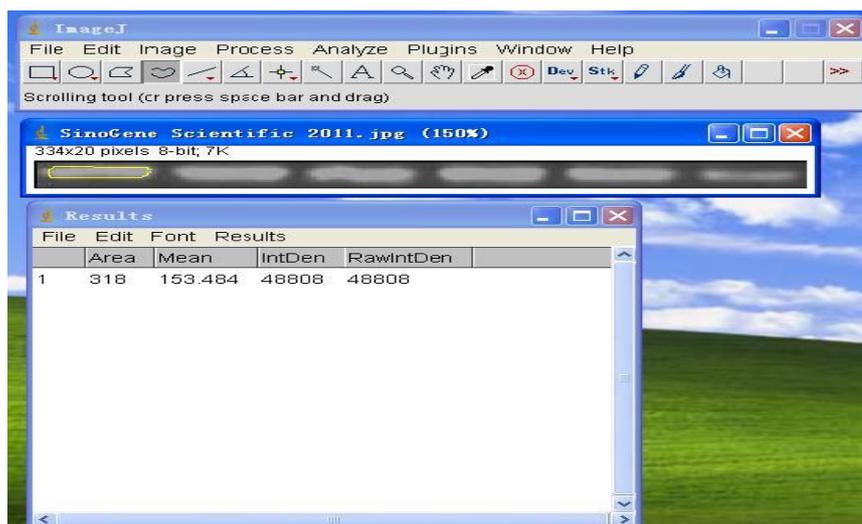
1. 打开文件；
2. 把图片转化成灰度图片：*Image>Type* 选 8-bit；



3. 消除背景影响：*Process>Subtract Background*. 选择 50 基本可以。
4. 设置定量参数：*Analyze>Set Measurements*, 点击面积，平均密度，和灰度值及 Integrated Density；
5. 设置单位 *Analyze>Set Scale*, 在“Unit of length” 边的方框里输入 "pixels"；
6. 把图片转换成亮带，*Edit>Invert* ；

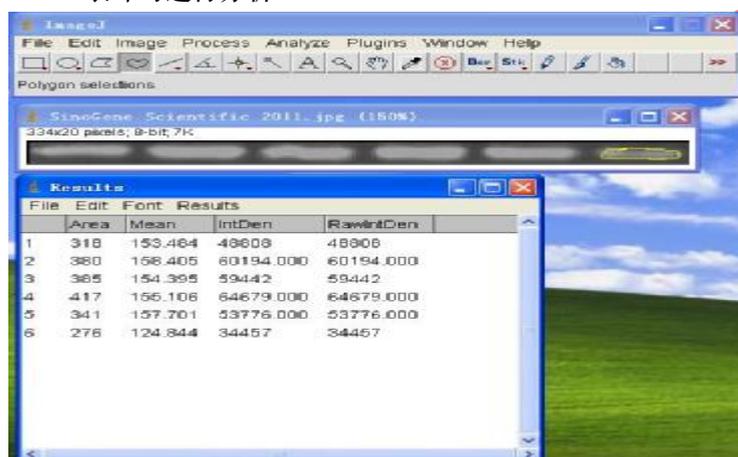


7. 选择 Freehand Selection；尽量把条带圈起来； 点击键盘 m，出来 IntDen 灰度值；



10. 用“Freehand Selection”选择下一条带，按 m 进行测量。

11. 当测定完所有条带，选结果中的“Edit”的“Select All”，然后复制数据“IntDen”到 Excel 表即可进行分析。



北京信诺金达生物科技有限公司
地址：北京海淀区东北旺南路一号院北 321
电话：010-62419956 传真：010-62419956
www.sinogenesci.com sinogenesci@163.com