

Western Blotting 一册通



目录

01/	样品制备	03
02/	上样电泳	08
03/	转印	14
04/	封闭	20
05/	抗体孵育	22
06/	检测	25
07/	常见问题排除指南	29
08/	附录	33

前言：WB简介

“

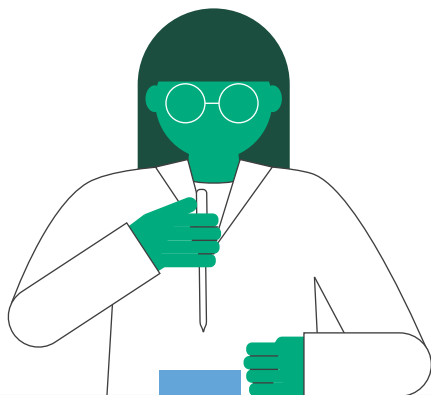
蛋白质印迹法是一种检测和分析蛋白质的成熟方法。自1979年首次提出以来，它已成为生命科学研究中应用最广泛的方法之一。该方法通过将不同分子量的蛋白质经过聚丙烯酰胺凝胶电泳分离开后，转移到固相支持物（如 PVDF 膜、NC 膜）上，利用抗原抗体的特异性结合检测复杂样品中的特定蛋白。整个实验过程中，从样品制备到抗体孵育，每个步骤对实验结果都至关重要。

本手册分享了最新的专业知识和前沿技术，内容涵盖从样品制备到分析的全流程。您可以参考本手册作为指导，或用它来优化实验成果。

”

第一章

样本制备



1.1 悬浮细胞制备蛋白

- 1 用 **3000 × g** 的离心力将细胞离心 5 分钟。取出并弃去上清液。
- 2 用 **5 至 10 mL 预冷 PBS 清洗细胞一次**。再次通过离心沉淀细胞。弃去 PBS 清洗液。
- 3 加入蛋白提取缓冲液。每 10 mL 悬浮培养液中加入 1 mL 哺乳动物蛋白质提取缓冲液。
注：若要获得更浓缩的细胞提取物，可减少加入细胞团中的哺乳动物蛋白质提取缓冲液的量。在这种情况下，进行一个冷冻和解冻周期可确保细胞完全裂解。
- 4 重新吹散细胞，直到得到均匀的悬浮液。将裂解液在**冰上孵育 15 至 30 分钟**。定期摇动或短暂涡旋悬浮液。
- 5 在冷藏离心机中以 **20000 × g 的速度离心 30 分钟**。收集裂解液，用于下游处理和分析。

1.2 贴壁细胞制备蛋白

1 去除贴壁细胞上的培养填料。

2 用 PBS 清洗细胞一次。去除 PBS 清洗液。

加入适量的哺乳动物蛋白质提取缓冲液以覆盖培养表面积（具体用量可参考表 1.1）。或者，也可以从表面刮取细胞，在后续步骤中作为悬浮细胞处理。

表 1.1

缓冲液体积/孔（ μL ）	培养板类型
50 至 100	96 孔板
100 至 200	24 孔板
200 至 400	6 孔板
250 至 500	直径 60 mm 的培养板
500 至 1000	直径 100 mm 的培养板

3

4 **轻轻摇晃培养板 10 分钟。**用硅胶刮刀或用裂解液轻轻将细胞从培养板上剥离。

注：若要获得更浓缩的细胞裂解液，可减少加入培养板中的哺乳动物蛋白质提取缓冲液的量。对培养板或培养孔进行一次冷冻和解冻循环。

5 裂解液（包括细胞碎片）可直接从培养孔/培养板中使用。或者，将裂解液转移到试管中，**以 $20000 \times g$ 的速度离心 30 分钟**。收集澄清的裂解液用于分析。

1.3 动物组织

1 准备好所需数量的离心管，并在每个管中放入研磨珠，将它们置于冰盒上备用。

2 从 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱取出所需的动物组织，将其**置于冰上解冻**。在此过程中，准备 EP 管，并依次进行称量每个管中组织的重量。

