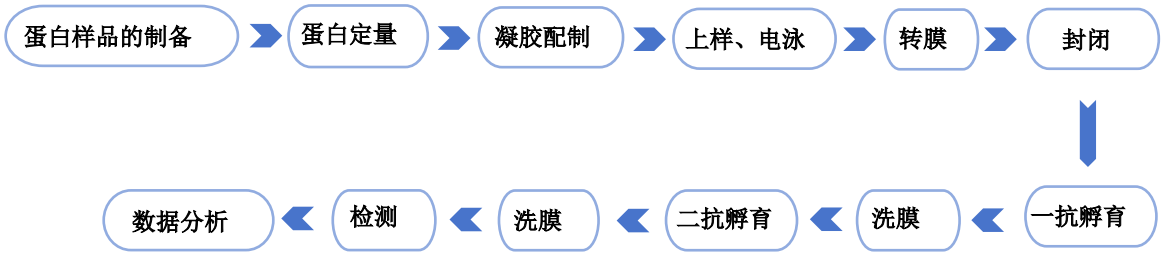
蛋白免疫印迹（Western Blot）

实验操作指南

Western Blot（蛋白免疫印迹实验）是分子生物学、生物化学和免疫遗传学中常用的一种定性、定量检测蛋白表达的经典、有效的技术方法，结合化学发光检测，可以同时比较多个样品同种蛋白的表达量差异。其主要原理为将经过 PAGE 分离的细胞或组织总蛋白质从凝胶转移到固相支持物 NC 膜或 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，经过底物显色或底物化学发光以检测电泳分离的特异性目的基因表达的蛋白成分。Western blot 实验目前被广泛应用于基因在蛋白水平的表达研究、抗体活性检测和疾病早期诊断等方面的研究。

■ 实验流程



■ 实验准备

仪器：高压灭菌锅、高速离心机、分光光度仪、冰箱（4℃，-20℃）、垂直板电泳转移装置、恒温水浴锅、脱色摇床、移液枪等。

试剂：RIPA 裂解液、0.01mol/L PBS (pH7.3)、快速 PAGE 凝胶制备试剂盒、G250 考马斯亮蓝溶液、0.15mol/L NaCl 溶液、2X（5X）SDS 上样缓冲液、电泳缓冲液、转移缓冲液、10X 丽春红染液、蛋白印迹膜再生液、封闭液、TBST、TBS、抗体、化学发光试剂等

耗材：各种规格的吸头、离心管、烧杯、量筒、培养皿等玻璃器材、PVDF 膜、乳胶手套、口罩、保鲜膜、玻棒、计时器、滤纸、称量纸等

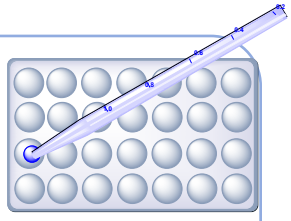
■ 实验步骤

1. 样品制备

根据要提取的目标蛋白的性质选择合适的裂解液，在样本提取过程中需要加入适当的蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂，以避免蛋白的降解以及磷酸化信号丢失。

产品名称	编号	规格	售价（元）	储存条件
PMSF(100mM)	PM001	10 mL	98.00	负 20℃
RIPA 裂解液（弱）	RI001	100 mL	168.00	负 20℃
RIPA 裂解液（中）	RI002	100 mL	168.00	负 20℃
RIPA 裂解液（强）	RI003	100 mL	168.00	负 20℃
	RI004	10 mL	25.00	负 20℃

2. 蛋白定量



在得到样本裂解液之后，为了保证各组样品蛋白质含量一致，需要进行蛋白质浓度测定。蛋白质浓度测定的方法包括 **Lowry 法、Bradford 法、BCA 法**，常用的是 **BCA 法**，基本原理是在碱性条件下，蛋白质可将 BCA 试剂 SolutionB（含有 CuSO4）中的 Cu^{2+}还原为 Cu^{+}，Cu^{+}与 BCA 试剂 SolutionA（含有 BCA）相互作用产生敏感的颜色反应。两分子的 BCA 螯合一个铜离子，形成紫色的反应复合物。该水溶性的复合物在 562nm 处显示强烈的吸光性，吸光度和蛋白浓度在广泛范围内有良好的线性关系，因此测得样本吸光值后，与标准曲线对比可以推算出待测蛋白浓度。

