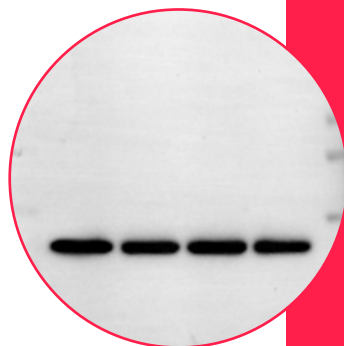
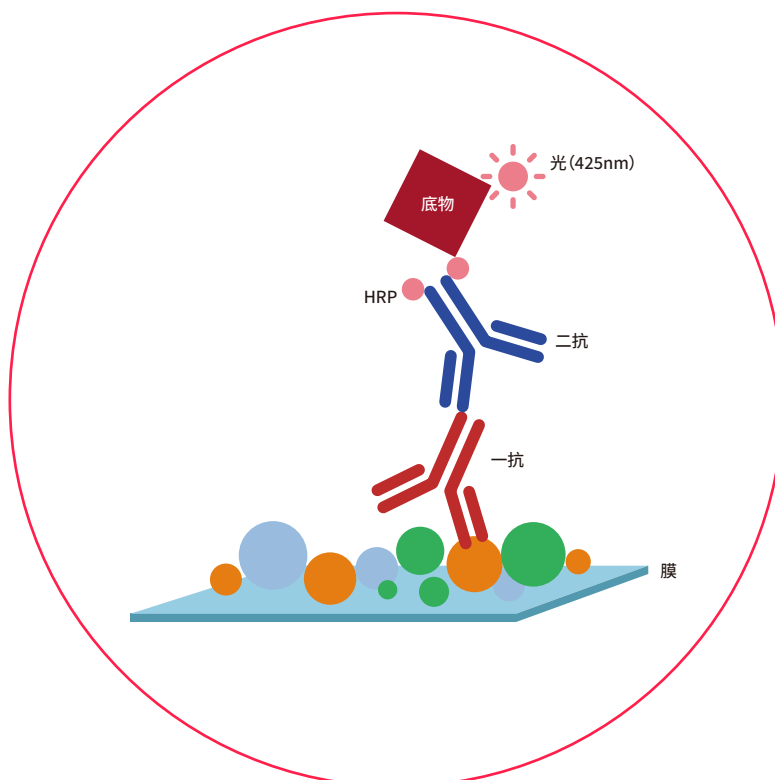




Western Blot(WB) 技术手册

蛋白免疫印迹实验全流程指南 · 从样品制备到结果分析



目录

01 技术背景

02 技术原理

03 操作步骤

04 异常结果分析

05 WB技术答疑

06 参考文献

一. 技术背景

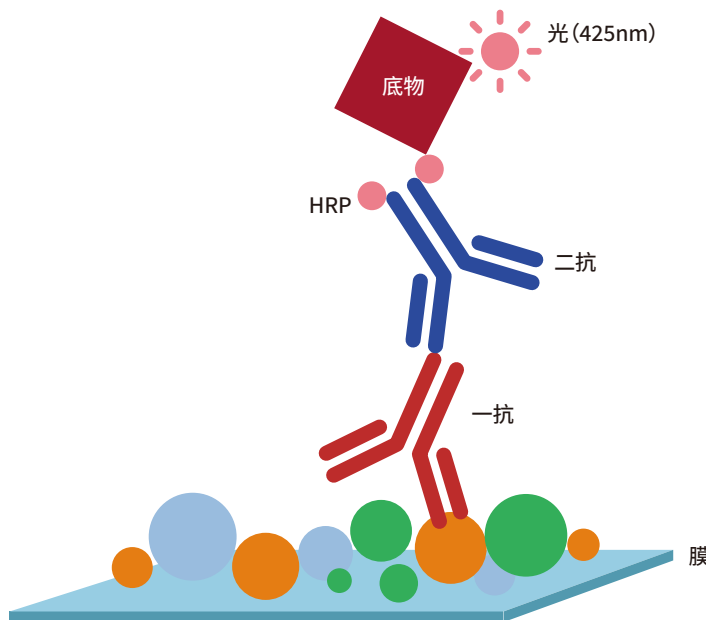
Western blot (WB) 又称蛋白免疫印迹，用于从复杂混合物中分离和鉴别特定蛋白，是现在广泛采用的基础蛋白分析手段。该技术由 Towbin 等人于 1979 年建立，最早建立的电泳转膜核心流程是利用聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离蛋白，然后将凝胶上的蛋白转移到硝酸纤维素膜上，借助抗体对目标蛋白质进行检测。西雅图Tobert Nowinski 实验室的 W. Neal Burnette 是第一个创造“蛋白免疫印迹” (western blotting) 这一术语的人。该术语是为了纪念 DNA 印迹 (blotting) 的命名者 Edwin Southern，也引用了 Nowinski 实验室的位置，即西 (West) 海岸。

