

蛋白质印迹 (Western blot) 实验方案

溶液和试剂

裂解缓冲液

这些缓冲液可在 4 °C 下保存数周，或者以分装形式在 -20 °C 下保存长达 1 年。

Nonidet-P40 (NP40) 缓冲液

150 mM NaCl

1.0% NP40 (可用 0.1% Triton X-100 替代)

50 mM Tris-HCl pH 8.0

蛋白酶抑制剂 (一定要添加, 推荐 cocktail 形式的, 货号 A10004)

RIPA 缓冲液 (放射免疫沉淀试验缓冲液)

150 mM NaCl

1.0% NP-40 或 0.1% Triton X-100

0.5% 脱氧胆酸钠

0.1% SDS (十二烷基硫酸钠)

50 mM Tris-HCl pH 8.0

蛋白酶抑制剂 (一定要添加, 推荐 cocktail 形式的, 货号 A10004)

Tris-HCl 缓冲液

20 mM Tris-HCl pH 7.5

蛋白酶抑制剂 (一定要添加, 推荐 cocktail 形式的, 货号 A10004)

电泳、转膜、封闭缓冲液

Laemmli 2× 缓冲液/上样缓冲液

4% SDS

10% 2-巯基乙醇

20% 甘油

0.004% 溴酚蓝

0.125 M Tris-HCl

测定 pH 并调节至 pH 6.8。

电泳缓冲液 (Tris-甘氨酸/SDS)

25 mM Tris 碱

190 mM 甘氨酸

0.1% SDS

测定 pH, pH 应为约 8.3。必要时进行调节。



转膜缓冲液（湿转）

25 mM Tris 碱

190 mM 甘氨酸

20% 甲醇

测定 pH, pH 应为约 8.3。必要时进行调节。

对于大于 80 kDa 的蛋白质，推荐加入最终浓度为 0.1% 的 SDS。

转膜缓冲液（半干转）

48 mM Tris

39 mM 甘氨酸

20% 甲醇

0.04% SDS

封闭缓冲液

5% 奶粉（推荐使用，也可以用 BSA 牛血清白蛋白）

加入 TBST 缓冲液中。混匀并过滤。过滤失败可能导致出现“斑点”，其中微小的黑色颗粒会在显色过程中污染印迹。

实验步骤

样品裂解

1. 制备细胞培养物裂解物

- 1) 将细胞培养皿置于冰上，用冰冷的 PBS 洗涤细胞。
- 2) 吸出 PBS，然后加入冰冷的裂解缓冲液（每 10⁷ 细胞/100 mm 培养皿/150 cm² 培养瓶加入 1 ml；每 5×10⁶ 细胞/60 mm 培养皿/75 cm² 培养瓶加入 0.5 ml）。
- 3) 用预冷的塑料细胞刮棒刮下贴壁细胞，然后轻轻地将细胞悬浮液转移至预冷的微量离心管中。
- 4) 在 4 °C 下持续搅拌 30 分钟。随后进行超声处理，如果为探头超声仪为例，设置功率 40W 或者总功率的 40%，打 3 秒停 3 秒，根据裂解液多少，细胞超声 5-10 次，超声后溶液会变得澄清以及不再粘稠；超声后加 Loading 煮样，注意跨膜蛋白不建议煮样，直接加 Loading 上样即可；（水浴超声适当延长时间，超声 30 秒至 2 分钟，全程冰浴）
- 5) 如果没有超声仪，请用带注射器的针头(20G-18G-16G)冰上反复抽吸，直到裂解液澄清；

2. 制备组织裂解物

- 1) 用干净的工具切取目标组织，此操作最好在冰上进行，并且应尽快完成，以防止样品被蛋白酶降解。
- 6) 将组织置于圆底微量离心管或 Eppendorf 管中，并浸入液氮中进行“速冻”。将样品保存在 -80 °C 下以备后续使用，或放置在冰上直接进行匀浆。对于约 5 mg 的组织，向离心管中快速加入约 300 μL 裂解缓冲液，然后用电动匀浆器进行匀浆，用另外 300 μL 裂解缓冲液冲洗刀片两次，然后在 4 °C 下持续搅拌（例如，在回旋振荡器上）1-2 小时。随后进行超声处理，如果为探头超声仪为例，设置功率 40W 或者总功率的 40%，