- 3 **对组织块进行预冷 PBS 洗涤 2 - 3 次**，以除去血污，然后将其放在滤纸上，吸除多余的 PBS 后放入对应的匀浆管中。
- 4 加入 **大约 10 倍样本体积的 RIPA 裂解液**（按需加蛋白酶和磷酸酶抑制剂）。将管置于组织研磨仪中，对称放置后盖上盖子，选择程序开始匀浆。
- 5 匀浆完成后，将匀浆管**置于冰上静置 30 分钟**，以充分裂解组织（或使用超声波处理 10 分钟）。
- 6 使用离心机在 12000 rpm、4 °C 下离心 10 分钟后取上清。

1.4 植物细胞

- 1 取 10 - 250 mg 植物组织，在液氮中将组织研磨成粉末后放入 EP 管中。
- 2 加入 1.5 mL 准备好的甲醇溶液，**-20 °C 孵育 5 min**，孵育的过程涡旋混匀一到两次，以免组织沉淀。
- 3 将悬浮液在 4 °C 下 16000 g，离心 5 min 后弃去上清。重复上述清洗步骤 2 次。
- 4 **加 1.5 mL 的 -20 °C 预冷的丙酮，迅速涡匀样品（15 - 30 s）**，然后置于 -20 °C 孵育 5 min。
- 5 将悬浮液在 **4 °C 下 16000 g 离心 5min** 以沉淀蛋白质和植物组织碎片后弃除上清，注意不要打乱沉淀。
- 6 室温下将颗粒风干（5 - 10 min），以除去残留的丙酮。
- 7 加入裂解液（2.7 g 尿素 0.2 g CHAPS 溶于 3 mL 灭菌的去离子水中（终体积为 5 mL），使用前再加入 1 M 的 DTT 65 μ L/mL），通过涡旋充分混匀组织沉淀，室温孵育 30 min。

- 8 **16000 g 4 °C 离心 30 min** 以沉淀植物组织碎片，提取上清液。制备好样品可以分装保存于 -80 °C 中。

1.5 细菌

- 1 自配裂解液（pH 8.5 - 9.0）：50 mM Tris-HCl，2 mM EDTA，100 mM NaCl，0.5 % Triton X-100，调 pH 值至 8.5 - 9.0 备用；用前加入 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶菌酶，1 $\mu\text{l}/\text{mL}$ 的蛋白酶抑制剂 PMSF。该裂解液用量为 10 - 50 mL 裂解液 / 1 g 湿菌体。
- 2 将 40 mL 菌液在 **12000 g，4 °C 下离心 15 分钟收集菌体**，沉淀用 PBS 悬浮洗涤 2 遍，沉淀加入 1 mL 裂解液悬浮菌体。
- 3 **超声粉碎，采用 300 w，10 s 超声 / 10 s 间隔，超声 20 min**，反复冻融超声 3 次至菌液变清或者变色。随后，1000 g 离心去掉大碎片，留上清保存。



1.6 推荐产品

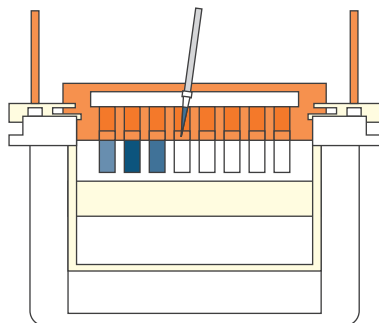
脱盐柱 //		
17-0851-01	PD 10 脱盐层析柱	30 个 / 包
28-9180-04	PD SpinTrap G-25 微量样品脱盐柱	50 个 / 包
28-9180-06	PD MultiTrap G-25 96 孔板式脱盐柱	4*96 孔板
29-0486-84	HiTrap™ Desalting	1 x 5 mL