注意：

1. BCA 法测定蛋白浓度受温度和时间的影响较大，吸光度值会随着时间的延长或温度升高而变化，建议每次测定都做一组标准曲线；

2. 在蛋白质样本溶液中加入 Loading buffer（含有变性剂，**SD001**），使蛋白质变性，释放二硫键，最后 95℃煮沸变性保存样品于-20℃或-80℃。

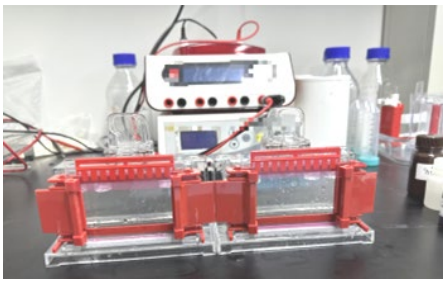
3. SDS-PAGE 电泳

3.1 凝胶制备

根据要分离的目标蛋白分子量的大小选择合适浓度的分离胶（4%-15%），促凝剂 APS 配制好后于-20℃保存。

参照表格如下：

分离胶浓度	分离范围（kDa）
6%	140-200
8%	80-140
10%	25-80
12%	15-40
15%	＜15



产品名称	产品编号	产品规格	售价（元）
新型快速 PAGE 凝胶制备试剂盒	PGT001	50 T	168.00
	PGT002	125 T	308.00
新型快速免染 PAGE 凝胶制备试剂盒	SPGT001	50 T	298.00
	SPGT002	125 T	618.00

-

❖更划算——制胶成本更低，为您节省科研经费。

❖更方便——较少的组分，分离胶 A、B 液和浓缩胶 A、B 液两两混合即可，省去了多种组分和繁琐步骤，制胶再也不用手忙脚乱，加完分离胶即可加浓缩胶，无需等待分离胶凝固。

❖更迅速——使用 PA-G100 一次性可自动灌注 10 块胶，从灌注到凝胶只需 15min 即可。

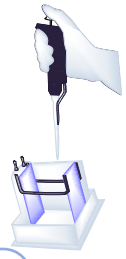
❖更省心——电泳效果更好，条带更清晰，实验结果重复性更好。

3.2 电泳液配制

使用博鹭腾 tris-甘氨酸电泳缓冲液（5×，**TG001, 500 mL**），大量筒中加入 5×电泳液 200 mL，加入 800 mL 纯净水将其稀释为 1×，制备好的凝胶用电泳夹子夹紧后放入电泳槽，向内槽内加满电泳液。

产品名称	产品编号	产品规格	售价（元）
Tris-甘氨酸电泳缓冲液（5X）	TG001	500 ml	68.00
MOPS SDS Running Buffer (20×)	MP001	100 ml	66.00
	MP002	500 ml	198.00
MES SDS Running Buffer (20×)	MS001	100 ml	58.00
	MS002	500 ml	218.00
5XSDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(含 DTT)	SD001	1 ml*5	78.00
	SD002	15 ml	198.00
	SD003	1 ml	20.00
5XSDS-PAGE 蛋白上样缓冲液（变性非还原性）	SF001	1 ml*5	58.00
	SF002	15 ml	158.00
	SF003	1 ml	20.00

3.3 上样



在凝胶左右两边孔中加入蛋白 Marker 5-10 μL，多选择生物素化蛋白 Marker，其余样本蛋白总上样量 20-50 μg，组织样本稍多些上样，尽量保持每个泳道的上样量一致。

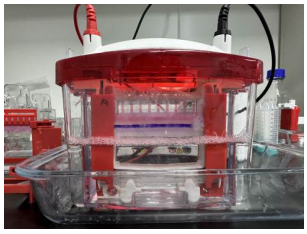
注意：保证上样体积尽量一致，否则可能导致蛋白条带不在同一水平线；如有空置的加样孔，需加等体积的 1×loading buffer，以防相邻通道蛋白样品的扩散；上样时需缓慢加，切忌快速吹打以免引起蛋白样品溢出，此外，上样体积要小于上样孔的总体积。

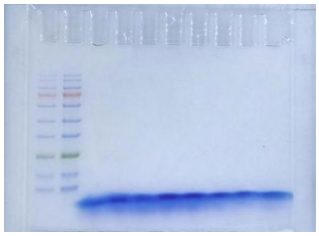
3.4 电泳

SDS-PAGE 凝胶电泳是以聚丙烯酰胺凝胶为基质，利用电场将蛋白质分子按照其分子量大小进行分离的方法。PAGE 电泳的原理是基于蛋白质分子在电场中的电荷性质和凝胶孔道的大小限制。