技术定位

- 蛋白定性分析
- 蛋白半定量分析
- 蛋白表达量检测
- 蛋白翻译后修饰验证
- 生命科学基础研究必备技术

二. 技术原理

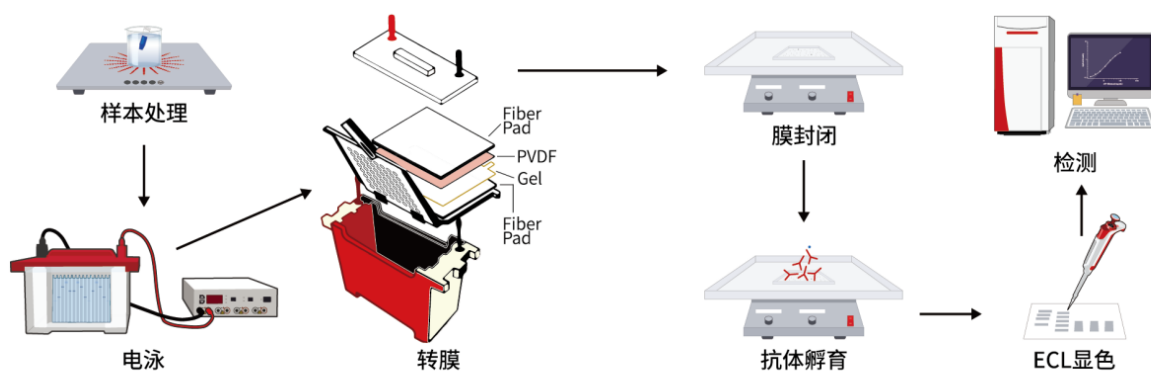
与 Southern 或 Northern 杂交方法类似，但 Western blot 采用的是 SDS-PAGE，被检测物是蛋白质，「探针」是抗体，「显色」用标记的二抗。先经过 SDS-PAGE 分离蛋白质样品，由于凝胶不利于抗体与其中的蛋白质结合，所以需要将蛋白质转移到固相载体（例如 PVDF 膜）上，固相载体以非共价键形式吸附蛋白质，且能保持电泳分离的多肽类型及其生物学活性不变。以固相载体上的蛋白质或多肽作为抗原，与对应的一抗起免疫反应，再与酶或同位素标记的二抗反应，经过底物显色或荧光成像等方法以检测电泳分离的蛋白质，由此对目的蛋白进行定性和半定量分析。



化学发光蛋白免疫印迹检测过程中酶-底物反应示意图

三. 操作步骤

实验方法-图解WB



第 1 阶段 - 样品制备

关键试剂

- 裂解缓冲液 (如 RIPA)
- 蛋白酶抑制剂混合液
- 5X上样缓冲液
- 磷酸酶抑制剂混合液 (用于磷酸化蛋白, 可选)
- BCA 或 Bradford 检测试剂盒

1.提取总蛋白

(1) 对于组织样品：

- a. 组织块用预冷 PBS 洗涤, 去除血污, 剪成细小碎块置于匀浆器中。
- b. RIPA 裂解液的使用量可按照约每 30 mg组织与 300 μ L裂解液的比例添加, 低温匀浆。如果裂解缓冲液中不含蛋白酶抑制剂, 则需在临用前加入蛋白酶抑制剂。对于磷酸化蛋白, 则需在临用前加入磷酸酶抑制剂。

Tip1:如果裂解不充分可以适当添加裂解液;如组织蛋白含量较低,可降低裂解液的用量,以提高粗提溶液中的蛋白浓度。

- c. 将匀浆液转移至 1.5 mL离心管中, 振荡。冰浴 30 min, 期间每10 min用移液器反复吹打, 确保组织细胞完全裂解。
- d. 12000 g 离心 5 min, 收集上清, 即为总蛋白溶液, -80 $^{\circ}$ C保存备用。

(2) 对于贴壁细胞样品：

- a. 用 PBS 清洗细胞 2-3 次, 最后一次彻底吸干残留液。
- b. 按照 6 孔板每孔细胞 250 μ L裂解液的比例吸取 RIPA 裂解液于细胞培养板/瓶内, 反复晃动培养板/瓶, 使裂解液与细胞充分接触 3-5 min。
- c. 用细胞刮刀将细胞刮下, 收集到离心管中。
- d. 冰上裂解 30 min。
- e. 12000 g 离心 5 min, 收集上清, 即为总蛋白溶液, -80 $^{\circ}$ C保存备用。

3) 对于悬浮细胞样品：

- a. 将悬浮细胞培养液转移至离心管中, 4 $^{\circ}$ C, 1000-3000 rpm离心 5 min, 弃上清。

- b. 加入预冷的 PBS (用量约为细胞沉淀的 5-10 倍体积), 轻柔吹打混匀, 4 °C离心 5 min, 弃上清。重复洗涤 2-3 次, 彻底去除培养基中的血清蛋白。
- c. 按照 6 孔板每孔细胞 250 μL裂解液的比例将细胞与 RIPA 裂解液混合, 振荡。
- d. 冰浴 30 min, 期间每 10 min 用移液器反复吹打数次, 确保细胞完全裂解。
- e. 12000 g 离心 5 min, 收集上清, 即为总蛋白溶液, -80 °C保存备用。

2. 测蛋白浓度

使用 Bradford 法或 BCA 测定法测定裂解液中的蛋白浓度。(如果此时的蛋白浓度较低, 并且驻留在细胞核或线粒体中, 可以考虑分离细胞组分, 富集目的蛋白。)

3.加上样缓冲液变性

样本和5X上样缓冲液按照4:1添加, 混匀后95 °C水浴或金属浴加热10 min, 使蛋白充分变性, -20 °C保存备用。

(不同类型样本裂解的内容可参考EnkiLife不同类型样本裂解方案综合指南)

第 2 阶段 - 上样和跑胶

关键试剂

- 预染蛋白Marker
- SDS-PAGE凝胶 (如 Tris-Glycine凝胶、Bis-Tris凝胶、Tris-Tricine凝胶)
- 电泳缓冲液 (如 Tris-Glycine、MOPS/MES、Tris-Tricine)

1.制胶

以Tris-Glycine凝胶为例。配方如下：

分离胶 (以1.0mm, 2板胶为例)