打 3 秒停 3 秒，根据裂解液多少，组织超声 15-20 次，超声后溶液会变得澄清以及不再粘稠；超声后加 Loading 煮样，然后离心 2 分钟后上样。注意跨膜蛋白不建议煮样，直接加 Loading 上样即可；（水浴超声适当延长时间，超声 2 分钟-5 分钟，全程冰浴）

注意：分装细胞/组织裂解物 (50 - 100 μ L)，-80 保存，避免反复冻融循环。

注意：如果目标蛋白为核蛋白或者膜蛋白，建议使用膜蛋白或者核蛋白富集提取的方法进行蛋白提取。（膜蛋白提取试剂盒，货号 A10008；核蛋白提取试剂盒货号 A10009）

上样和电泳

1. 将等量的蛋白质和分子量标准上样到 SDS-PAGE 凝胶孔中。来源于细胞裂解物或组织匀浆的总蛋白的上样量为 20 - 30 μ g，纯化蛋白的上样量为 10 - 100 ng。
2. 在 100 V 下电泳 1 至 2 小时。
需要根据蛋白大小、仪器等条件对时间和电压进行一些优化。

建议设置内参对照：需要更具蛋白类型，使用全蛋白内参、核蛋白内参、膜蛋白内参以及各个亚细胞器的内参。

选择可参见 <https://mp.weixin.qq.com/s/5dpukCHuCZ8aWVOEGPTpQw>

将蛋白质从凝胶转移到膜上

膜可以是硝酸纤维素或 PVDF，两者各具优点。用甲醇“活化”PVDF 1 分钟，并在制备堆叠体之前用转膜缓冲液冲洗 PVDF。（可能需要对时间和电压进行一些优化。）

建议封闭步骤之前用丽春红染色法检查转膜。（1X 丽春红快染液，货号 A10010）

抗体染色

1. 用 5% 封闭溶液在室温下封闭膜 1 小时，或在 4 $^{\circ}$ C 下封闭过夜。
2. 用适当稀释度的一抗在 5% 封闭溶液中 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育膜，或在室温下孵育 2 小时。
3. 用 TBST 洗涤膜 3 次，每次 5 分钟。
4. 用推荐稀释度的标记二抗在含 5% 封闭缓冲液的 TBST 中室温孵育膜 1 小时。
5. 用 TBST 洗涤膜 3 次，每次 5 分钟，然后用 TBS 冲洗。
6. 移除多余的试剂，利用暗室显影技术采集化学发光图像，或利用常规图像扫描法采集比色检测图像。

注意：如果第一次显色未出条带，或者条带比较弱。可以先保存图片，然后用清水漂洗膜数分钟，重新使用超敏型的加发光液进行曝光。（超敏 ECL 化学发光试剂盒，货号 A10017）



常见问题：

1. 目的蛋白信号弱

一般如果有目的蛋白条带，但是目的蛋白信号弱，一般最主要的原因是目的蛋白含量少。建议增加蛋白上样量。如果没有进行过超声处理，建议提取蛋白超声处理。

如果背景不脏以及没有其他杂带，可以适当延长曝光时间。或者选择**使用超敏型的加发光液进行曝光。**（超敏 ECL 化学发光试剂盒，货号 A10017，<http://www.ab-mart.com.cn/page.aspx?node=%2066%20&id=%2017783>）



可能的其他原因，显色剂失效。

注意 1：跨膜蛋白最好不要煮样，容易导致蛋白沉淀。

注意 2：如果目标蛋白为核蛋白或者膜蛋白，建议使用膜蛋白或者核蛋白富集提取的方法进行蛋白提取。（膜蛋白提取试剂盒，货号 A10008，<http://www.ab-mart.com.cn/page.aspx?node=%2066%20&id=%2017733>；核蛋白提取试剂盒货号 A10009，<http://www.ab-mart.com.cn/page.aspx?node=%2066%20&id=%2017732>）

