

## Western Blot 实验方案

免疫印迹（Immunoblotting）又称蛋白质印迹（Western Blot, WB），是根据抗原抗体的特异性结合检测复杂样品中的某种蛋白的技术。它利用 SDS-PAGE 技术将样品中的蛋白质按分子量的大小在凝胶上分离开，然后将膜、凝胶放在滤纸和海绵体之间形成三明治结构，在电流的作用下将蛋白质从凝胶迁移到膜上。膜是凝胶蛋白质的复制品，可以与对应的抗体起免疫反应，再结合酶标记或者荧光标记的二抗，经过底物显色或荧光成像等方法以检测特定蛋白质。

免疫印迹模式图包括样品采集、样本裂解、蛋白质浓度测定、SDS-PAGE 凝胶电泳、凝胶到膜的转移以及检测蛋白的免疫成像。根据使用的电泳和转移设备，靶蛋白的定位、分子量大小等，实验方案需要进一步优化，建议参照厂家说明书。

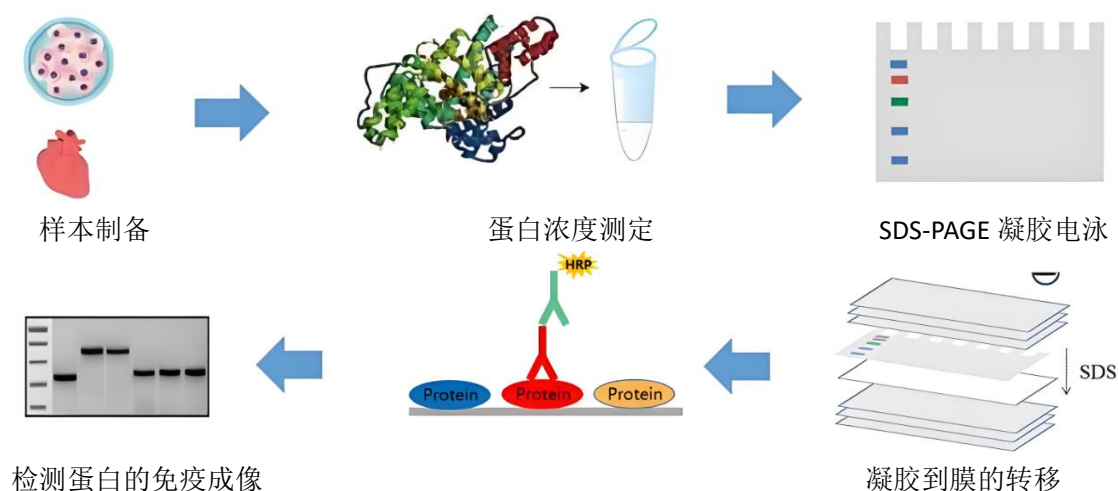


图 1：免疫印迹模式图

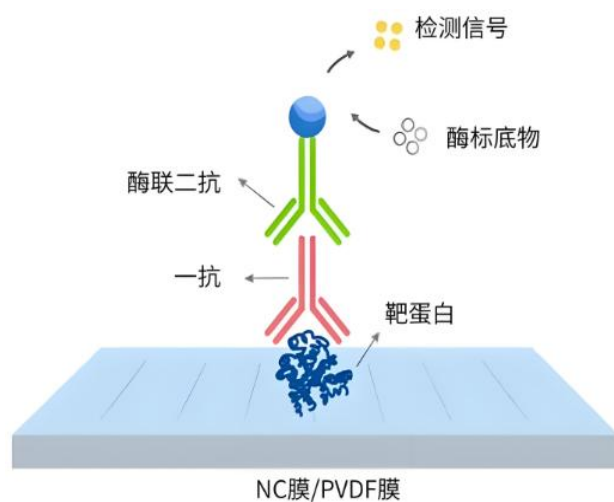


图 2：免疫印迹实验流程图

# 目录

|                              |    |
|------------------------------|----|
| 1. 样本制备 .....                | 3  |
| 1.1. 样本的采集和裂解物制备 .....       | 3  |
| 1.1.1. 细胞样本 .....            | 4  |
| 1.1.2. 组织样本 .....            | 5  |
| 1.2. 蛋白质定量 .....             | 6  |
| 1.3. 蛋白变性 .....              | 6  |
| 2. 电泳 .....                  | 6  |
| 2.1. 凝胶制备 .....              | 6  |
| 2.2. 阳性对照 .....              | 8  |
| 2.3. 蛋白 Marker .....         | 8  |
| 2.4. 上样及电泳步骤 .....           | 8  |
| 3. 转膜 .....                  | 9  |
| 3.1. 蛋白染色 .....              | 9  |
| 3.2. 膜的选择 .....              | 10 |
| 3.3. 转膜方式 .....              | 11 |
| 3.4. 转膜及转膜效率的检测 .....        | 12 |
| 4. 封闭 .....                  | 13 |
| 4.1. 膜封闭液选择 .....            | 13 |
| 4.2. 膜封闭步骤 .....             | 13 |
| 5. 一抗孵育 .....                | 14 |
| 5.1. 内参抗体的选择 .....           | 14 |
| 5.2. 标签抗体 .....              | 15 |
| 5.3. 一抗孵育步骤 .....            | 16 |
| 6. 二抗孵育 .....                | 16 |
| 6.1. 二抗的选择 .....             | 16 |
| 6.2. 二抗孵育步骤 .....            | 16 |
| 7. 显色 .....                  | 17 |
| 7.1. 显色方法 .....              | 17 |
| 7.2. 显色步骤 .....              | 17 |
| 8. Western Blot 常见问题解析 ..... | 17 |

# 1.样本制备

## 1.1. 裂解液制备

|                    | RIPA 裂解液(强)                      | RIPA 裂解液(中)   | RIPA 裂解液(弱) | NP-40 缓冲液 |
|--------------------|----------------------------------|---------------|-------------|-----------|
| NaCl               | 0.88g                            | 0.88g         | 0.88g       | 0.88g     |
| Triton X-100       | 1g                               |               |             |           |
| NP-40              |                                  | 1g            | 1g          | 1g        |
| 脱氧胆酸钠              | 1g                               | 0.5g          | 0.25g       |           |
| 10%SDS             | 1mL                              | 1mL           |             |           |
| 1M Tris-HCl, PH7.4 | 5mL                              | 5mL           | 5mL         | 5mL       |
| 去离子水               | 至 100mL                          | 至 100mL       | 至 100mL     | 至 100mL   |
| 适用范围               | 全细胞，强                            | 全细胞，组织和细胞裂解首选 | 全细胞，较为温和    | 全细胞，较为温和  |
| 备注                 | 裂解样本之前，加入蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂（根据实验需要添加） |               |             |           |

## 1.2. 样本的采集和裂解物制备

### 1.2.1. 细胞样本

#### 1.2.1.1. 细胞样本的采集

在实验前需保证细胞的状态正常，避免多次传代，将细胞培养到合适的密度，通常 70-90%。

**悬浮细胞：**一般用离心法收集悬浮细胞，轻柔吹打细胞，将全部细胞悬液转移到离心管中，4℃ 500×g 离心 5 分钟，收集沉淀。沉淀用冰的 PBS 洗涤两遍，收集细胞沉淀，尽可能吸取残留的 PBS。

**贴壁细胞：**贴壁细胞可以在瓶内直接裂解，这种方法适用于所有的贴壁细胞。先倒出培养基，用冰的 PBS 冲洗细胞表面 2 遍，需动作轻柔，防止细胞脱落，冲洗后尽可能吸取残留的 PBS。

**药物处理过的贴壁细胞：**先倒出培养基，用冰的 PBS 冲洗细胞 1 次，倒出 PBS 后，再加入适量冰的 PBS，用刮刀刮下细胞，再将细胞悬液转移到离心管中，4℃ 500×g 离心 5 分钟，弃上清，反复吹打洗涤细胞，收集沉淀。沉淀用冰的 PBS 洗涤两遍，收集细胞沉淀，尽可能吸取残留的 PBS。

**注意：**不推荐使用胰酶消化，胰酶消化细胞会造成细胞外基质的丢失，同时会剪切一些对胰酶敏感的蛋白。

#### 1.2.1.2. 细胞裂解物的制备

1. 裂解液使用之前添加相应蛋白酶抑制剂，细胞吸干 PBS 后，加入预冷的裂解液（ $10^7$  细胞/100mm<sup>2</sup>/150cm<sup>2</sup> 培养瓶加 1ml， $5 \times 10^6$  细胞/60mm<sup>2</sup> 培养皿/75cm<sup>2</sup> 培养瓶加 0.5ml）。