超滤离心管 //		
OD003C33	Nanosep 1.5 mL 超滤离心管 OMEGA 3k	24 个 / 包
OD010C33	Nanosep 1.5 mL 超滤离心管 OMEGA 10k	25 个 / 包
OD030C33	Nanosep 1.5 mL 超滤离心管 OMEGA 30k 24pk	24 个 / 包
MCP001C41	Microsep 15 mL 超滤离心管 ADV OMEGA 1k	24 个 / 包
MCP003C41	Microsep 15 mL 超滤离心管 ADV OMEGA 3k 24pk	24 个 / 包
MCP010C41	Microsep 15 mL 超滤离心管 ADV OMEGA 10k 24pk	24 个 / 包
MAP001C36	Macrosep 50 mL 超滤离心管 ADV OMEGA 1K 6pk	6 个 / 包
MAP003C36	Macrosep 50 mL 超滤离心管 ADV OMEGA 3K 6pk	6 个 / 包
MAP010C36	Macrosep 50 mL 超滤离心管 ADV Omega 10k 6pk	6 个 / 包

“超低蛋白吸附” 过滤器和滤膜 +		
10-4631-02	SPARTAN HPLC 针式滤器, 13 mm, 再生纤维素, 0.2 μm	500 个 / 包
10-4630-30	SPARTAN HPLC 针式滤器, 13 mm, 再生纤维素, 0.45 μm, 带 mini-tip 出口	100 个 / 包
10-4103-12	再生纤维素膜 (RC58), 孔径 0.2 μm, 47 mm, 圆形	100 片 / 包
10-4102-12	再生纤维素膜 (RC55), 孔径 0.45 μm, 47 mm, 圆形	100 片 / 包

第二章

上样电泳



2.1 蛋白浓度测定

BCA法

1 BSA 最好用与样本相同的溶液进行稀释。稀释好的BSA配成不同浓度的标准品，建议**设置 5 组以上浓度梯度的标准品**，可参考以下浓度梯度进行设置：20,125,250,500,750,1000,1500 $\mu\text{g/mL}$ ，然后每孔加 20 μL ，做两组重复，待测。建议每种浓度做 2~3 个复孔。

2 根据样品数量，按照 BCA 相关试剂盒中的说明将 A 液和 B 液混合配制成工作液。

3 将待测样品用PBS稀释到 20 μL ，加入 96 孔板中。随后向每孔中加入 180 μL 工作液，**37 °C 孵育 30 min**。

4 使用酶标仪测量 **562 nm** 的吸光度，绘制标曲并计算蛋白浓度。

考马斯亮蓝法

1 将 100 mg 考马斯亮蓝 G-250 溶于 50 mL 95 % 乙醇，加入 100 mL 浓磷酸，然后用蒸馏水补充至 200 mL。

2

尽量使用与待测样本性质相近的蛋白质作为标准品，例如测定抗体，可用纯化的抗体作为标准。如果待测样本是未知的，也可用抗体作为标准蛋白。**通常在 20 μg – 150 μg / 100 μl 之间绘制标准曲线。**

3

按 1 : 5 用蒸馏水稀释浓染料结合溶液，过滤除去沉淀；每个样本**取适当的体积加 5 mL 稀释的染料结合溶液，作用 5 ~ 30 min**。染液与蛋白质结合后，将由红色变为蓝色，在 595 nm 波长下测定其吸光度。注意，显色反应不得超过 30 min。

4

绘制标曲并计算蛋白浓度。

2.2 样品处理

在给凝胶上样前，将蛋白按照每孔上样体积 20 - 50 μg 分装好，为每个样品加入等体积的 2X loading buffer（附录表 8.1）。

上样缓冲液可增加样品的密度以方便上样，赋予蛋白质适当的特性以达到最佳分离效果，同时**缓冲液中的颜色成分可以在实验进行时作为一个可见的前沿**。

为了将样品加入上样缓冲液的稀释效果降至最低，可以使用 5X loading buffer 来分析低丰度的目标蛋白。

具体步骤如下：

1

在微管中加入 1 体积的 2X 上样缓冲液。

2

加入 1 体积的蛋白质样品，其中含有所需数量的蛋白质。

3

将微管在 **95 $^{\circ}\text{C}$ 下加热 5 分钟**。

4

将样品放入离心机中离心。

注意：如果不立即使用样品，可将其存放在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。样品在冰箱中保存后，需要在上样前加热，以溶解沉淀的 SDS。