接上电源后，先用 90V 恒压电泳浓缩至溴酚蓝指示剂到浓缩胶与分离胶交界处，成线状，改为恒压 100--120V 直至溴酚蓝电泳到凝胶底部（如下图所示），此过程约用时 1.5h。（具体电压可根据实验调整，蛋白条带较大时，可延长电泳时间。）

注意：正负极一定要连接正确，否则样本会往上跑扩散至电泳液中。电泳液一般要求内槽加满，外槽加到 1/4 即可；若内槽出现漏液现象，则需要多加一些电泳液。





4. 转膜

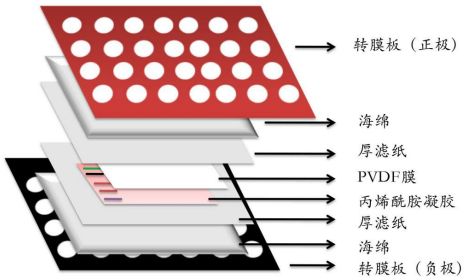
(1) 配制转膜液：使用博鹭腾 Western 转膜缓冲液（10×，**WD001, 500 mL**），取 10×转膜液 100 mL，加入 200 mL 甲醇和 700 mL 纯净水将其稀释为 1×，倒入托盘；

(2) 取出凝胶，用蒸馏水冲洗，并裁剪与凝胶相同大小的 PVDF 膜；一定要戴手套 ，避免手上的蛋白污染膜。

(3) PVDF 膜用甲醇浸泡 1 分钟后，和滤纸一同浸泡于转膜缓冲液（**WD001**）中；（用镊子捏住膜的一边轻轻置于有超纯水的平皿里，要使膜浮于水上，只有下层才与水接触。这样由于毛细管作用可使整个膜浸湿。若膜沉入水里，膜与水之间形成一层空气膜，这样会阻止膜吸水。）

(4) 将夹子打开使黑的一面保持水平。采用三明治法，转膜板（黑，负极）—海绵—滤纸（3 张）—凝胶（分离胶）—PVDF 膜—滤纸（3 张）—海绵—转膜板（红，正极）。

注意：
1.整个操作在转移液中进行，每加一层注意用玻棒擀去其中的气泡；
2.转移液含甲醇，操作时要戴手套，实验室要开门以使空气流通；
3.膜两边的滤纸不能相互接触，接触后会发生短路。



(5) 将夹子放入转移槽中，要使夹的黑面对槽的黑面，夹的白面对槽的红面。开始转膜。（转膜槽置于水中，并放入冰冻结块的冰袋，尽量多放几个冰袋，保证电转一直处于低温下进行。若转膜时间较长，中途温度升高，可更换冰袋）

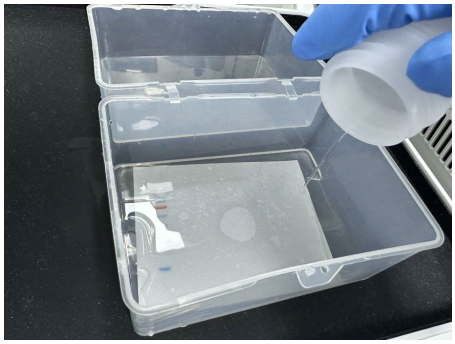
(6)转完后将膜用 1×丽春红染液（**LC001**）染 5 分钟（于脱色摇床上摇）。然后用水冲洗掉没染上的染液就可看到膜上的蛋白，将膜晾干备用。（丽春红染色步骤可选做）

产品名称	产品编号	产品规格	售价（元）
5X 蛋白印迹膜再生液（Mild）	WM001/WM002/WM003	100 mL/500 mL/10 mL	128/538/25
5X 蛋白印迹膜再生液（Strong）	WS001/WS002/WS003	100 mL/500 mL/10 mL	128/538/25

丽春红染色液	LC001/LC002/LC003	100 mL/500 mL/10 mL	98/298/15
PBS 缓冲液（1×）	PB001	500 ml	48.00
Western 转膜液(SDS)10×	WD001	500 mL	148.00
Western 转膜液 10×	WT001	500 mL	148.00