适用分子量范围参考	>100 kDa	50-100 kDa	20-80 kDa	<40 kDa
胶浓度	8%	10%	12%	15%
30% Acr-Bis (29:1)	2.7 mL	3.3 mL	4.0 mL	5.0 mL
1.5M Tris-HCl pH8.8	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL
10% SDS	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL
10% 过硫酸铵 (APS)	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL
TEMED	4 μL	4 μL	4 μL	4 μL
ddH ₂ O	4.6 mL	4.0 mL	3.3 mL	2.3 mL
总体积	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL

浓缩胶 (以1.0mm, 2板胶为例)

胶浓度	4%
30% Acr-Bis (29:1)	0.83 mL
1.5M Tris-HCl pH6.8	1.25 mL
10% SDS	0.05 mL
10% 过硫酸铵 (APS)	0.05 mL
TEMED	5 μ L
ddH ₂ O	2.82 mL
总体积	5 mL

Tip1:用于制胶的玻璃板注意使用前清洗干净并晾干。

Tip2:TEMED、过硫酸铵 (APS) 最后加入,并在倒胶之前充分混匀。

Tip3:蛋白越大,丙烯酰胺在凝胶中的百分比越低。这就会产生一种密度较低的多聚体,使得蛋白更容易通过。

配置合适浓度的分离胶,注入制胶板至距离短胶板上沿约1.5cm(配置的溶液过量,请勿全量注入),向胶板内轻轻注入 ddH₂O或异丙醇起到液封作用,促进分离胶凝固;约 20 min分离胶即可凝固,弃去用于液封的 ddH₂O或异丙醇,并倾斜放置胶板一会,让残余的 ddH₂O汇聚到一起后方便使用滤纸吸尽;胶板放平,将配置的浓缩胶继续注入胶板中,至薄玻璃板的上缘即可,尽量不要产生气泡,然后轻轻插入梳子;浓缩胶约 20 min后即可凝固使用。

Tip1:Tris-Tricine凝胶比 Tris-Glycine凝胶更好的分离低分子量蛋白(<10 kDa)。

Tip2:梯度胶可以提供更清晰的条带,在一种凝胶上提供更大的蛋白检测范围,如10-250 kDa。

Tip3:根据目标蛋白分子量(MW)配置SDS-PAGE凝胶。也可选择预制胶或即凝广谱梯度制胶试剂盒,减少制胶时间,且蛋白分离范围广。

2.上样

将变性后的蛋白样本等量加入凝胶中。蛋白上样量一般为10-20 μ g。

Tip1:防止过载;否则可能会导致样品溢出到相邻的孔内。

Tip2:注意移液器吸头不要触及样本孔的底部,防止条带变形。

3.电泳

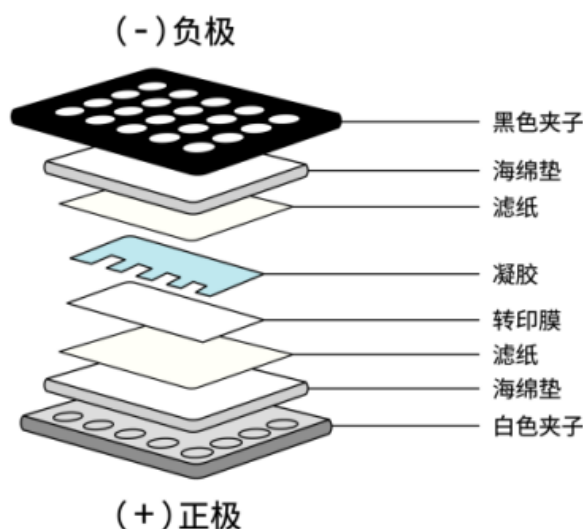
根据凝胶类型匹配相应的电泳缓冲液;或者选择通用型快速电泳缓冲液,无需因凝胶类型变更而更换电泳液,且30 min即可完成电泳,大幅缩短电泳时间。

Tip1:使用的仪器、凝胶成分、缓冲液体系和目标蛋白不同,跑胶时间也会有所不同。蛋白分子量越大,跑胶时间也越长。实际电泳时间以溴酚蓝到达凝胶底端或预染 Marker 分离充分为准。

第3阶段 - 蛋白转膜(以湿转为例)

关键试剂

- SDS-PAGE 凝胶
- 转膜缓冲液
- 洗涤缓冲液(如 TBST)
- 印迹膜(NC膜或 PVDF膜)
- 甲醇/乙醇(激活 PVDF膜时需要)
- 海绵垫
- 滤纸(可选)
- 丽春红染色液(可选)



湿转中凝胶-印迹膜三明治组装细节示意图

1. 浸泡印迹膜和海绵垫

由于 PVDF膜天然具有疏水性, 使用 PVDF膜时, 需提前在甲醇/乙醇中浸泡30 s。(该步骤对于 PVDF膜来说是必要的, 但NC膜不需要。) PVDF膜激活后, 和海绵垫一起在转膜缓冲液中室温浸泡平衡 3-5 min。

Tip1: WB实验所需印迹膜的孔径多为0.45 μm 和0.22 μm 。0.45 μm 适用于20 kDa以上的蛋白质, 0.22 μm 适用于20 kDa以下的低分子量蛋白质。