2.3 分离胶配制

凝胶由分离胶和浓缩胶组成：上层为浓缩胶，凝胶孔径较大，没有分子筛效。下层为分离胶，凝胶孔径较小，有分子筛效应，泳动速度主要决定于分子量。制备顺序为**先灌制分离胶，然后在分离胶上灌制浓缩胶**。

配制方法如下：

- 1 在烧瓶中，混合分离凝胶溶液（配方详见附录 8.2），省略 APS 和 TEMED。
- 2 加入 TEMED 和 APS，轻轻旋转烧瓶进行混合，**注意不要产生气泡**。
- 3 用移液管将溶液移入玻璃板中，**移至距顶部约 4 cm 处**。
- 4 在顶层轻轻**加入约 0.6 mL 水饱和的正丁醇或异丙醇（或水）**，使整个分离凝胶表面都被正丁醇覆盖。
- 5 在 50 mL 离心管中混合试剂（配方详见附录 8.3），制备浓缩凝胶。
- 6 **加入 50 μ L 10 % APS 和 10 μ L TEMED**。轻轻搅拌均匀。
- 7 分离凝胶聚合后，倾斜浇铸台，倒掉正丁醇覆盖层。
- 8 用移液管吸取垫片之间的浓缩凝胶溶液。
- 9 小心地将电泳梳放入未聚合的凝胶中，**注意不要夹带气泡**。让凝胶聚合约 1 小时。

注意：

1、微量正丁醇会影响浓缩凝胶的聚合。确保在加入浓缩凝胶前倒出所有正丁醇。可以通过用水冲洗分离凝胶表面来实现。

2、凝胶可以用保险膜紧紧包裹，**放在 4 °C 的密封袋中，与电泳梳一起保存 1 周**。

2.4 蛋白标准品

蛋白标准品（Marker）位于样品蛋白旁的分子量标准物质，**有助于估计分离后目的蛋白大小**。目前 Cytiva 提供多种分子量范围的蛋白标准品。（图 2.1）