2. 用移液管吹散贴壁的细胞；对于贴壁紧的细胞，用预冷的细胞刮刀将细胞刮下，然后轻轻将细胞悬液转移到预冷的离心管中。

3. 4℃ 持续震荡 30 分钟。

4. 冰上超声处理，180W，1-2 分钟，以完成细胞裂解并剪切 DNA（降低样品粘度）。

5. 4℃，12000×g 离心 20 分钟。

6. 轻轻吸取上清，将其转移到预冷的离心管中，弃沉淀。如不能及时进行下一步实验，可将蛋白样本存放在-80℃。

## 1.2.2. 组织样本

### 1.2.2.1. 组织的采集和保存

1. 采集组织样本前先对动物去除血液，去的越干净越好。在冰上用干净器械解剖所需的组织，快速操作以防止蛋白酶降解。
2. 组织样本如需保存，可将其液氮中速冻，然后转移至-80℃保存。
3. 胃肠道消化系统相关组织容易降解，推荐现用现取，优先采取；接着取肺（巨噬细胞含量高）、肝脏（蛋白种类多）、膀胱、生殖系统相关的组织（睾丸、卵巢、子宫、输卵管等）；最后取心脏、脾脏、肾脏、骨骼肌、大小脑等组织。

### 1.2.2.2. 组织的预处理

1. 脂肪组织：放在几层纸巾上，用拇指和食指挤压，从组织中去除一部分油脂类。然后用冰的 PBS 清洗 2 遍，滤纸吸干水分。
2. 血管组织：小心去除附着在血管上的组织，用剪刀将血管剪开，并用冰的 PBS 冲洗去除血管中的血液，滤纸吸干水分。
3. 骨组织：尽可能去除附着在骨组织上的脂肪和肌肉，通过机械手段（骨破碎机、搅拌机或剪刀等）粉碎成小块或粉末。
4. 血液含量丰富的组织：心脏、肝脏、脾脏、肺、肾脏等组织，剪碎使用冰的 PBS 洗涤清洗 2-3 遍（可以适当按压排出血液），直至样本血红色变浅，滤纸吸干水分。

### 1.2.2.3. 组织裂解物的制备

1. 经过预处理的组织，剪成 1-2mm 的小块，放入 2ml 圆底离心管中，同时管中放入 1 粒 5mm 研磨珠，然后将离心管浸入液氮中速冻。
2. 对于 100mg 的组织，向管中迅速加入约 1mL 预冷的裂解液（使用前添加新鲜的蛋白酶抑制剂混合物），放在冰上立即用电动匀浆器匀浆。
3. 4℃持续震荡 30-60 分钟（将回旋振荡器放入冰箱）。
4. 将裂解的蛋白样品放在冰上超声破碎，200W，2 分钟，充分打断核酸序列。
5. 4℃，12000×g 离心 20 分钟。
6. 轻轻吸取上清，将其转移到预冷的离心管中，弃沉淀。如不能及时进行下一步实验，可将蛋白样本存放在-80℃。

### 1.3. 蛋白质定量

蛋白定量用于保证每个泳道上样量一致，可以用 Bradford、Lowry 和 BCA 方法测定蛋白质含量，牛血清白蛋白是常用的蛋白标准品。

BCA 法的测定原理，是在碱性条件下，蛋白质将铜离子还原成亚铜离子，BCA 和亚铜离子结合形成稳定的紫蓝色复合物，在 562nm 处有高的光吸收值，并与蛋白质浓度成正比，据此可以测定蛋白质浓度。

Lowry 法与 BCA 同属化学法，但 BCA 法灵敏度高，操作简单，稳定性强，受干扰物质影响小。Bradford 属于染料结合法，易受到去垢剂影响。

BCA 法确定蛋白浓度之后，根据浓度计算上样体积，每孔上样量建议在 20-30  $\mu\text{g}$  之间。

如不能及时进行下一步实验，可以将确定了蛋白浓度的样本放在  $-20^{\circ}\text{C}$  或  $-80^{\circ}\text{C}$  保存。

### 1.4. 蛋白变性

抗原表位可能在蛋白的三维结构，为了使抗体接近抗原表位，必须将蛋白的三维构型打开，即使蛋白变性。

蛋白质变性，一般用含 SDS 的上样缓冲液，加入 20 $\mu\text{g}$  蛋白样本，95-100 $^{\circ}\text{C}$  煮沸 5 分钟。但是对于跨膜蛋白，用高温煮沸，蛋白容易交缠在一起，导致抗原表位无法暴露，且聚集物不能有效进入胶中，可以室温孵育 10 分钟。

## 2. 电泳

### 2.1. 凝胶制备

聚丙烯酰胺凝胶电泳，英文简称是 SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)。它有两种形式：SDS-PAGE 和 Native-PAGE。非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 Native-PAGE，主要用来分析保持活性的天然蛋白质，如酶和蛋白复合物，蛋白质在电泳过程中能够保持完整的状态。蛋白质的丰度、分子量和下游应用的不同，使用的蛋白凝胶类型也不一样。

|         | 宽范围分子量蛋白质 (10-250kDa) -低丰度蛋白质和翻译后修饰蛋白 | 宽范围分子量蛋白质 (10-250kDa) -高丰度蛋白质 | 高分子量蛋白质 (40-500kDa) | 低分子量蛋白质 (2-40kDa) |
|---------|---------------------------------------|-------------------------------|---------------------|-------------------|
| 凝胶类型    | Bis-Tris 凝胶                           | Tris-甘氨酸凝胶                    | Tris-乙酸凝胶           | Tricine 凝胶        |
| Acr:Bis | 29:1                                  | 29:1                          | 29:1                | 29:1              |
| 凝胶缓冲    | 近中性 PH 的 Bis-Tris                     | 近中性 PH 的                      | 中性 PH 的             | 略偏碱性 pH 的         |

| 液体系        | 缓冲液                                                   | Tris-HCl 缓冲液                     | Tris-乙酸缓冲液                                       | Tris 缓冲液                                   |
|------------|-------------------------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| 上样缓冲液      | SDS-PAGE /非变性 PAGE Sample Buffer                      | SDS-PAGE /非变性 PAGE Sample Buffer | LDS Sample Buffer                                | Tricine SDS Sample Buffer                  |
| 变性电泳缓冲液体系  | MOPS SDS 电泳缓冲液（20-250kDa）<br>MES SDS 电泳缓冲液（15-160kDa） | Tris-甘氨酸 SDS 电泳缓冲液               | Tris-乙酸 SDS 电泳缓冲液                                | 阴极：Tris Tricine 电泳缓冲液<br>阳极：Tris-HCl 电泳缓冲液 |
| 非变性电泳缓冲液体系 | MOPS 电泳缓冲液（20-250kDa）<br>MES 电泳缓冲液（15-160kDa）         | Tris-甘氨酸非变性电泳缓冲液                 | Tris-甘氨酸非变性电泳缓冲液                                 | 无                                          |
| 转膜缓冲液体系    | Bis-Tris                                              | Tris-甘氨酸                         | Tris-甘氨酸                                         | Tris-甘氨酸                                   |
| 常规电泳条件     | 150V，40-60 分钟                                         | 180V，40-60 分钟                    | 变性电泳：<br>150V，60 分钟；<br>非变性电泳：<br>150V，90-180 分钟 | 150V，40-50 分钟                              |
| 转膜条件       | 300-400mA，60-90 分钟                                    | 300-400mA，60-90 分钟               | 120V，60-90 分钟                                    | 300-400mA，30-60 分钟                         |

凝胶对蛋白质的分离取决于凝胶所形成的孔径大小，不同分子量的蛋白质选择不同的凝胶浓度（指分离胶浓度，即每 100mL 凝胶溶液中含有单体（丙烯酰胺）和交联剂（Bis）的总克数称凝胶浓度）。凝胶可以购买商业的凝胶制备试剂盒和预制胶，也可以自己在实验室制备。

| 凝胶体系                  | 浓缩胶浓度（%） | 分离胶浓度（%）   | 分子量大小（kDa） |
|-----------------------|----------|------------|------------|
| Tris-Tricine          | 4        | 10+15（三层胶） | 2-40       |
| Tris-Glycine/Bis-Tris | 5        | 8          | 25-200     |
|                       |          | 10         | 15-100     |
|                       |          | 12.5       | 10-70      |
|                       |          | 15         | 12-40      |
|                       |          | 20         | 4-40       |
|                       |          | 4-12       | 20-250     |
|                       |          | 4-20       | 10-250     |
|                       |          | 8-16       | 10-160     |

|              |   |     |        |
|--------------|---|-----|--------|
| Tris-Acetate | 3 | 3-8 | 40-500 |
|--------------|---|-----|--------|