2. 转膜

(1) 将胶从电泳槽中取出, 在转膜缓冲液中室温浸泡平衡 3-5 min。

(2) 以海绵垫-滤纸(可选)-胶-印迹膜-滤纸(可选)-海绵垫的方式, 将其紧密排列, 确保各个夹层之间没有气泡。

Tip1: 注意凝胶靠近负极, 印迹膜靠近正极。

Tip2: 转膜时间可能因仪器、转膜液以及目标蛋白分子量大小而不同。传统转膜缓冲液所需转膜时间较长且需要冰浴条件。或者可选择免冰浴快速转膜缓冲液, 全程室温条件下, 400 mA 25 min即可完成转膜(大分子量蛋白适当延长转膜时间)。

(3) 转膜完成后, 将印迹膜取出, 在 TBST中润洗一遍。

Tip1: 如果需要观察蛋白转膜情况, 可用丽春红染印迹膜, 观察完用 TBST清洗干净。

第4阶段 - 封闭和抗体孵育

关键试剂

- 封闭缓冲液(如含3-5%牛奶或BSA的 TBST)
- 洗涤缓冲液(如 TBST)
- 抗体稀释液(如含3-5%牛奶或BSA的 TBST)
- 一抗
- 偶联标记二抗

1. 封闭

将印迹膜放入孵育盒, 并用封闭缓冲液覆盖, 摇床上室温孵育 1-2 h。

Tip1:若想缩短封闭时间,可考虑 5 min无蛋白快速封闭液,且很好的兼容修饰性抗体的WB检测。

2.抗体孵育

(1) 根据抗体说明书中推荐的稀释比进行一抗和二抗稀释。

(2) 一抗孵育:4 °C,摇床上过夜孵育,或摇床上室温孵育2 h。孵育时间需根据靶标在所用样本中的表达情况优化调整。

(3) 洗涤缓冲液洗涤印迹膜 3 次,每次 5 min。

(4) 二抗孵育:室温下,摇床上孵育 1-2 h。

(5) 洗涤缓冲液洗涤印迹膜 3 次,每次 5 min。

Tip1:若想告别过夜孵育、跨昼夜实验,可考虑免封闭快速抗体稀释液,首次使用直接省去2 h封闭时间,且一抗+二抗仅需室温40 min就可完成抗体孵育。

第 5 阶段 - 显影

关键试剂

- 化学发光底物(如 ECL化学发光液)

孵育完成后,即可对印迹膜进行成像。化学发光检测是在化学发光底物溶液中孵育印迹膜,促使存在 HRP偶联抗体的地方发光。

第 6 阶段 - 抗体剥离(可选)

关键试剂

- 抗体剥离液

- 洗涤缓冲液(如 TBST)

- 化学发光底物(如 ECL化学发光液)

- 封闭缓冲液

显影完成后,需要对印迹膜重新进行其他抗体检测时,可选择抗体剥离。

1.抗体剥离

(1) 在合适的容器内,将曝光完成的印迹膜浸泡到10-15mL的抗体剥离液中(以完全浸没印迹膜为准),置于摇床室温孵育10 min(剥离时间以实物产品说明书为准)。

(2) 洗涤缓冲液洗涤印迹膜 3次,每次 5 min。

(3) 显影检测,若信号仍存在,则重复步骤 1和 2,直至印迹膜无信号。

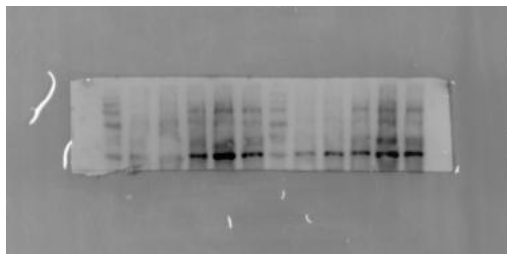
2.开始新一轮 Western blot 免疫印迹实验

将清洗后的印迹膜重新封闭、孵育新的一抗。

四. 异常结果分析

针对高背景、背景有黑色细小颗粒、无信号或条带弱、出现多条带及条带形状异常等WB常见问题进行分析。

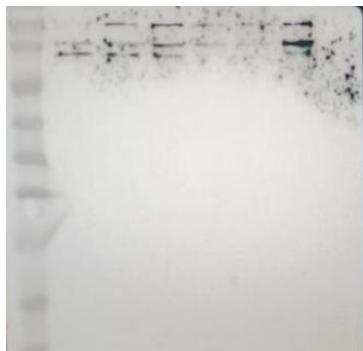
问题一：高背景



背景高但条带可见，条带与背景对比度低，信噪比差。
常见于抗体浓度过高、封闭不充分或洗涤不充分。

可能的原因	解决方案
抗体浓度过高	适当降低一抗和/或二抗浓度。
对非特异性位点的封闭不充分	(1)增加封闭缓冲液中蛋白质的浓度。 (2)优化封闭时间和/或温度。在室温下至少封闭 1 h 或在 4 °C 下过夜封闭。在含有 0.05% Tween 20 去垢剂的封闭缓冲液中制备抗体稀释液。在封闭缓冲液中加入 Tween 20 去垢剂可以帮助减少背景。然而,过多的去垢剂会干扰抗体的结合。终浓度为 0.05%吐温通常效果理想。
一抗可能与封闭剂结合	当检测磷酸化蛋白时,磷酸化特异性抗体可能会与牛奶封闭剂发生反应,避免使用磷酸盐的缓冲液(例如, PBS)和含磷酸化蛋白的封闭剂(例如, 牛奶或酪蛋白)。应选用 BSA或无蛋白封闭液进行封闭。
洗涤不充分	各步骤之间残留未结合的抗体或其他试剂会产生高背景。 增加漂洗次数和/或洗涤缓冲液用量。确保所有步骤之间用洗涤缓冲液充分洗涤。