5. 封闭

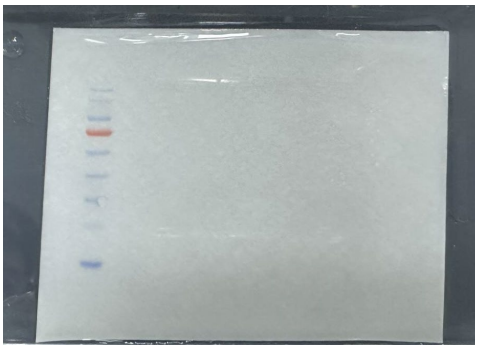
目的是利用一些无关蛋白将膜的残余结合力饱和掉，避免一抗和膜发生非特异性结合，产生非特异条带或者是背景杂乱。



转好的膜放入含 5%脱脂牛奶或 5%BSA 的 TBST 溶液当中，室温摇床封闭 1 小时，这一封闭步骤有助于降低非特异性一抗结合并降低背景。

注意：应避免膜封闭时间过长，因为这会掩盖抗原表位，阻止抗体结合。封闭后在 TBST 溶液中洗涤 3-5 分钟。

6. 一抗孵育



（1）抗体用含 5%BSA 的 TBST 溶液稀释，一抗稀释液完整覆盖住 PVDF 膜，于 4℃下孵育过夜或者室温下孵育 2 小时。建议在 4℃下孵育过夜，使得蛋白靶标信号较强。

（2）孵育好一抗之后采用 TBST 缓冲液洗涤膜，每次洗涤时间 5-10 分钟洗涤三次，注意洗涤时间不宜过长，否则会导致抗体从结合的位点脱离从而使信号减弱。

7. 二抗孵育

建议按照抗体的稀释范围稀释二抗，稀释液采用含 5%BSA 的 TBST 缓冲液。二抗稀释液完整覆盖住 PVDF 膜，于室温下孵育 1 小时。

8. 洗膜

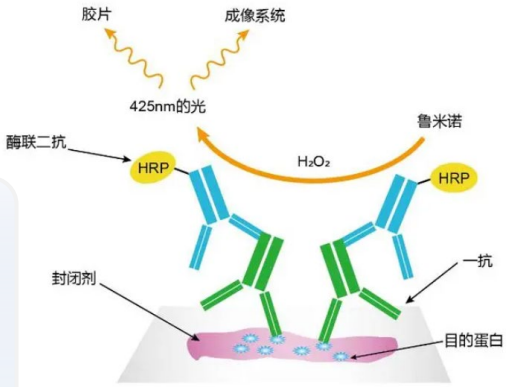
孵育好二抗之后采用 TBST 缓冲液洗涤膜，每次洗涤时间 5-10 分钟洗涤三次，注意洗

涤时间不宜过长，否则会导致抗体从结合的位点脱离从而使信号减弱。

（上述抗体孵育及洗涤过程可以使用博鹭腾 WB-600Auto 全自动蛋白印迹处理系统完成）

9. 检测

9.1 ECL 化学发光检测



辣根过氧化物酶在过氧化氢存在的条件下，氧化化学发光底物鲁米诺并产生激发光，在化学增强剂的作用下，光信号可被放大数千倍，随后采用成像仪检测即可。

将检测试剂 A/B 液（**ESL001**）1:1 混合均匀后，将检测液完全覆盖住膜，使用化学发光检测仪器（**GelView 6000Plus BLT**）中进行成像。

产品名称	产品编号	产品规格	市场售价（元）
高敏型化学发光检测试剂盒 High Sensitive ECL Detection Kit	ECL001	2×50 mL	198.00
	ECL002	2×250 mL	788.00
超敏型化学发光检测试剂盒 Super sensitive ECL Detection Kit	ESL001	2×50 mL	388.00
	ESL002	2×250 mL	1580.00
	ESL003	2×15 mL	200.00
特超敏化学发光检测试剂盒 Ultra sensitive ECL Detection Kit	EUL001	2×50 mL	1388.00
	EUL002	2×100 mL	2488.00
	EUL003	2×250 mL	4888.00

❖博鹭腾生产的 ECL 化学发光检测试剂盒使用了新型高效增强剂，不影响实验条件的情况下发光强度比传统 ECL 显色液显著提高，并且有效降低了背景。

9.2 荧光检测

采用荧光标记二抗的免疫印迹检测，用荧光成像仪进行成像检测。激发光源激发一抗或二抗上的荧光基团，使电子发生能级跃迁，从激发态返回基态时会发出光子，光子被捕获后可以由光信号转变为电信号，生成最终图像。