## 2.2. 阳性对照

阳性对照是目的蛋白或表达目的蛋白的组织或细胞，用于检验抗体的正确性和有效性。

## 2.3. 蛋白 Marker

商品化蛋白 Marker 主要有预染蛋白 Marker 和非预染蛋白 Marker，可以根据目的蛋白的分子量选择合适的蛋白 Marker。

## 2.4. 上样及电泳步骤

1. 根据目的蛋白分子量大小，选择凝胶浓度，按下表配制，先配分离胶，待分离胶凝固后，再配浓缩胶。

|                          | 分离胶<br>6% | 分离胶<br>8% | 分离胶<br>10% | 分离胶<br>12% | 分离胶<br>15% | 浓缩胶<br>5% |
|--------------------------|-----------|-----------|------------|------------|------------|-----------|
| 总体积                      | 10mL      | 10mL      | 10mL       | 10mL       | 10mL       | 6mL       |
| 蒸馏水                      | 5.3       | 4.6       | 4          | 3.3        | 2.3        | 4.1       |
| 30% Acr/Bis<br>(29:1)    | 2.0       | 2.7       | 3.3        | 4.0        | 5.0        | 1.0       |
| 1M Tris-HCl<br>(PH6.8)   | 0         | 0         | 0          | 0          | 0          | 0.75      |
| 1.5M Tris-HCl<br>(PH8.8) | 2.5       | 2.5       | 2.5        | 2.5        | 2.5        | 0         |
| 10%SDS                   | 0.1       | 0.1       | 0.1        | 0.1        | 0.1        | 0.06      |
| 10%APS                   | 0.1       | 0.1       | 0.1        | 0.1        | 0.1        | 0.06      |
| TEMED                    | 0.08      | 0.06      | 0.04       | 0.04       | 0.04       | 0.006     |
| 最佳分离范围 kDa               | 50-150    | 30-90     | 20-80      | 12-60      | 10-40      |           |

2. 配制 10×Tris 甘氨酸电泳缓冲液和 5×上样缓冲液。取 100mL 的 10×Tris 甘氨酸电泳缓冲液，用去离子水稀释，配制成 1×Tris 甘氨酸电泳缓冲液。

| Tris-甘氨酸 SDS<br>电泳缓冲液<br>(10×) | Tris-甘氨酸非变<br>性电泳缓冲液<br>(10×) | 5×SDS-PAGE 上样缓冲液 |
|--------------------------------|-------------------------------|------------------|
|--------------------------------|-------------------------------|------------------|



|           |          |          |                                                                                                                                                      |        |
|-----------|----------|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Tris base | 30.2g    | 30.2g    | 1M Tris-HCl, PH6.8                                                                                                                                   | 2.5mL  |
| 甘氨酸       | 188g     | 188g     | SDS                                                                                                                                                  | 1g     |
| SDS       | 10g      | 0        | 溴酚蓝                                                                                                                                                  | 50mg   |
| 去离子水      | 至 1000mL | 至 1000mL | 甘油                                                                                                                                                   | 5mL    |
| 室温保存      |          |          | 去离子水                                                                                                                                                 | 至 10mL |
|           |          |          | 1. 量取上面试剂, 置于 15mL 离心管中, 加去离子水溶解后定容至 10mL<br>2. 500 $\mu$ l/管分装, 室温保存<br>3. 使用前将加 25 $\mu$ l 的 $\beta$ -巯基乙醇至小管<br>4. 加入 $\beta$ -巯基乙醇后, 室温下可保存一个月左右 |        |

3. 在电泳槽的内槽中导入足够的 1×Tris 甘氨酸电泳缓冲液, 使其覆盖上样孔 5–7mm, 在外槽中加入相同的电泳缓冲液以确保适当的冷却。为了获得更好的效果, 外槽的缓冲液需要加到与内槽持平的位置或稍低, 但不可漫过胶板。
4. 使用注射器或其他工具吸取适量 1× 的电泳缓冲液, 将上样孔轻轻冲洗干净, 去除气泡和残留的储存缓冲液。
5. 取 20  $\mu$ l 样品, 95–100℃ 加热处理 5 分钟 (跨膜蛋白室温孵育 10 分钟), 放在冰上冷却。
6. 微量离心机内离心 5 分钟。
7. 将上样吸头的尖端垂直插入到上样孔中, 上样 20 $\mu$ l 到 SDS-PAGE 凝胶上,
8. 按照电泳仪厂家推荐的时间进行电泳, 电泳条件可以随仪器和蛋白分子量的大小的改变而变更。
9. 在溴酚蓝指示剂即将跑出凝胶时结束电泳, 迅速进入下一步的转膜操作

### 3. 转膜

#### 3.1. 蛋白染色

在电泳分离出蛋白质条带后, 用不同的染色方法, 可以直接观察到蛋白迁移是否均匀、有没有降解, 以便进行下一步的实验。蛋白如需转膜, 可以用铜染, 铜染是可逆的。也可以转膜后, 用考马斯亮蓝染胶。

|      | 考马斯亮蓝<br>G-250 | 考马斯亮蓝<br>R-250 | 银染法   | 铜染法   | 荧光染色法<br>(如 SYPRO<br>Ruby 染料) |
|------|----------------|----------------|-------|-------|-------------------------------|
| 检测目标 | 常规蛋白质          | 常规蛋白质          | 常规蛋白质 | 蛋白保持完 | 常规蛋白质                         |

|        |                   |                             |                                                    |                                                                      |                                    |
|--------|-------------------|-----------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
|        |                   |                             |                                                    | 整                                                                    |                                    |
| 蛋白检测下限 | 10ng              | 3ng                         | 0.3ng                                              | 2ng                                                                  | 0.25ng                             |
| 染色时间   | 30 分钟             | 12 分钟                       | 1 小时 30 分钟                                         | 30 分钟                                                                | 微波 901 分钟，标准 18 小时                 |
| 是否兼容质谱 | 是                 | 是                           | 否                                                  | 是                                                                    | 是                                  |
| 是否可逆   | 否                 | 否                           | 否                                                  | 是                                                                    |                                    |
| 颜色     | 蓝绿色               | 紫色                          | 棕色                                                 | 蓝色胶背景下蛋白出现透明条带                                                       | 荧光                                 |
| 优势     | 不含甲醇和乙酸，染料划算且快速灵敏 | 染色效果比 G-250 染料好，蛋白检测快速，灵敏度高 | 快速、超灵敏、多用途染色系统，灵活的凝胶固定方案（30 分钟-过夜）和染色方案（5 分钟-2 小时） | 不对蛋白质产生任何修饰，可以进行质谱和测序分析，也可以用于电转移或其他染色方法对胶重新染色。不需要固定和脱色，也不需要使用甲醛和冰醋酸。 | 即用型工作液，可与质谱、等电聚焦（IEF）、2D 凝胶和膜上染色兼容 |

### 3.2. 膜的选择

Western Blot 实验，常用的有两类膜，硝酸纤维素膜（NC 膜）和 PVDF 膜。

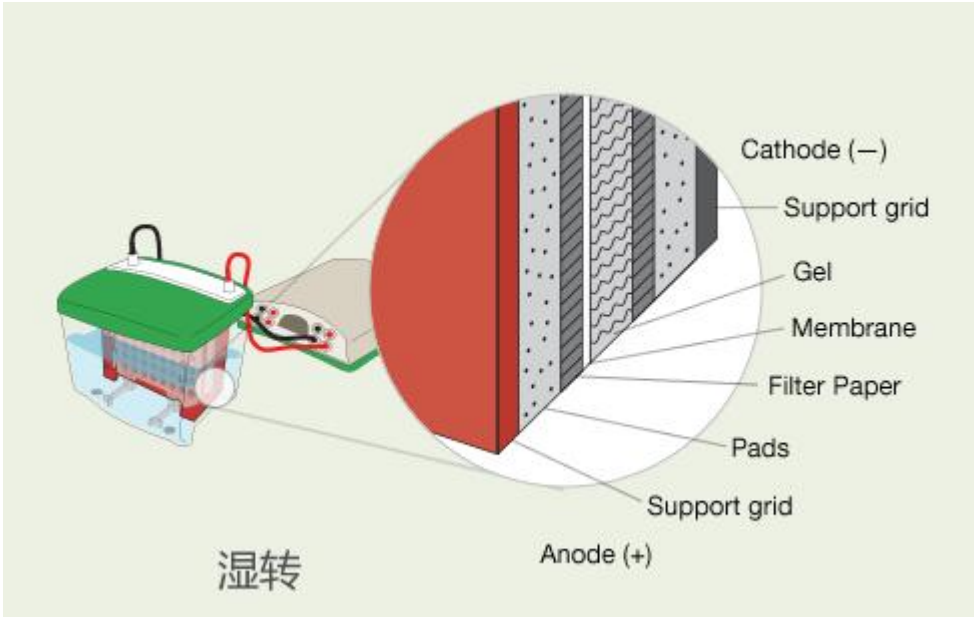
|          | NC 膜                     |           | PVDF 膜                    |           |
|----------|--------------------------|-----------|---------------------------|-----------|
| 材料质地     | 脆而易碎，延展性差                |           | 机械强度高，延展性强，可长期存放          |           |
| 蛋白结合载量   | 80-100μg/cm <sup>2</sup> |           | 125-300μg/cm <sup>2</sup> |           |
| 背景       | 较低                       |           | 大于 NC 膜                   |           |
| 灵敏度      | 较高                       |           | 高，适用于低丰度蛋白的检测             |           |
| 耐溶剂性     | 弱，溶剂不耐受                  |           | 化学稳定性好，耐腐蚀                |           |
| 重复使用     | 不利于多次剥离杂交                |           | 可多次剥离后重复杂交                |           |
| 预处理      | 不需要预处理                   |           | 需甲醇活化处理                   |           |
| 膜孔径及适用范围 | 0.22μm                   | 0.45μm    | 0.22μm                    | 0.45μm    |
|          | ≤20kDa 蛋白                | >20kDa 蛋白 | ≤20kDa 蛋白                 | >20kDa 蛋白 |