问题二：背景有黑色细小颗粒



膜上散布黑色细小颗粒

可能的原因	解决方案
封闭剂未完全溶解	封闭前确保封闭剂完全溶解， 可提前一段时间配置， 并置于摇床加速溶解。

问题三：无信号或条带弱

情况A：Marker和目的蛋白条带都很弱或者没有信号

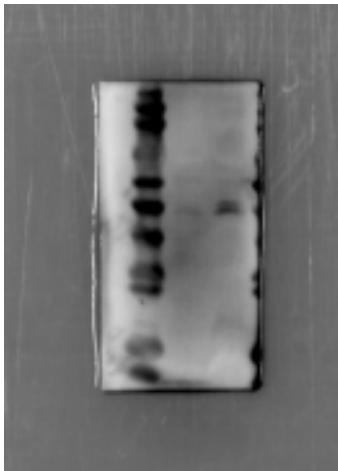
如果印迹膜上的所有条带, 包括 Marker, 都很难看到, 可能是实验流程问题, 而不是检测蛋白的问题。



可能的原因	解决方案
大分子蛋白 可能转膜不完全或低效	(1)转膜后, 使用可逆染料, 例如丽春红S染色液, 检测转膜是否成功。如果蛋白未有效转移, 检查转膜方向是否正确(见示意图)。 (2)若转膜方向正确, 增加转膜时间。 若选择的是 PVDF膜, 需先浸入甲醇或乙醇中激活, 然后再浸入到转膜缓冲液中。
小分子蛋白 可能转膜时间过长	(1)低分子量蛋白质可能穿过印迹膜了, 缩短转膜时间。 (2)更换成小孔径的印迹膜 (如从 0.45 μm 换为 0.22 μm)。
化学发光底物的信号太弱	(1)增加印迹膜与底物的孵育时间。 (2)尝试延长曝光时间, 然后再次成像。 (3)更换超敏型 ECL 发光液。
存储和处理不当 可能会导致试剂失去活性	查看实物说明书上的产品存储说明。 避免反复冻融。

情况B：目的蛋白条带弱或没有信号

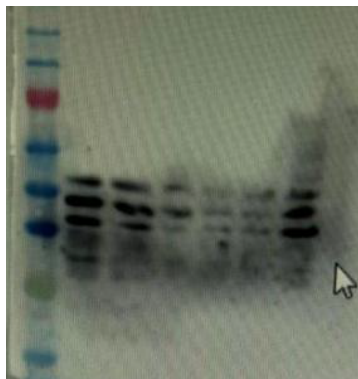
如果只有目的蛋白条带弱, 而 Marker 条带不受影响, 可能是目的蛋白的检测存在问题。



可能的原因	解决方案
一抗浓度过低	(1)提高一抗浓度。 (2)延长孵育时间 (例如, 4 °C 过夜孵育)。
目的蛋白不存在	查阅科学文献, 看看所用样本中是否存在目的蛋白。
目的蛋白上样量不够	(1)确保每个泳道至少上样 10-20 μg 蛋白, 目的蛋白条带弱时可适当增加上样量。 (2)增加富集步骤将信号最大化 (例如, 就细胞核蛋白而言, 使用细胞核裂解液, 并提高抗体浓度、使用高灵敏度 ECL 底物)。
一抗和二抗不匹配	(1)确保二抗种属与一抗宿主匹配。 (2)确保一抗和二抗的同种型匹配。
抗体反复使用, 效性降低	更换新鲜配制的一抗和二抗, 因为每次使用后, 有效抗体的浓度都会降低。

问题四：出现多条带

多泳道出现非特异性条带，主带外有杂带。常见于蛋白降解、多聚体、翻译后修饰、蛋白剪切、抗体非特异。



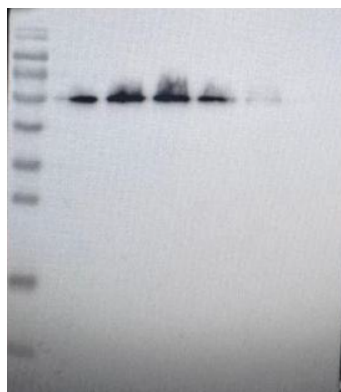
可能的原因	解决方案
蛋白质降解	如果在低分子量处看到多个条带，很可能就是这个原因引起的。添加新鲜的蛋白酶抑制剂，防止蛋白质降解。
蛋白质形成多聚体	如果在高分子量（预期条带分子量的2倍或3倍）处看到额外条带（一些蛋白质会因二硫键的形成而形成二聚体、三聚体或更大的多聚体），可能就是这个原因引起的。
修饰，如重度糖基化	如果是在高分子量处看到多个条带，可能就是这个原因引起的。
蛋白质可能被切割	查看文献，了解切割位点的位置以及包含抗体免疫原序列的片段。
条带为非特异性条带	更换特异性高的抗体。

问题五：条带形状异常

情况A：条带弥散拖尾

条带上方出现明显拖尾。

常见于上样过大、变性不充分、样本粘度大、电压过高、胶浓度不合适。

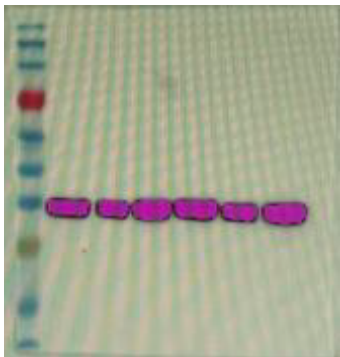


可能的原因	解决方案
上样量过大	将蛋白上样量降低（如从 40 μ g 降至 20 μ g），或进行上样量梯度测试。
样本制备时蛋白未充分变性/还原	(1) 确保 95–100 $^{\circ}$ C 煮沸 5–10 min，充分变性。 (2) 添加足量还原剂（ β -巯基乙醇或 DTT）。
样本粘度大	超声破碎或增加吹打次数降低样本粘度。
电泳条件不当（电压过高/产热）	降低电压，使用预冷缓冲液，或在低温环境电泳。
凝胶浓度不合适	根据目标蛋白分子量选择合适浓度： • 小分子蛋白 (<30 kDa) : 12–15% 胶； • 中分子蛋白 (30–100 kDa) : 10% 胶； • 大分子蛋白 (>100 kDa) : 6%–8% 胶。
样本中盐离子浓度过高	若裂解液盐浓度高，用 PBS 稀释样本，或更换低盐裂解液。