2. 背景脏

如果目的蛋白条带清晰，但是背景比较黑。建议更换封闭液和一抗稀释液。一般建议使用 5% 的脱脂奶进行封闭和一抗稀释。这种条件下，WB 背景会比较干净。如果目的蛋白条带比较弱且背景黑，建议按照 1 增加蛋白上样量，同时更换封闭液和一抗稀释液。

注：脱脂奶作为一抗稀释液，建议添加防腐剂（推荐货号 A10300，<http://www.ab-mart.com.cn/page.aspx?node=%2066%20&id=%2054955>）

即使没有使用防腐剂，牛奶变质的情况下，短时间内抗体一般也可以继续使用。

如果没有脱脂奶，可以尝试使用封闭液稀释一抗。

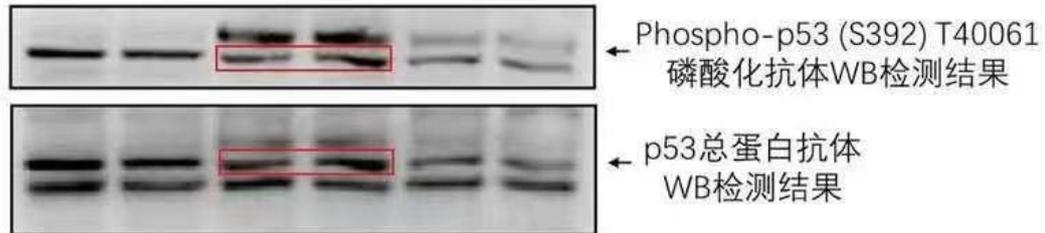
3. 有杂带

情况 1：目的蛋白条带比较强，但是有其他杂带。此种情况是由于一抗过量了，建议加倍稀释一抗。或者在稀释抗体的稀释液中添加 0.5% 的 SDS，可以去除一定的杂带情况。

情况 2：目的条带比较弱，同时还有杂带。建议同 2 的处理方式，增加蛋白上样量，同时更换封闭液和一抗稀释液。

情况 3：杂带位置在目的蛋白上面一点点，注意这个不是杂带，这个是目的蛋白被磷酸化修饰的带，一般当磷酸化强度比较强的时候，总蛋白的抗体是可以识别出来磷酸化的条带的，这是正常现象，不影响结果，计算的时候将两条带同时计算。如果非要去掉上面的磷酸化修饰带，可以尝试将抗体加倍稀释。

先用p-p53磷酸化抗体做WB检测（上图），
然后使用一抗二抗去除液洗膜，再重新孵育p53总蛋白的抗体进行WB检测（下图）。



说明：红框里面的带型是一模一样的，说明磷酸化抗体检测到的红框带就是磷酸化带（可能是单磷酸化修饰）下面的带是总蛋白（非修饰）的带，上面的带可能是多磷酸化修饰（也含有S392的磷酸化），或者同时还有其他修饰，导致蛋白分子量进一步上移。

4. WB 实验白板

可能原因 1：二抗使用错误，请注意一抗的来源；

可能原因 2：转膜效率低，特别是针对大分子量的蛋白（>100kd 以上的蛋白）。请参考这个文章的大分子量蛋白的转膜方法进行优化。

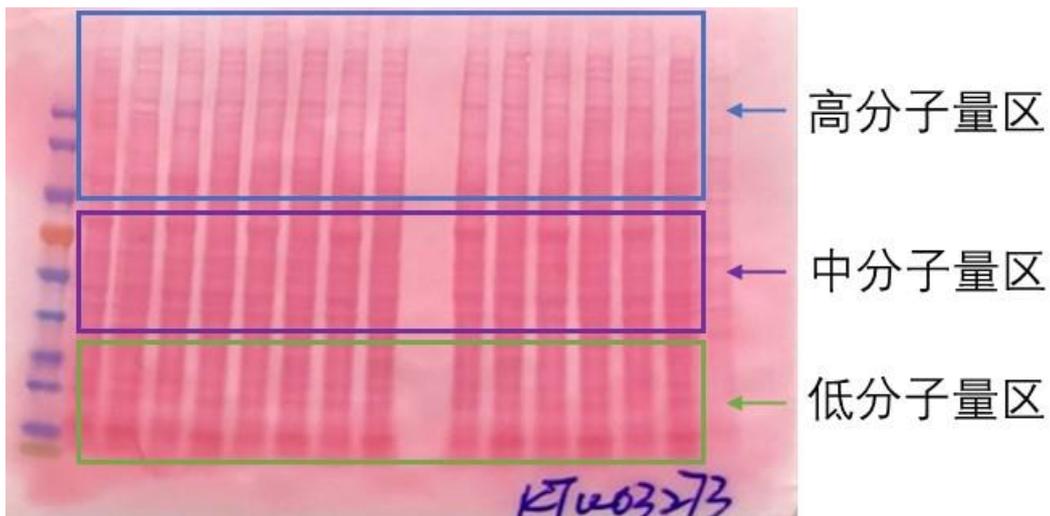
<https://mp.weixin.qq.com/s/rqRi3p3cztrzeSDyYOM0QA>