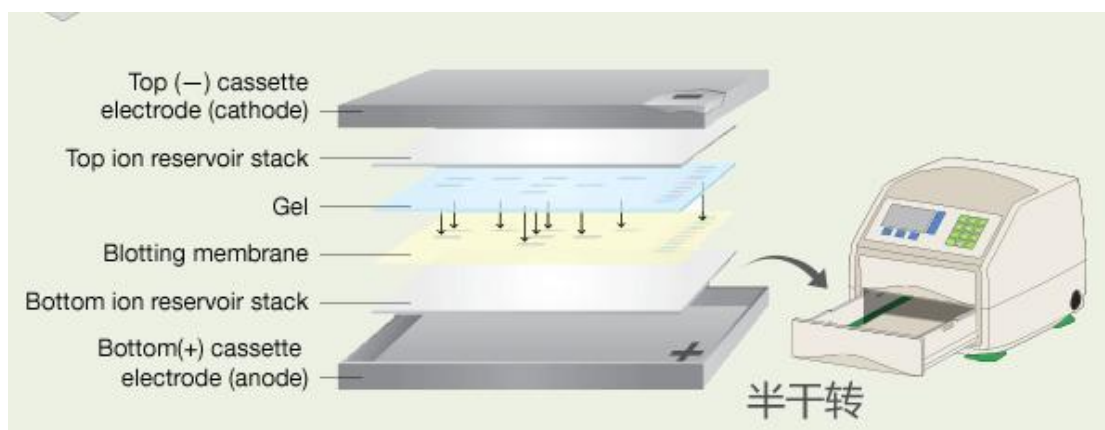
|  |  |   |  |   |
|--|--|---|--|---|
|  |  | 白 |  | 白 |
|--|--|---|--|---|

3.3. 转膜方式

转膜方式分为半干转移和湿转移两种，半干式转膜速度快，一般用做Tricine 胶转膜。湿转法不会因为膜的干燥而失败，成功率高特别适用于分子量大于 100kDa 的蛋白。

|        | 湿转              | 半干转       |             |
|--------|-----------------|-----------|-------------|
|        |                 | 传统        | 快速          |
| 转印时间   | 30 分钟至过夜        | 15-60 分钟  | 3-10 分钟     |
| 三明治结构  | 海绵/滤纸/胶/膜/滤纸/海绵 | 滤纸/胶/膜/滤纸 | 滤纸/胶/膜/滤纸   |
| 分子量范围  | 宽范围             | 30-120kDa | 宽范围         |
| 温度控制   | 使用冰块或循环水冷却      | 无         | 无           |
| 操作方便程度 | 手工组装转印组件        | 手工组装转印组件  | 预组装，预浸泡过的组件 |





### 3.4. 转膜及转膜效率的检测

1. 制备转膜缓冲液和 1×TBST 洗液。

|                                                                                                    | 转膜缓冲液<br>(湿法)     | 转膜缓冲液<br>(半干法) | TBS Buffer 清洗液 (10×)                                                                                          |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 甘氨酸                                                                                                | 1.4g              | 2.9g           | NaCl                                                                                                          | 88g |
| Tris                                                                                               | 3.0g              | 5.8g           | Tris 碱 (分子量 121.1g)                                                                                           | 24g |
| SDS                                                                                                | 1g (分子量 > 100kDa) | 0.4g           | 1. 称取上面试剂, 置于 1L 烧杯中<br>2. 烧杯中加入 800mL 的去离子水, 充分搅拌溶解<br>3. 用 12N HCl 将 PH 值调节至 7.6<br>4. 加去离子水将溶液定容至 1L, 4℃保存 |     |
| 1. 称取上面试剂, 置于 1L 烧杯中<br>2. 烧杯中加入 600mL 的去离子水, 充分搅拌溶解<br>3. 加去离子水将溶液定容至 800mL 后, 加入 200mL 的甲醇, 室温保存 |                   |                | 1×TBST (Tris-缓冲盐溶液, 0.1%吐温 20):<br>100mL TBS 10×+900mL 去离子水+1mL 吐温 20                                         |     |

2. 用剪刀剪出与海绵大小相仿的滤纸一张和 PVDF 膜一张, 在 PVDF 膜一角用铅笔标记。

3. 将 PVDF 膜在甲醇中浸泡活化 1-2 分钟后, 再用转膜缓冲液将滤纸和 PVDF 膜浸泡

4. 向托盘中加入转膜缓冲液, 放入海绵、PVDF 膜、滤纸和转膜夹

5. 转膜夹的黑色板上先铺一块海绵，再铺滤纸和凝胶。对齐后用转印滚轮赶走气泡。

6. 用微量移液器取少量转移膜冲液放在凝胶后铺上 PVDF 膜，再铺滤纸和海绵。对齐后用转印滚轮赶走气泡。

7. 将转膜夹夹紧固定后，黑面对黑面放入转膜固定装置中。

8. 将转膜固定装置和装有冰块的冰盒放在转膜槽中。用转膜缓冲液注满转移槽。

9. 接通电源，一般恒压 100 V-110 V，1 小时左右；小分子量的可以适当缩短时间；或者恒压 30 V，4℃ 转膜过夜；或者恒流 300mA，1 小时左右。

10. 为检测转膜是否成功，可用丽春红对膜进行染色。将膜放入 TBST 洗一洗，再至于丽春红染色工作液中，室温下摇动染色 5 分钟直至出现清晰条带，再用 TBST 洗膜直至背景干净，条带清晰。

## 4. 封闭

### 4.1. 膜封闭液选择

转移成功后的膜上有很多特异性的蛋白质结合位点，为防止这些位点与抗体结合引起非特异的染色和背景，一般用惰性蛋白质或非离子去垢剂，封闭膜上的未结合位点来减少抗体的非特异性结合。

有两种传统封闭液，脱脂奶粉和 BSA。脱脂奶粉成本低，但脱脂奶粉不能与生物素化的抗体一起使用因为脱脂奶粉含有糖蛋白和生物素，在使用亲和素的标记物时，会直接与封闭液结合。也不能用于磷酸化蛋白，因为脱脂奶粉含有酪蛋白，该蛋白本身就是一种磷酸化蛋白，会结合磷酸化抗体而易产生高背景。

某些抗体用 BSA 封闭时，可能会产生比脱脂奶粉更强的信号，请参考抗体说明书，以确定有无特殊封闭膜方法。

### 4.2. 膜封闭步骤

1. （可选）转膜完成后，在室温下用 TBS 将膜洗涤 5 分钟。

2. 将 PVDF 膜放在封闭液中，摇床上室温封闭 1 小时。

3. 封闭后用 TBST 洗涤 3 次，每次 5 分钟。

# 5. 一抗孵育

## 5.1. 内参抗体的选择

内参抗体可用于评价蛋白质免疫印迹法 (Western Blot) 的效率，比较凝胶中每孔的蛋白上样量。可帮助确定样品间表达水平的差异，以判断是由细胞裂解物的实际蛋白水平导致，还是由上样量的差异导致。

内参抗体种类很多，包括全细胞或胞浆内参、膜内参、核蛋白内参等，选择内参抗体一般要遵循以下原则：

### 1. 样本种属来源

首先考虑实验样本来源于何物种。哺乳动物的组织或细胞样本，通常选择  $\beta$ -actin、 $\beta$ -tubulin、GAPDH、Histone H3 等；稀少物种来源，可以参考文献指导或者高度保守的管家基因对应的抗体作为内参。

### 2. 目的蛋白分子量

选择内参抗体时，应该考虑目的蛋白分子量的大小。通常应该保证目的蛋白与内参蛋白分子量相差 5 kDa 以上但勿差距太大。比如目的蛋白分子量为 45 kDa，此时不适宜选择  $\beta$ -actin 作为内参，可以考虑选择 GAPDH 或者  $\beta$ -tubulin 作为内参。