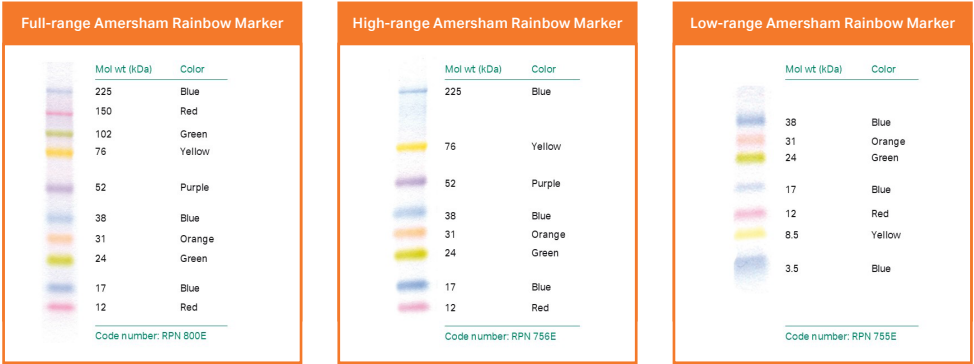


图 2.1 Amersham 彩虹 Marker

除了普通类型的彩虹 Marker 以外，Cytiva 也提供荧光 Marker 和可以用于胶片的 Marker。

2.5 上样

向凝胶孔内**加入足量的样品和分子量大小标记物**，每孔 20 - 50 ug 总蛋白或 100 ng 纯蛋白。

注意：

- 1、尽量保持每个泳道的蛋白量一样，体积尽量一致；
- 2、空置的泳道用等体积的 1X loading buffer 补齐。

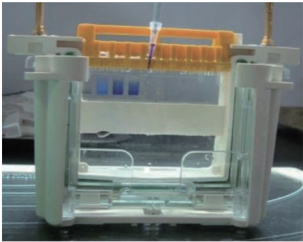
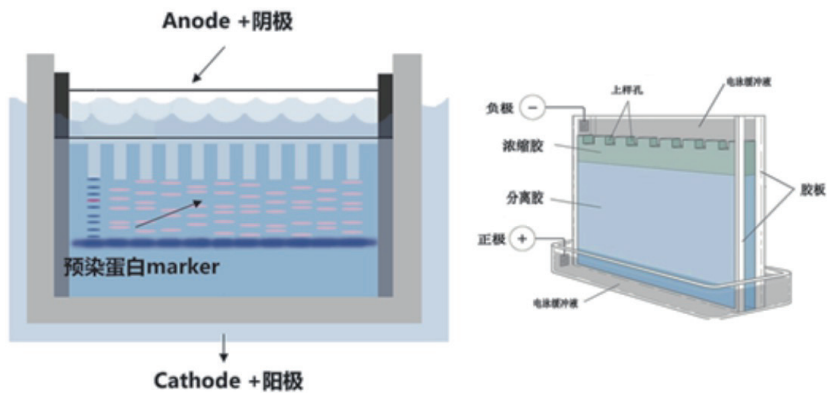


图 2.2 上样示意图

2.6 电泳

大多数蛋白质印迹应用都是在**通过 SDS-PAGE 分离蛋白质**后进行的。因此，本文介绍了基于 Tris-甘氨酸的常用 LaemmLi 缓冲液配方（配方详见附录）。

再加入电泳缓冲液后即可连接电源进行电泳。电泳时上层胶使用低电压恒压电泳，打开电源将电压调到 80 V（一般 15 min 左右），而在溴酚蓝进入下层胶时使用高压恒压电泳，将电压调到 120 V 至溴酚蓝到达胶的底端处附近即可停止电泳。



通过观察染料（溴酚蓝/酚红）在凝胶中的运动监控整个过程。染料在混合物中的迁移速度最快，能够提供
一个迁移前沿来监测分离的过程。

图 2.3 电泳示意图

2.7 总蛋白染色

- 1 将加热块的温度设置为 95 ℃。
- 2 加入 2 至 19 μL 细胞裂解液或组织提取物样品，用样品裂解缓冲液将体积加至 19 μL。对于纯化的蛋白质，用标记缓冲液按 1：10 比例稀释。
- 3 加入 1 μL 用超纯水按 1：10 稀释的 Cy™5 染料试剂。
注意：稀释染料必须为新鲜配制并在 30 分钟内使用！
- 4 短暂涡旋充分混合。在室温下孵育 30 分钟。
- 5 加入 20 μL 含有新鲜制备的 DTT（最终浓度为 40 mM）的 2X 上样缓冲液。