问题五：条带形状异常

情况B:条带返白

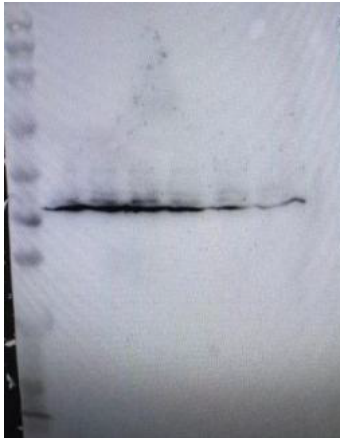
条带中心发白边缘发黑,呈"空心"状。
常见于抗体浓度过高→底物快速消耗;底物过于灵敏;上样量过大;曝光时间过长。



可能的原因	解决方案
一抗和二抗的浓度可能过高	如果抗体浓度过高,底物会很快被消耗。这意味着此时吸收的光非常少,导致在对印迹膜进行成像时出现白色条带。此时需考虑降低抗体浓度。
底物敏感度过高	化学发光底物过于灵敏,信号超出检测线性范围。可更换为温和型/低敏型 ECL 底物 (如超敏 ECL 换为普通 ECL)。
上样量过大	目标蛋白过量,底物被瞬间耗尽。减少蛋白上样量。
曝光时间过长	成像时信号过饱和,大幅缩短曝光时间,或进行多时间点梯度曝光。

情况C:条带相连,“手拉手”

条带呈连续横向线状。
常见于凝胶凝固不均、上样量过大、缓冲液陈旧、凝胶中间过热。



可能的原因	解决方案
凝胶配制/凝固问题	(1)确保分离胶充分凝固(建议凝固 20min以上)。 (2)APS和 TEMED 用量适当,保证均匀聚合。
上样量过大	减少上样量,避免条带过宽加重横向拖尾。
缓冲液陈旧/液面过低	(1)更换新鲜缓冲液,避免反复多次使用。 (2)确保缓冲液液面高度,内槽装满新鲜电泳液,外槽液面也要达到标线。
凝胶中间过热	(1)降低电泳电压,将恒压降至 80-100 V(全程)或前段 80 V 待进入分离胶后再调至 120 V。 (2)使用预冷的电泳缓冲液,或在低温环境电泳。

问题五：条带形状异常



情况D：条带过载

条带过宽, 边缘模糊, 可能溢出到相邻孔。
常见于上样量过大; 一抗浓度过高。

可能的原因	解决方案
上样量过大	减少上样量, 可进行上样量梯度预实验 (如 5、10、20 μg 对比)。
一抗浓度可能过高	降低一抗浓度。

情况E：条带多种问题并存

条带弥散/拖尾; 出现非特异性条带。
常见于凝胶凝固、转膜时间过长或电流过大等问题。



条带问题	可能的原因	解决方案
条带弥散/拖尾	(1) 凝胶配制/凝固问题 (2) 上样量过大 (3) 样本盐浓度过高 (4) 样本粘度大 (5) 转膜时间过长或电流过大 (尤其湿转时小分子蛋白容易扩散)	(1) 确保分离胶充分凝固 (建议凝固 20 min 以上)。APS 和 TEMED 用量适当, 保证均匀聚合。 (2) 减少上样量。 (3) 若裂解液盐浓度高, 用 PBS 稀释样本, 或更换低盐裂解液。 (4) 超声破碎降低粘度。 (5) 根据蛋白大小调整转膜条件, 避免所有蛋白都采用同一固定条件。
非特异条带	一抗特异性不足	更换抗体或尝试降低一抗浓度
背景较高	(1) 封闭不充分 (2) 一抗/二抗浓度过高 (3) 洗膜不充分	(1) 延长封闭时间。 (2) 降低抗体浓度。 (3) 增加洗膜次数或时间。

WB技术答疑

1. 样本常见问题

Q1: 核蛋白、膜蛋白如何提取?

A1: 核蛋白和膜蛋白, 这类蛋白的内源性表达量大部分较低, 需通过专门的提取方式或提取试剂盒进行富集, 然后裂解得到待测样本。

Q2: 细胞水平做 Western blot, 多少细胞提的蛋白够 Western blot?

A2: 一般 6 孔板单孔: 5×10^5 - 1×10^6 细胞就可以。

Q3: 如果需要加大上样量使原来弱的条带能看清楚, 但同时要避免上样量超载, 如何处理?

A3: 浓缩样品; 选用 1.5 mm 厚胶、大孔径梳子; 常规超载 30% 以内影响较小。

Q4: 蛋白变性后可以存放多久?

A4: -80 °C 条件下可保存一两年; 核心两点: 避免蛋白酶降解、避免微生物污染。

Q5: 一般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?