### 3. 目的蛋白表达部位

如需要检测亚细胞器蛋白时，一般选择亚细胞器内参更加准确。如核蛋白检测时，常用核内参抗体有 Lamin A、TBP、YY1、Histone H3。膜蛋白检测时，常用的膜内参抗体为 ATP1A1。线粒体蛋白检测，常用 VDAC1 和 COX IV 作为内参抗体。

| 适用范围   | 靶点名称              | 分子量      | 注意事项                                         |
|--------|-------------------|----------|----------------------------------------------|
| 胞浆或全细胞 | GAPDH             | 36kDa    | 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           |
|        | $\beta$ -actin    | 42kDa    | 不适用于骨骼肌样品，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 |
|        | $\alpha$ -tubulin | 50-55kDa | 微管蛋白的表达随着抗菌和抗有丝分裂性药物而改变                      |
|        | $\beta$ -Tubulin  | 50-55kDa |                                              |

|                  |             |                                                |                                |
|------------------|-------------|------------------------------------------------|--------------------------------|
|                  | Vinculin    | 117kDa                                         |                                |
| 细胞核膜             | Lamin A/C   | 65-75kDa                                       | 凋亡实验中不适合                       |
|                  | Lamin B1    | 66-72kDa                                       | 不适合核膜被除去的样本/凋亡实验中不适合/不适用于胚胎干细胞 |
| 细胞核              | TBP         | 33-43kDa <sup>h</sup> /33-36kDa <sup>m/r</sup> | 不适合 DNA 被出去的样本/凋亡实验中不适合        |
|                  | PCNA        | 36kDa                                          | 非增值细胞不适用                       |
|                  | Histone H3  | 15-17kDa                                       |                                |
|                  | YY1         | 65-70kDa                                       |                                |
| 膜蛋白              | ATP1A1      | 97-110kDa                                      |                                |
| 线粒体              | VDAC1/2     | 31-37kDa                                       |                                |
|                  | VDAC1/Porin | 31-37kDa                                       |                                |
|                  | COXIV       | 17-20kDa                                       | 许多蛋白像 COXIV 出现在 16kDa 的位置      |
| 全血/<br>血浆/<br>血清 | Transferrin | 77kDa                                          | 表达状况受某些疾病状态和治疗的影响，如视黄酸         |
|                  | Albumin     | 66kDa                                          | 含量极高，注意降低 WB 实验上样              |

## 5.2. 标签抗体

标签抗体可用于检测和纯化各种商品化表达载体上的标签序列，籍以分析检目的蛋白的表达含量及其功能。常见的标签包括 DYKDDDDK（Flag 标签）、His、GST、GFP、RFP、Myc 和 HA tag 等。

| 标签                | 大小（kDa） | 序列       |
|-------------------|---------|----------|
| 6×His             | 0.8     | HHHHHH   |
| DYKDDDDK（Flag）tag | 1.0     | DYKDDDDK |

|             |     |                |
|-------------|-----|----------------|
| HA tag      | 1.1 | YPYDVPDYA      |
| Myc tag     | 1.2 | EQKLISEEDL     |
| V5 tag      | 1.4 | GKPIPNPLLGLDST |
| GST         | 26  | GST 蛋白         |
| GFP tag     | 27  | 绿色荧光蛋白         |
| RFP tag     | 26  | 红色荧光蛋白         |
| mCherry tag | 27  | 红色荧光蛋白         |

### 5.3. 一抗孵育步骤

1. 按照说明书中建议，选择合适的稀释液和稀释倍数，对抗体进行稀释（如果不存在高背景的问题，可以用含低浓度 0.5–0.25%脱脂奶粉或 BSA 的封闭液来稀释抗体）。
2. 将膜上结合蛋白的一面朝上至于一抗溶液中，摇床上室温孵育 1 小时，或 4℃ 孵育过夜。确保抗体溶液完全覆盖印迹膜。
3. 一抗孵育结束后，TBST 摇动洗膜 3 次，每次 5 分钟，去除残留的一抗。

## 6. 二抗孵育

### 6.1. 二抗的选择

1. 首先二抗的反应种属是一抗的宿主物种，其次二抗的宿主物种应该不同于一抗，再次二抗必须配对一抗的同型。如一抗是小鼠 IgG1，二抗则应是山羊抗小鼠 IgG(H+L)或者山羊抗小鼠 IgG1，而不是山羊抗小鼠 IgG2，也不能是小鼠抗小鼠 IgG(H+L)。
2. 化学发光 Western Blot，对应的是酶标记二抗。酶标记有 HRP 和 AP 和生物素（biotin）三种，目前最常用的是 HRP 标记的二抗。

### 6.2. 二抗孵育步骤

1. 按照说明书推荐的稀释倍数，用 TBST 稀释 HRP 二抗。（可以用封闭液稀释二抗和一抗，但可能在降低背景同时导致特异性条带的信号也减弱，可能是封闭



剂阻碍了抗体和靶蛋白的结合)。

2. 将膜上结合蛋白的一面朝上至于二抗溶液中，摇床上室温孵育 1 小时。确保抗体溶液完全覆盖印迹膜。

3. 二抗孵育结束后，TBST 摇动洗膜 3 次，每次 5 分钟，去除残留的二抗。

## 7. 显色

### 7.1. 显色方法

ECL 底物中含有 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和鲁米诺（及其衍生物），在 HRP（辣根过氧化物酶）的作用下产生化学发光。ECL 法稳定性好，灵敏度高，成像性好，是目前最常用的显色方法。（注意：ECL 现配现用效果最佳，通常不推荐重复使用或回收。）

### 7.2. 显色步骤

1. 用平头镊将膜从 TBST 液中取出，用吸水纸吸去过多的液体（切勿接触膜上的蛋白质），然后置于一洁净器皿内或是保鲜膜上。

2 避光环境中，将 ECL 发光试剂 A 液、B 液 1:1 配置，充分混匀。对于小型印迹，建议准备 8 - 10 mL 体积的底物工作液，对于中型印迹，建议准备 15mL 体积的底物工作液（每 m<sup>2</sup> 的膜大约需要 0.1 mL 工作溶液）。

4. 滴加发光底物工作液到印迹膜上，确保工作液均匀覆盖在膜上，室温孵育 1-2 分钟。

5. 将印迹膜从底物工作液中取出，用吸水纸吸去过多的液体，将膜放置于洁净保鲜膜中间，使用气泡滚轮或玻璃移液管滚动去除气泡。

6. 使用胶片或适当的成像系统进行印迹成像。

7. 胶片检测：将膜固定于片夹内，暗室内压片 1 分钟，立即显影定影，根据结果再调整压片时间。

## 荧光 Western Blot

随着荧光检测的普及，许多研究人员将 western blot 的检测方法从化学发光转到多重荧光。因为荧光检测能够实现多重 western blot 分析，并生成可定量的精准数据满足期刊杂志对于数据发表的要求。

|  | 化学发光 WB | 荧光 WB |
|--|---------|-------|
|--|---------|-------|

|        |                                                   |                                                |
|--------|---------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| 信号源    | 酶促反应的间接信号                                         | 荧光基团的直接信号                                      |
| 信号持续时间 | 较短（几分钟到几小时）                                       | 较长（几天到几周）                                      |
| 灵敏度    | 优异，可用底物种类多样                                       | 良好，但可能需要更高浓度的二抗                                |
| 一致性    | 印迹间可能存在差异                                         | 印迹间的重复性较高                                      |
| 检测     | 胶片和成像仪器                                           | 需要带有合适光源和滤光片的成像仪器                              |
| 定量     | 单通道检测使标准化较为困难                                     | 带有内部对照的多重分析技术使标准化较易实现                          |
| 其他注意事项 | 相似分子量的靶点需要进行剥离和印迹的重新检测<br>曝光时间可以较长，因为捕捉信号时不需要激发光源 | 需要注意避免荧光背景<br>由于少量的激发光会穿过滤光片，因此曝光时间更长会导致背景荧光较高 |

## 1. 荧光 Western Blot 注意事项

（1）为了获得清晰明亮的条带，可以使用 western blot 中充分验证的抗体。多重检测时，确保使用的每个一抗都来自不同的种属，以免发生交叉反应。

（2）根据裂解液的类型选择合适的内参抗体。使用某些裂解液的时候，一些内参会不使用，例如血浆不适合用 GAPDH 作为内参。选择内参抗体时，不要选择分子量与一抗重叠的。

（3）使用荧光法时，二抗的浓度一般较高，需进行优化才能实现较高的信噪比。需使用预吸附的二抗，尽可能将种属的交叉反应降至最低。

（4）为了消除主要的背景硬光源，可使用自发荧光较低的膜，如硝酸纤维素 NC 膜和低荧光 PVDF 膜。

（5）含有溴酚蓝的上样缓冲液会发出荧光，可能会增强背景荧光。建议使用不含溴酚蓝的荧光兼容性上样缓冲液。如果使用含有溴酚蓝的上样缓冲液，可在转印前使染料前沿与凝胶分离，或在转印膜上切下染料前沿，以防止产生背景荧光信号。

（6）减少凝胶中蛋白 marker 的上样量，如果预染 marker 中包含荧光条带，过度上样会增加背景荧光并增加对邻近泳道的信号渗透。

（7）封闭缓冲液也会产生自发荧光，导致高背景，有些供应商会提供经过荧光优化的 western blot 封闭缓冲液，有 PBS 和 TBS 两种类型。不要在封闭液中添加去垢剂，否则可能会增强背景荧光。

(8) 避免沉淀在膜上产生伪荧光信号。钢笔标记会产生部分自发荧光，使用铅笔来标记膜；处理膜时要小心，佩戴手套使用清洁的钝镊子，避免刮擦/起皱产生伪荧光信号；缓冲液中未溶解的颗粒，如封闭缓冲液中的牛奶粉末，可能会沉淀到膜上产生伪荧光信号，因此确保所有成分都充分溶解，并过滤和灭菌所有缓冲液。