6

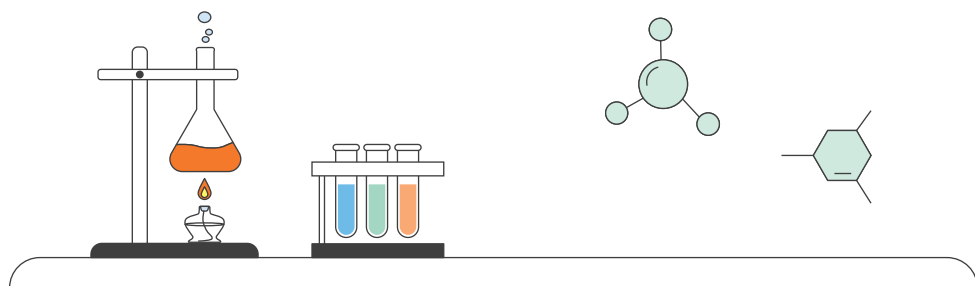
在 95 °C 下加热该样品 3 分钟。

7

离心样品，随后正常电泳。

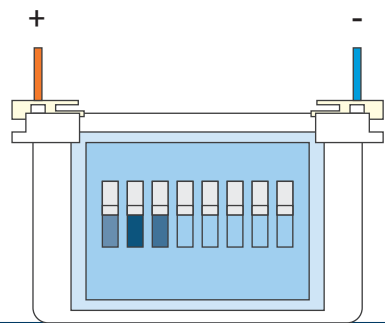
2.8 推荐产品

货号	产品名称	分子量范围	规格
RPN755E	低分子量范围彩虹 Marker	3500–38000	250 µL
RPN756E	高分子量范围彩虹 Marker	12000–225000	250 µL
RPN800E	全分子量范围彩虹 Marker	12000–225000	250 µL
RPN810	ECL™ DualVue 免疫印迹标准 Marker	15000–150000	25 次
RPN850E	ECL Plex™ FL 荧光彩虹蛋白分子量标准 Marker	12000–225000	120 µL
RPN851E	ECL Plex™ FL 荧光彩虹蛋白分子量标准 Marker	12000–225000	500 µL
RPN4000	Amersham™ Quickstain™ 总蛋白标记试剂盒		



第三章

转印



3.1 转印膜选择

一般来说，膜是多孔材料，孔径从 0.1 到 0.45 μm 不等。膜的结合能力主要取决于孔径大小。**具有许多小孔的膜比大孔径膜具有更大的结合面**，因此通常具有更高的结合能力。

生物分子与膜相互作用的确切机制尚不清楚，但推测是非共价和疏水作用力的共同作用。

需要注意的是，虽然蛋白质构象和缓冲液成分也会影响结合能力，但**蛋白质印迹的总体灵敏度取决于固定在膜上并能被一抗识别的蛋白质量**。但要注意的是，过多的蛋白质结合并不一定会改善免疫印迹的信号，甚至可能会产生相反的效果。

硝酸纤维素膜和 PVDF 膜是蛋白质印迹法最常用的膜，有时也会用到尼龙膜。

一般在实验中，选膜的主要影响因素是蛋白分子量的大小，根据不同大小的目标蛋白，可以分为不同种类，如表 3.1 所示。

表 3.1 膜材孔径与蛋白分子量之间关系

分子量	膜的孔径
$\leq 10\text{ kd}$	0.1 μm
$\leq 20\text{ kd}$	0.2 μm
$\geq 20\text{ kd}$	0.45 μm