A5: 常规上样 10-20 μg ; 上样量、蛋白丰度、抗体稀释度、曝光时长都会影响最终条带强弱。摸索条件时可适当增加上样量, 但背景可能会同步升高。

2. 凝胶常见问题

Q1: 想分离的蛋白是分子量 260 kDa 的, SDS-PAGE 电泳的分离胶浓度多大合适? 浓缩胶的浓度又该用多少? 这么大分子量的蛋白容易做 Western blot 吗?

A1: 260kDa 超大蛋白, 分离胶选用 6%, 浓缩胶 3.5%, 剥胶操作轻柔避免胶断裂; 大分子蛋白转膜难度更高, 需延长转膜时间。

Q2: 我所测定的蛋白分子量是 105 kDa, 按理说分离胶应当采用 7.5%, 但我所查资料却要求分离胶采用 10% 的配方, 不知为何?

A2: 两种胶体系均可使用, 105 kDa 蛋白在两种胶的线性分离区间内, 仅条带迁移位置有差异。

Q3: 小分子蛋白质分离效果差是什么原因?

A3: 可能原因是标准 Tris-Glycine 凝胶对小分子蛋白质分辨率有限。改用 Tris-Tricine 凝胶, 该凝胶尤其适用于约 10 kDa 以下的蛋白质。

Q4: 为什么电泳的条带很粗?

A4: 电泳中条带很粗是常见的事, 主要是未浓缩好的原因。可考虑适当增加浓缩胶的长度; 保证浓缩胶贮液的 pH 正确; 适当降低电泳时的电压。

3. 抗体常见问题

Q1:Marker被测出阳性?

A1:由于多克隆抗体识别的抗原表位比较多,预染 Marker的本质也是多种分子量不同的融合蛋白,多克隆抗体可能会识别这些蛋白,从而在显影时出现信号。

Q2:这么多内参抗体,是选择常用的 GAPDH/β-actin就可以吗?

A2:选择内参抗体时,需要遵循以下核心法则:

- (1) 稳定表达:内参蛋白在不同样本中应相对恒定,不能因实验处理(如缺氧、药物 刺激)而表达波动。
- (2) 分子量差异:内参蛋白的分子量应与目的蛋白有明显差异(建议至少相差5 kDa),以免条带重叠。
- (3) 细胞定位:应与目的蛋白的亚细胞定位一致。例如,检测细胞核蛋白时,不建议使用细胞质蛋白作为内参。(更多详细内容可参考 EnkiLife内参选择指南)

常用内参抗体速查表:

内参蛋白	分子量	定位	适用场景	注意事项
β-Actin	~42 kDa	细胞质/细胞骨架	最通用的全细胞内参,非肌肉组织首选	脂肪组织、肌肉组织避免使用;细胞骨架相关实验避免使用
GAPDH	~36 kDa	细胞质(糖酵解酶)	常规细胞/组织样本	缺氧、糖尿病、代谢应激实验避免使用
β-Tubulin	~55 kDa	细胞质(微管)	细胞骨架研究、应激条件下较稳定	抗有丝分裂药物处理、细胞周期研究避免使用
α-Tubulin	~55 kDa	细胞质	与β-Tubulin类似,可互为替代	抗有丝分裂药物处理、细胞周期研究避免使用
Vinculin	~117 kDa	黏着斑/细胞质	大分子量目的蛋白、细胞黏附/迁移研究	/
Histone H3	~17 kDa	细胞核/染色质	核蛋白、染色质相关蛋白检测	/
Lamin B1	~66-70 kDa	核膜	核膜蛋白、核质分离样本	核膜去除的样本不适用
VDAC1	~30-35 kDa	线粒体	线粒体外膜蛋白检测	主要适用于线粒体组分
COX IV	~17 kDa	线粒体	线粒体内膜蛋白检测	主要适用于线粒体组分
Na ⁺ /K ⁻ ATPase	~110 kDa	细胞膜	膜蛋白检测	多用于膜组分
Hsp70/90	~70/90 kDa	细胞质	在非应激条件下相对稳定	热休克/应激实验表达可能上调可能表达上调

Q3:如何选择合适的二抗?

A3:1. 抗体考虑:

- (1) 确定一抗的宿主物种(eg. 小鼠抗微管蛋白、兔抗 CD4);大多数一抗是在小鼠或兔的体内制备的。

(2) 选择适当的二抗宿主物种和反应种属 [eg. 山羊抗小鼠 IgG(H+L)、驴抗兔 IgG(H+L)]; 种属来源(宿主)是指制备这种二抗的物种, 反应种属是指针对的一抗物种。

Tip 1: 所用二抗的种属来源必须不同于抗的种属来源和反应种属。

Tip 2: 当描述抗鼠抗体时, 尽可能使用具体的物种, 即抗大鼠二抗、抗小鼠二抗、抗仓鼠二抗等。

Tip 3: 反应种属除了需要关注一抗的来源, 有时也需要关注所使用的样本来源。

(3) 考虑二抗的特异性反应, 即目标免疫球蛋白(Ig)的类型和亚型。

如抗小鼠 IgG(H+L), 指二抗可以和所有的小鼠 IgG 结合(因某些物种的 IgG 的同源关系较近, 通常也会和其他物种的 IgG 有一定程度的交叉反应);

抗小鼠 IgG1, 此二抗的特异性相对更高一些(只和小鼠 IgG 的亚型 IgG1 结合);

抗小鼠 IgG F(ab')₂, 此二抗只和小鼠 IgG 抗体的 F(ab')₂ 片段结合。

(4) 考虑交叉吸附, 例如某些羊抗小鼠 IgG 二抗可能会和兔源一抗存在一定程度的结合, 对二抗进行交叉吸附纯化可以较好的去除来源于非目标抗体和蛋白的交叉反应性, 从而提高抗体的特异性。

2. 标记物考虑:

在根据所要进行的实验应用以及如何检测二抗(和检测仪器设备、检测体系相关)选择标记物。(更多详细内容可参考 EnkiLife 二抗选择指南)

Q4: Western blot 中抗体的重复应用问题。

A4: 稀释后的抗体工作液不建议长期反复使用; 珍贵抗体可回收重复使用 2-3 次, 4 °C 避光保存, 尽量在一周内用完, 禁止反复冻融。

4. 条带异常问题

Q1: 为什么有时目的条带大小同理论预期分子量有偏差?