(9) 为了避免产生任何可能的光漂白，孵育和洗涤期间需使用铝箔避光。

(10) 对于荧光染色，必须确保膜干燥。

## 2. 荧光 western blot 步骤

(1) 转膜前所有步骤均和发光法 western blot 一致。

(2) 完成蛋白质转印后，用去离子水漂洗膜 4 次，在摇床上洗涤，每次持续 5 分钟。

(3) 用去离子水将荧光封闭缓冲液 (10×) 稀释至 1× (不要在封闭液中添加去垢剂，否则可能会增强背景荧光)。

(4) 将低荧光 PVF 膜或 NC 膜放在充足体积的封闭液中，摇床上室温封闭 1 小时。对于一般孵育盒，至少用 15mL (mini 印迹) 和 30mL (midi 印迹) 封闭缓冲液，以将膜完全覆盖，避免使用小体积，因为摇晃和覆盖的不同会导致背景荧光较高或不均匀。

(5) 根据供应商的建议用封闭缓冲液稀释一抗。

(6) 将膜上结合蛋白的一面朝上至于抗溶液中，摇床上室温孵育 1 小时，或 4℃ 孵育过夜。

(7) 一抗孵育结束后，TBST 摇动洗膜 3 次，每次 5 分钟，去除残留的一抗。

(8) 按照说明书推荐的稀释倍数，用 TBST 稀释预吸附荧光二抗

(9) 将膜上结合蛋白的一面朝上至于二抗溶液中，摇床上室温孵育 1 小时。注意避光。

(10) 二抗孵育结束后，TBST 摇动洗膜 3 次，每次 5 分钟，去除残留的二抗。注意避光。

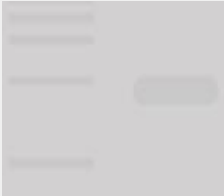
(11) 将膜上多余的 TBST 沥干，对于荧光染色，必须确保膜干燥。将膜放置在两片滤纸之间，并储存在阴暗处避光保存。

(12) 使用合适的荧光扫描仪并根据制造商的建议扫描膜。如可使用 Licor Odyssey CLx 近红外双色荧光成像和 iBright FL1000 智能成像系统 (可化学发光成像和 4 色荧光成像)。

## Western Blot 常见问题解析

所有的实验和模型系统都是不同的，因此有时即使按照标准实验方案操作，

可能也无法获得预期的结果。我们针对背景高、信号弱或无信号，有杂带等，提出了可能的原因及一些解决方法，希望能有所帮助。

| 结果                       | 具体问题                                                                                                                | 原因及解析         | 解决方案                                        |
|--------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|---------------------------------------------|
| 无信号或条带模糊<br><br>无信号或条带模糊 | 蛋白 marker 在内所有条带都很模糊或者没有信号<br>    | 转膜不充分         | 转膜过程中，用滚轮除去三明治夹心中的气泡，确保凝胶和膜充分接触             |
|                          |                                                                                                                     |               | 确保转印三明治以正确的方向放置在转印设备中                       |
|                          |                                                                                                                     |               | PVDF 膜需预先浸在甲醇中活化，然后浸到转印缓冲液中                 |
|                          |                                                                                                                     |               | 使用可逆染色剂丽春红检测转膜效果                            |
|                          |                                                                                                                     |               | 增加转印时间或电压                                   |
|                          |                                                                                                                     | 过度洗膜          | 缩短洗涤时长或减少洗涤次数                               |
|                          |                                                                                                                     | 洗涤或孵育缓冲液污染    | 使用新鲜配制的无菌缓冲液                                |
|                          |                                                                                                                     | 成像时曝光时间多短     | 延长曝光时间                                      |
|                          | 蛋白 marker 条带正常，样本泳道条带模糊或没有信号<br> | 样本制备不成功       | 采集合适的样本，添加蛋白酶抑制剂，全程在冰上进行                    |
|                          |                                                                                                                     | 一抗二抗不匹配       | 二抗需和一抗宿主相同，且对应实验应用。如一抗是兔抗，做 WB，则可选择山羊抗兔-HRP |
|                          |                                                                                                                     | 抗体浓度过低        | 增加抗体浓度，延长孵育时间，如 4℃ 孵育过夜                     |
|                          |                                                                                                                     | 样本中无靶蛋白或蛋白含量低 | 增加上样量，每泳道蛋白上样量不低于 20-30μg                   |
|                          |                                                                                                                     |               | 选择表达靶蛋白的样本，浓缩样本使信号最大化                       |

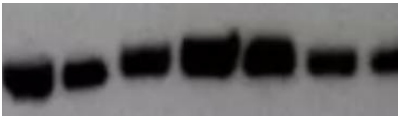
|  |  |             |                                                                   |
|--|--|-------------|-------------------------------------------------------------------|
|  |  | 转膜不充分       | 转膜过程中，用滚轮除去三明治夹心中的气泡，确保凝胶和膜充分接触                                   |
|  |  |             | 确保转印三明治以正确的方向放置在转印设备中                                             |
|  |  |             | PVDF 膜需预先浸在甲醇中活化，然后浸到转印缓冲液中                                       |
|  |  |             | 使用可逆染色剂丽春红检测转膜效果                                                  |
|  |  |             | 增加转印时间或电压                                                         |
|  |  | 与膜的结合不充分    | 对于分子量大于 100kDa 的蛋白，建议在转膜缓冲液中添加终浓度为 0.1% 的 SDS，将甲醇浓度降至 10% 或更低     |
|  |  |             | 对于分子量小于 20kDa 的蛋白，建议用 0.22μm 的 PVDF (NC) 膜，转膜缓冲液中添加 20% 甲醇，不加 SDS |
|  |  | 抗原被封闭液掩盖    | 减少封闭液中的蛋白浓度，尝试换一种封闭液                                              |
|  |  | 缓冲液中含叠氮化钠   | 叠氮化钠会抑制 HRP，避免与 HRP 标记抗体一起使用                                      |
|  |  | 化学发光底物的信号太弱 | 增加膜与底物的孵育时间                                                       |
|  |  |             | 增加胶片曝光时间                                                          |
|  |  |             | 样品蛋白含量低时，建议使用超敏 ECL 发光液                                           |
|  |  | 膜已剥离并重新检测   | 避免同一张膜的多次重复剥离                                                     |
|  |  |             | 缩短在剥离液中的孵育时间，以防止抗原丢失                                              |
|  |  | 跨膜蛋白        | 跨膜蛋白高温煮沸，蛋白容易交缠在一起，导致抗原表位无法暴露使用，未煮沸的样本，如室温孵育 15 分钟                |

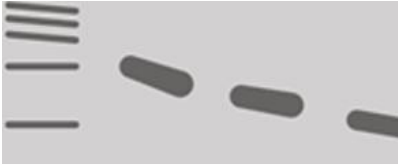
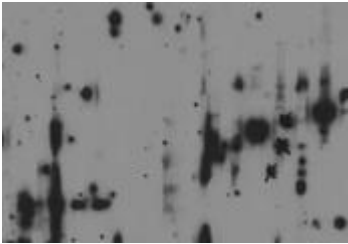
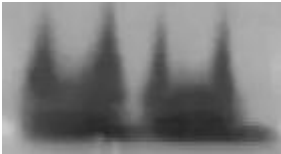
|                                                                                                    |                  |                           |                                                                               |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|---------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                                    | 重组蛋白或过表裂解液，未出现条带 | 重组蛋白或表达载体不合格              | 使用考马斯亮蓝染色或银染色进行验证，或用标签抗体进行检测                                                  |
|                                                                                                    |                  | 不是全长蛋白，抗体的免疫原不在此蛋白序列      | 使用免疫原在此该蛋白序列中的抗体                                                              |
|                                                                                                    |                  | 免疫原和标签位于同一端，导致标签可能阻碍抗体的识别 | 重新构建重组蛋白或过表达载体，不要让免疫原和标签位于同一端，或者使用免疫原不靠近标签的抗体                                 |
| <div>高背景</div>  |                  | 抗体浓度过高，导致非特异性结合           | 降低一抗或二抗的浓度                                                                    |
|                                                                                                    |                  | 封闭液选择不当                   | 不要在亲和素-生物素系统中使用牛奶进行封闭。牛奶中含有生物素，这会导致背景过高。                                      |
|                                                                                                    |                  |                           | 检测磷酸化蛋白时，避免使用磷酸盐缓冲液（如 PBS）和含磷酸化蛋白的封闭剂（如牛奶或酪蛋白）。可以使用含 BSA 的 Tris 缓冲液（如 TBS）封闭。 |
|                                                                                                    |                  |                           | 使用碱性磷酸酶（AP）标记物时，应选择 Tris 缓冲体系（TBS）的封闭液，因为磷酸盐缓冲液（PBS）会干扰 AP 的活性。               |
|                                                                                                    | 非特异性位点的不充分封闭     |                           | 增加封闭液中的蛋白浓度                                                                   |
|                                                                                                    |                  |                           | 优化封闭时间和温度。在室温（RT）下封闭至少 1 小时，或在 4℃ 下封闭过夜                                       |
|                                                                                                    |                  |                           | 在封闭液中添加 Tween 20 去垢剂有助于减少背景，但是过多的去垢剂会干扰抗体结合，通常 0.05% 的终浓度比较合适                 |
|                                                                                                    |                  |                           | 使用包含 0.05% Tween 20 去垢剂的封                                                     |