Cytiva 针对不同应用可以提供不同类型的转印膜，具体可以查看图 3.1。

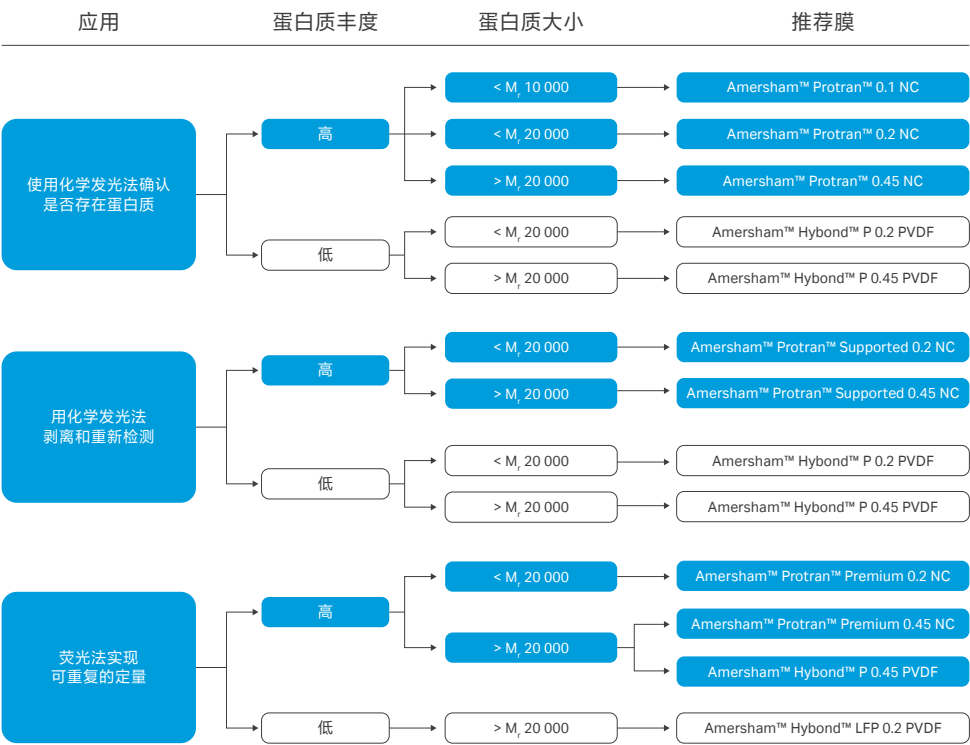


图 3.1 Amersham膜材选择指南

3.2 转印

常用的转膜方法有半干转和湿转两种方法。

半干转转膜时间较短，小分子量蛋白半干转效果较好，因为体系中缓冲液较少，故不适用于大分子量蛋白。

湿转的转膜时间相对较长，但是转膜完全，大分子量蛋白建议用湿转。

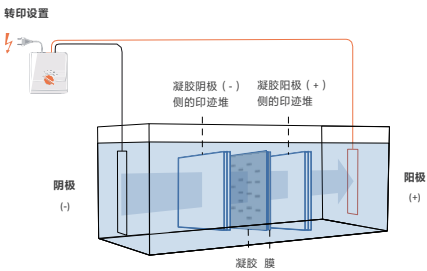


图 3.2

图 3.2 将凝胶上的蛋白质转印到膜上。将凝胶与膜接触，蛋白质就会在电场中向带正电的阳极(+)迁移。

3.2.1 全湿转印

在这种转印方式中，凝胶和膜都完全浸没在转印缓冲液（**Tris-甘氨酸转印液**：25 mM Tris base，192 mM 甘氨酸，20%（V/V）甲醇，pH 8.3）中，电流从凝胶方向流向膜。一般来说，全湿转印需要冷却装置，并通过搅拌磁铁实现转印缓冲液的内部再循环或将转印装置置于 4℃ 的环境中（如冷藏室）进行全湿转印。