A1: 当条带所示的实际大小同理论有偏差时, 可能由以下一些原因导致: 蛋白发生如磷酸化、糖基化等翻译后修饰时条带会上移, 蛋白发生剪切(如前体)时条带会下移, 蛋白存在不同的可变剪切体或亚型, 强相互作用大分子存在时变性不彻底。此外, 不同品牌的预染蛋白 marker 可能存在指示偏差, 也可能导致表观分子量与理论预期出现偏差。

Q2: 为什么主带之外有时会出现杂带?

A2: 导致杂带出现的可能原因包括: 抗体特异性不足, 目的蛋白存在不同修饰状态或有剪切降解形式, 一抗或二抗浓度过高, 蛋白上样量过大, 曝光时间过长, 膜漂洗不充分等原因。

Q3: 为什么有时候条带会出现拖带或者弯曲?

A3: 在使用特定裂解缓冲液时, 或者一些植物或脂肪含量高的样品中成分较复杂, 会对电泳条带产生干扰; 样品变性不彻底、有降解发生、修饰、上样过大等情况会导致拖带; 凝胶不均匀、电泳装置渗漏、电压/电流过大、胶孔不平等原因会导致条带弯曲; 当很小分子量的蛋白电泳到接近凝胶下沿时也会出现条带扭曲。(常见异常条带分析参考本文第四部分内容)

参考文献

[1] Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Towbin H, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 1979. [PMID: 388439]

[2] Western blotting: a powerful staple in scientific and biomedical research. Begum H, et al. Biotechniques. 2022. [PMID: 35775367]

[3] Western blotting (immunoblotting): history, theory, uses, protocol and problems. Biotechniques. Sule R, et al. 2023. [PMID: 36971113]

[4] The necessity of and strategies for improving confidence in the accuracy of western blots. Ghosh R, et al. Expert Rev Proteomics. 2014. [PMID: 25059473]

[5] High-efficiency blotting of proteins of diverse sizes following sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Bolt MW, et al. Anal Biochem. 1997. [PMID: 9177676]

[6] Protein purification and analysis: next generation Western blotting techniques. Mishra M, et al. Expert Rev Proteomics. 2017. [PMID: 28974114]

[7] Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Schägger H, et al. Anal Biochem. 1987. [PMID: 2449095]

[8] Western blot: technique, theory, and trouble shooting. Mahmood T, et al. N Am J Med Sci. 2012. [PMID: 23050259]

EnkiLife (恩玑生命) Western blot产品推荐

EnkiLife (恩玑生命) 专注生命科学试剂研发, 提供高效的 Western blot整体解决方案。从样本制备到显影出结果, 全线产品完成从安全性到高效性的全面深度优化。核心产品 2h极速WB即用型全流程试剂盒, 更将传统1-2天的实验压缩至2小时, 开箱即用型设计给科研工作者带来了极大的便利性, 加速科研产出。

货号	产品名称
RA10020	2h极速WB即用型全流程试剂盒
RC0160	RIPA裂解液(强)
RC0161	RIPA裂解液(中)
RC0162	RIPA裂解液(弱)
RC0005	大分子蛋白专用细胞/组织裂解液
BC00006	蛋白浓度测定试剂盒(BCA法)
RA10055	5×上样缓冲液
RA10066	蛋白酶抑制剂混合液(100×, 不含 EDTA)

货号	产品名称
RA10067	磷酸酶抑制剂II cocktail
RA10063	蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合液(100x,不含 EDTA)
G0142012	Bis-Tris, 4-20%, 12wells
G0142015	Bis-Tris, 4-20%, 15wells
RA10043	即凝广谱梯度制胶试剂盒
RA10037	校准级彩色预染蛋白Marker(8-180kDa)
RA10038	校准级彩色预染蛋白Marker(10-250kDa)
RA10039	校准级高分子彩色预染蛋白Marker(25-400kDa)
RA10070	Pre-stained Protein Ladder(10-180kDa)
RA10071	Pre-stained Protein Ladder(10-250kDa)
RA10025	MOPS电泳缓冲液颗粒
RA10044	20×通用型快速电泳液
RA10051	20×免冰浴快速转膜液
RA10027	免滤纸转膜海绵(8×9.6cm)
RA02202R	PVDF(0.22 μ m,28×400cm)
RA02202P	PVDF(0.22 μ m,6×9cm)
RA04502R	PVDF(0.45 μ m,28×400cm)
RA04502P	PVDF(0.45 μ m,6×9cm)
RA10052	5×无蛋白快速封闭稀释液
RA10058	5min无蛋白快速封闭液
RA10059	1min无蛋白快速封闭液
RA10056	免封闭快速抗体稀释液
RA10001	超敏ECL化学发光液
RA10041	抗体剥离液
RA10061	10×TBST
RA10057	考马斯亮蓝快速染色液(免脱色)
RA20108	丽春红S染色液(1×Ponceau S)

Thank you
for choosing
us!