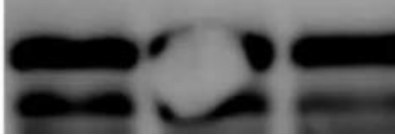
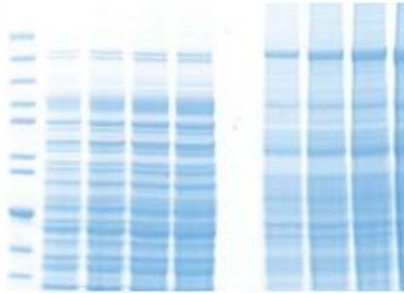
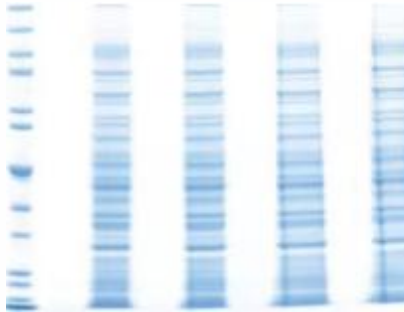
|  |             |                                                                  |
|--|-------------|------------------------------------------------------------------|
|  |             | 闭液稀释抗体                                                           |
|  | 洗涤不充分       | 增加漂洗次数和漂洗缓冲液的体积                                                  |
|  |             | 将 Tween 20 去垢剂添加到洗涤液中，终浓度为 0.05%。如果 Tween 20 去垢剂的浓度过高，它会从膜上剥离蛋白质 |
|  | 印迹膜处理不当     | 根据说明书润湿并活化膜                                                      |
|  |             | 处理膜时，请始终戴上干净的手套并使用镊子                                             |
|  |             | 始终用液体覆盖膜以防止干燥                                                    |
|  |             | 所有孵育过程中都要进行震荡                                                    |
|  |             | 小心处理膜——损坏膜会引起非特异性结合                                              |
|  | 设备或材料被污染    | 在使用之前制备新鲜的缓冲液并过滤                                                 |
|  |             | 只能使用干净且无污染的电泳设备、印迹设备和培养皿                                         |
|  | 化学发光底物的信号太强 | 减少印迹的成像或曝光时间                                                     |
|  |             | 换用灵敏度更低的底物                                                       |
|  |             | 缩短膜与底物的孵育时间。                                                     |
|  |             | 孵育结束后，完全去除底物                                                     |
|  |             | 降低抗体浓度，特别是 HRP 和 AP 标记二抗的浓度                                      |
|  | 二抗发生非特异结合   | 添加不含一抗的对照，尝试使用预吸附二抗                                              |
|  | 印迹膜变干       | 用缓冲液覆盖膜，防止膜在孵育过程中变干                                              |

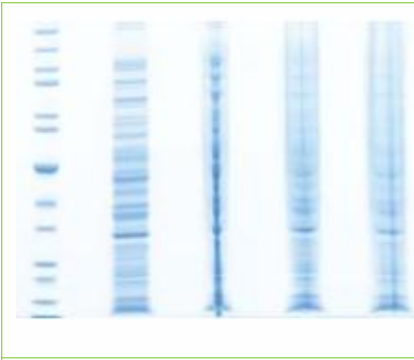
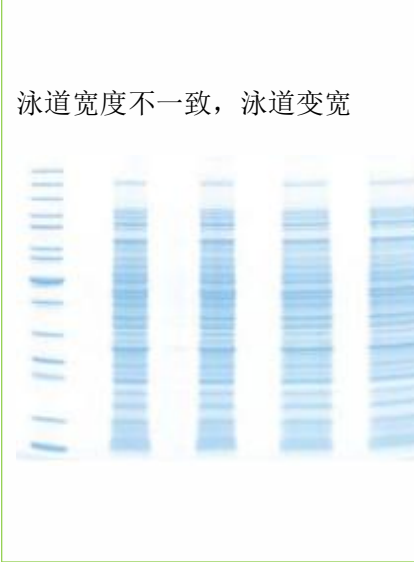
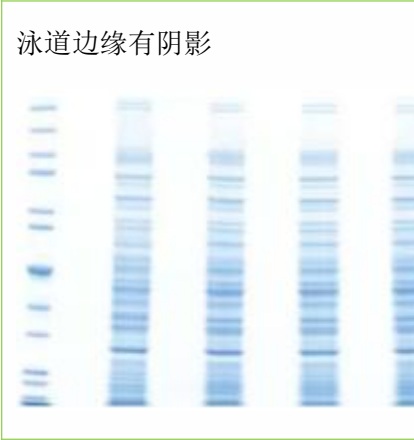
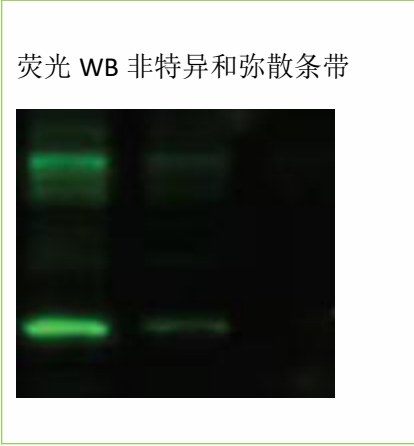
|                                                                                                      |                  |                                                                                                                            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                                      | 在一个容器中孵育两个或多个膜   | 确保将它们背靠背放置                                                                                                                 |
|                                                                                                      | 印迹成像时，曝光时间过长     | 尝试缩短曝光时间                                                                                                                   |
|                                                                                                      | 膜选择导致的高背景        | 硝酸纤维素（NC）膜产生的背景比PVDF膜低，如果高背景存在，可考虑使用硝酸纤维素（NC）膜                                                                             |
|                                                                                                      | 裂解方法强度不够         | 使用高强度裂解方法，以增强信号，减少非特异性条带                                                                                                   |
| <p>非特异条带或多条带</p>  | 蛋白降解             | 如果在低分子量处看到多个条带，很可能就是这个原因引起的。使用新鲜的裂解液，添加蛋白酶抑制剂                                                                              |
|                                                                                                      | 蛋白质形成多聚体         | <p>在分子量（预期条带分子量的 2 倍或 3 倍）处看到额外条带，很可能就是这个原因引起的</p> <p>如果样本还原不充分，一些蛋白质会因二硫键的形成而形成二聚体、三聚体或更大的多聚体</p> <p>延长样本在上样缓冲液中的煮沸时间</p> |
|                                                                                                      | 修饰，如重度糖基化        | <p>如果在分子量处出现多条带或者拖尾，很可能是这个原因引起</p> <p>可以尝试样本去糖基化，使用未煮沸的裂解液</p>                                                             |
|                                                                                                      | 蛋白质存在前体、剪切体等多种形式 | 查看文献，了解切割位点的位置以及包含抗体免疫原序列的片段                                                                                               |
|                                                                                                      | 细胞系传代次数过多        | <p>细胞系频繁传代，逐渐导致其蛋白质表达谱出现差异</p> <p>使用原始未传代的细胞系，与这些细胞系一起做平行对照实验。。</p>                                                        |
|                                                                                                      | 条带为非特异性条带        | <p>用封闭肽来区分特异性和非特异性条带。只有特异性条带能被封闭掉</p> <p>使用基因敲除裂解液或不表达靶蛋白</p>                                                              |

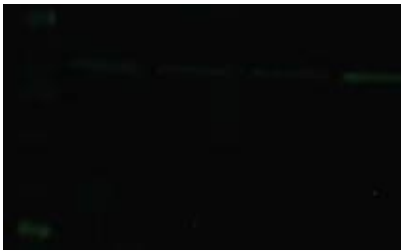


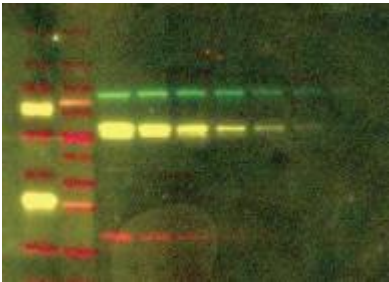
|                                                                                                     |                        |                                    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|------------------------------------|
|                                                                                                     |                        | 的样本                                |
|                                                                                                     | 抗体浓度过高                 | 降低抗体浓度，特别是一抗的浓度                    |
|                                                                                                     | 上样量过高                  | 减少上样量                              |
|                                                                                                     | 化学发光底物的信号太强            | 减少印迹的成像或曝光时间                       |
|                                                                                                     |                        | 更换特异性更好的抗体                         |
|                                                                                                     |                        | 缩短膜与底物的孵育时间                        |
| 条带分子量不对                                                                                             | 翻译后修饰                  | 查询文献，看是否存在糖基化、磷酸化、前体蛋白剪切、泛素化等翻译后修饰 |
|                                                                                                     | 蛋白质自身性质                | 蛋白质本身的电荷影响、转录异构体的存在、同源和异源聚合体和复合体等  |
|                                                                                                     | 实验体系的影响                | 如蛋白 marker 不准、电泳影响、蛋白提取过程中发生降解等    |
| 微笑条带<br>         | 电压过高或电泳温度过高            | 降低电压，在冷室或冰浴中进行电泳                   |
| 皱眉条带（某条条带变形）<br> | SDS-PAGE 中有气泡或不溶性颗粒    | 配胶中使用无杂质的液体                        |
| 皱眉条带<br>         | 凝胶和玻璃挡板底部有气泡，或者两边聚合不完全 | 调整装置                               |
| 哑铃条带                                                                                                | 凝胶不均匀                  | 配制胶有问题，胶凝固后不均一，样                   |