可能原因 3：蛋白分子量太小，一般分子量<15kd 的蛋白，需要使用 0.22 的 PVDF 膜，如果使用 0.44 的 PVDF 膜则容易转出去。

可能原因 4：如果条带是那种反白的，即背景黑，条带白，那么很可能是过曝了。一般重组蛋白检测，或者过表达检测容易出现。以及显色液反复给几张膜使用，可能后面的膜就会出现反白现象，建议重新加新的显色液。

可能原因 5：如果是裁膜的话，由于裁膜比较窄，或者蛋白有糖基化、泛素化、sumo 化等修饰导致分子量变大，而没在裁膜区间。（蛋白是否有这些修饰，建议在 uniprot 网站查询蛋白 PTM，<https://www.uniprot.org/>）。特别是一些 CD 类分子或者其他膜蛋白，往往有比较强的糖基化修饰。如果蛋白有上述这些修饰，建议全膜孵育，以确认目的条带位置。

可能原因 6：膜没有转好，marker 由于每一个分子量里面的蛋白量非常高，并不能完全体现正张膜的转膜质量，建议转膜完之后用“丽春红染色 QC 转膜质量”。观察是不是每个分子量区间都有比较清晰的蛋白条带，如果出现白色的空斑，说明有气泡。或者条带模糊或者很弱，说明转录效率不好。



5. 蛋白分子量不对

可能原因 1: 蛋白有糖基化、泛素化、sumo 化等修饰导致分子量变大, 而没在裁膜区间。

(蛋白是否有这些修饰, 建议在 uniprot 网站查询 PTM, <https://www.uniprot.org/>)。特别是一些 CD 类分子或者其他膜蛋白, 往往有比较强的糖基化修饰。

可能原因 2: 蛋白有不同的 isoforms, 即不同的转录本。(蛋白是否有不同的 isoforms, 建议在 uniprot 网站查询 <https://www.uniprot.org/>)。不同的 isoforms 分子量和表达组织是有差别的, 属于蛋白特性, 是正常情况。

可能原因 2: 蛋白存在剪切形式, 即翻译后的蛋白剪切, 会导致蛋白分子量变小。(蛋白是否有剪切, 建议在 uniprot 网站查询蛋白的 PTM, <https://www.uniprot.org/>)。

6. 条带拖尾、条带呈哑铃状等

最可能的原因是电泳过快, 建议减低电压跑, 以及需要控制电泳温度, 最好冰浴或者 4 度电泳。

如果提取蛋白没有进行超声处理, WB 条带也很可能会出现拖带现象, 这是由于核酸污染导致的。

7. 某个条带变形

原因: SDS-PAGE 胶中存在气泡或者某不溶性颗粒

解决办法: 配胶过程中要小心, 使用无杂质的液体。

经验: 很多实验室中使用的不是最新的设备, 比如配胶用的海绵垫, 如果用了很多年之后, 会从下面往上面漏小气泡, 当气泡足够小并且胶快凝固的时候, 走到中间的小气泡就停留在胶内, 并会影响到后面的跑胶。另外配胶用的水, SDS, Tris 缓冲液要注意不要有杂质。

建议使用预制胶进行电泳。(Absmart-Gel 变性蛋白预制胶, 货号 A10021)