|                                                                                                         |                                |                                                        |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------------------------|
|                        |                                | <p>品中可能含有过多杂质</p> <p>重新配制凝胶，确保胶质量无问题；样品使用前离心</p>       |
| <p>条带不均匀</p>           | <p>凝胶聚合不均匀</p>                 | <p>检查凝胶配方，确认添加的 TEMED 是否适量</p> <p>确保凝胶在凝固时完全被缓冲液覆盖</p> |
| <p>条带呈白色（ECL 检测时）</p>  | <p>一抗和二抗的浓度可能过高</p>            | <p>抗体浓度过高，底物很快被消耗，此时吸收的光非常少，导致成像时出现白色条带</p>            |
| <p>竖条纹</p>           | <p>样品中含有不溶性颗粒</p>              | <p>样品充分溶解混匀，必要时离心去除</p>                                |
| <p>条带拖尾</p>          | <p>样品溶解不好；存在蛋白降解；电泳液反复多次使用</p> | <p>样品充分溶解混匀后上样；尽量使用新鲜样本；使用新鲜配制的电泳缓冲液</p>               |
| <p>条带粘连</p>          | <p>上样量太多；分离胶和浓缩胶之间有间隙，样品串孔</p> | <p>减少上样量和提高配胶质量</p>                                    |
| <p>条带空泡</p>                                                                                             | <p>转膜时膜上有气泡</p>                | <p>用滚轮除去气泡，确保凝胶和膜充分接触</p>                              |

|                                                                                                                        |                            |                                                                           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
|                                       |                            |                                                                           |
| <p>背景有不均匀的黑色斑点</p>                    | <p>封闭液未完全溶解，或抗体在膜上分布不均</p> | <p>封闭液确保充分溶解，封闭结束后用 TBST 清洗三遍再加一抗；抗体孵育时保持震动</p>                           |
| <p>蛋白条带分辨率低，泳道有纵向条纹且不直</p>           | <p>泳道的蛋白上样量过高</p>          | <p>减少蛋白上样量</p>                                                            |
| <p>样品过粘，样品泳道边缘有纵向条纹，哑铃型条带，泳道变宽</p>  | <p>样品中盐离子浓度过高（硫酸铵）</p>     | <p>进行透析以降低盐浓度</p> <p>电泳前，将样品浓缩并重新溶解于低盐缓冲液中</p> <p>确保样品中的盐浓度不超过 100 mM</p> |
| <p>蛋白质聚集导致形状诡异的狭窄泳道</p>                                                                                                | <p>DNA 污染</p>              | <p>上样前去除 DNA 以降低粘度</p>                                                    |

|                                                                                                           |                                                                 |                                                                                                                                                                             |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                          |                                                                 |                                                                                                                                                                             |
| <p>泳道宽度不一致，泳道变宽</p>     | <p>样品中盐离子浓度过高（氯化钠）；电泳液中去垢剂浓度过高（SDS 或 Triton X-100）；RIPA 浓度高</p> | <p>高盐浓度导致电导率增加，从而影响蛋白质迁移，可能导致蛋白质条带扩散到包含正常盐浓度样品的相邻泳道中</p> <p>透析降低盐浓度，样品浓缩重溶于低盐缓冲液，确保样品中盐浓度不超过 100mM；</p> <p>保持 SDS 与非离子型去垢剂的比例在 10:1 或更大，减少影响</p> <p>电泳前稀释样品，降低裂解缓冲液的终浓度</p> |
| <p>泳道边缘有阴影</p>         | <p>裂解液或样品缓冲液中的还原剂过多</p>                                         | <p>SDS-PAGE 中，还原剂 DTT（二硫苏糖醇）和 TCEP（三（2-羧基乙基）膦）的终浓度应小于 50 mM，<math>\beta</math>-ME（<math>\beta</math>-巯基乙醇）还原剂的终浓度应小于 2.5%</p>                                               |
| <p>荧光 WB 非特异和弥散条带</p>  | 抗体特异性不强                                                         | 使用在 western blot 中充分验证的抗体                                                                                                                                                   |
|                                                                                                           | 多重检测中的抗体交叉反应                                                    | 选择远亲物种的一抗                                                                                                                                                                   |
|                                                                                                           |                                                                 | 选择预吸附的二抗                                                                                                                                                                    |
|                                                                                                           |                                                                 | 优化一抗和二抗的用量                                                                                                                                                                  |
|                                                                                                           | 多重检测时，邻近                                                        | 避免同时使用光谱相近的标记物，尤                                                                                                                                                            |

|                                                                                                |             |                                          |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|------------------------------------------|
|                                                                                                | 通道荧光渗漏      | 其在信号非常强的情况下                              |
|                                                                                                |             | 确保使用成像仪检测到的荧光染料                          |
|                                                                                                |             | 使用仪器上的自动曝光功能确定每个通道上的最佳曝光时间               |
| 信号弱或无信号<br> | 抗体特异性不强，效价低 | 增加一抗浓度，使用新鲜抗体，避免多次重复使用稀释的抗体              |
|                                                                                                |             | 确保一抗具有理想的滴度，并对待检测的抗原具有特异性                |
|                                                                                                |             | 对于低丰度样本，增加一抗的用量和凝胶上样量                    |
|                                                                                                |             | 延长抗体孵育时间，4℃孵育过夜                          |
|                                                                                                |             | 使用抗体增强剂                                  |
|                                                                                                | 成像/曝光时间太短   | 延长曝光时间                                   |
|                                                                                                | 仪器设置不正确     | 确保选择了正确的激发和发射光范围                         |
|                                                                                                | 去垢剂使用不当     | 减少或去除去垢剂                                 |
|                                                                                                | 封闭液可阻断抗原    | 一些封闭液会过度封闭印迹并影响抗原与抗体的结合，特别是当封闭时间超过 1 小时后 |
|                                                                                                |             | 用洗涤缓冲液稀释一抗                               |
|                                                                                                |             | 尝试其他封闭液                                  |
|                                                                                                | 上样量不足       | 蛋白上样量过高可能会掩盖靶蛋白，降低抗体的识别能力                |
|                                                                                                |             | 蛋白上样量过低会导致抗原不足                           |
|                                                                                                |             | 对裂解物进行梯度稀释，以确定最合适的蛋白上样量                  |

|                                                                                                        |                       |                                                    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|----------------------------------------------------|
|                                                                                                        | 转印效果不佳或转印后蛋白质丢失       | 检查转印条件，确认蛋白质已转移                                    |
|                                                                                                        |                       | 检测新的靶蛋白时，可能需要重新优化转印条件                              |
| <p>背景高、不均匀、有斑点</p>  | 膜污染导致高背景              | 使用干净的镊子和孵育盒处理膜                                     |
|                                                                                                        |                       | 确定适合的封闭液，动物血清或脱脂牛奶这类封闭液可能导致交叉反应。                   |
|                                                                                                        |                       | 在封闭步骤中限制去垢剂的使用，常用去垢剂可自发荧光，通常会增加非特异性背景。封闭后，可以使用去垢剂。 |
|                                                                                                        | 蛋白 marker 上样量过高，导致假信号 | 减少蛋白 marker 上样量                                    |
|                                                                                                        | 漂洗或稀释溶液不合适            | 使用含有 0.1 - 0.2% Tween 20 去垢剂的漂洗缓冲液                 |
|                                                                                                        |                       | 用 0.05% Tween 20 去垢剂制备二抗稀释液                        |
|                                                                                                        |                       | 增加漂洗的次数或漂洗时间                                       |
|                                                                                                        | 二抗浓度过高导致高背景           | 优化二抗稀释比                                            |
|                                                                                                        | 膜干燥导致背景斑点或不均匀         | 在所有孵育步骤中，确保液体充分覆盖整个印迹膜，震荡孵育                        |
|                                                                                                        | 膜选择不当                 | 选择低荧光 PVDF 膜和 NC 膜                                 |
|                                                                                                        | 印迹膜上有灰尘或指印            | 使用干净的镊子进行处理，避免用手直接接触膜                              |
|                                                                                                        |                       | 使用干净的孵育托盘或孵育盒-先用甲醇冲洗，再用水冲洗，有助于溶解并去除残留的染料           |
|                                                                                                        |                       | 如果使用湿转方法，需要清洁转印装                                   |

|  |  |                                  |
|--|--|----------------------------------|
|  |  | 置和沾满灰尘的耗材，避免产生斑点                 |
|  |  | 印迹成像前，用乙醇擦拭成像系统的托盘表面，去除灰尘、棉绒和残留物 |