当需要获得最高质量的印迹时，应优先选择全湿转印，而不是半干法，因为前者能获得更为清晰的条带且转印效率更高。湿转装置的组装示意图 3.3。

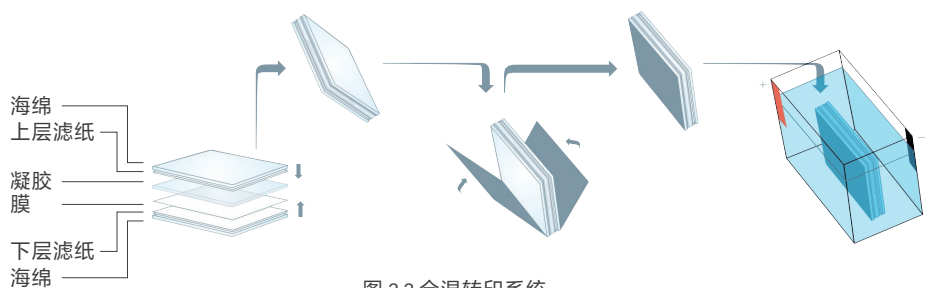


图 3.3 全湿转印系统

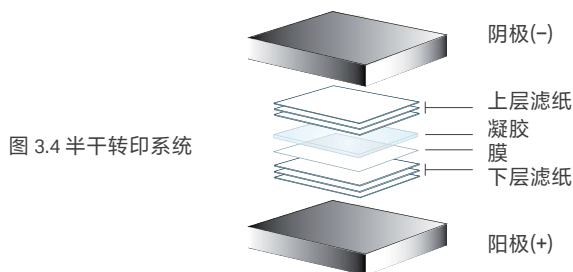
湿转步骤如下：

- 1 电泳后，用干净锋利的刀片或手术刀切下凝胶的一角，以便**确定凝胶的方向**。
- 2 **在转印缓冲液中平衡凝胶 10 至 15 分钟**。平衡不完全可能导致条带出现拖尾。
- 3 将 PVDF 膜在甲醇或乙醇中活化 30 秒，然后用水冲洗。在转印缓冲液中平衡 5 分钟。或用水预湿 NC 膜，然后在转印缓冲液中平衡至少 5 分钟。
- 4 将滤纸和泡沫垫浸泡在转印缓冲液中。将电转印盒放入装有 3 cm 深冷冻转印缓冲液的托盘中，**阳极(+)面朝下**。
- 5 从阳极(+)面开始，先放入一块泡沫海绵，然后放入两张滤纸、准备好的膜、凝胶、另外两张湿滤纸，最后放入第二块泡沫海绵。**确保去除滤纸、凝胶和膜之间的气泡**。

- 6 关上转印盒，将阳极(+)面与其他转印盒同方向放入装有冷转印缓冲液的电转印槽中。
- 7 转印条件：**200 ~ 350 mA 70 min 或者恒压 70 ~ 120 V 90 min。**

3.2.2 半干转印

- 1 **在转印缓冲液中平衡凝胶 10 至 15 分钟。**平衡不完全可能导致条带出现拖尾。
- 2 **剪下至少六张与凝胶尺寸相同或略小的滤纸。**根据印迹纸的厚度或层数来确定所需的缓冲液量。
- 3 用转印缓冲液浸泡至少三张印迹纸。将每张印迹纸逐一放在阳极(+)的中心，用干净的移液管或滚筒从中心向边缘滚动，清除所有残留的空气。
- 4 将预湿膜放在印迹纸上。印迹纸和膜的尺寸必须与凝胶相同或小 1 至 2 mm。**尺寸越大，电流越容易绕过凝胶，导致转印效果不佳。**要避免这种情况，可以使用一个塑料垫圈，垫圈上开一个与凝胶大小相同的长方形孔，垫在上下两叠滤纸之间。
- 5 将凝胶放在膜上后在凝胶上覆盖三层浸湿的印迹纸。小心叠放每一层，边缘要对齐。**每添加一层，用干净的移液管从中心向边缘滚动，去除所有气泡。**
- 6 半干转印通常在恒定电流下进行。大多数设备的**推荐极限电流为 0.8 mA/cm²**。转印时间通常约为 1 小时。



3.2.3 转印注意事项

对于大分子蛋白

- 转膜缓冲液里加入 0.1 % 的 SDS
- 甲醇浓度降到 10 % 甚至更少
- 用 4 °C 湿转过夜代替半干法转膜
- 大分子量蛋白转膜时间可适当延长至 2 - 3 h，电流可调至 100 mA 左右

对于小分子蛋白

- 去净缓冲液里的 SDS
- 用小孔径的膜
- 保持甲醇浓度在 20 %
- 小分子量蛋白转膜时间可缩短至 30 min

转印结束后

- 膜可以风干，并用保鲜膜包在 3 mm 滤纸之间，在 2 °C 至 8 °C 的温度下可保存长达 3 个月
- 干燥后，PVDF 膜需要在甲醇和水中进行活化，然后再进行封闭和探测
- 干燥后，硝酸纤维素膜需要在和水中进行预浸湿，然后再进行封闭和探测
- 印迹膜可在 4 °C 条件下在 PBS 或 TBS 中保存 2 周。不过，为了获得最佳结果，应立即继续蛋白质印迹法的流程

3.3 推荐产品

Protran™ (PT) 硝酸纤维素 NC 膜 		
10-6000-00	PT 0.1 µm 300 mm * 4 m	1 卷
10-6000-01	PT 0.2 µm 300 mm * 4 m	1 卷
10-6000-02	PT 0.45 µm 300 mm * 4 m	1 卷

Protran™ Premium (PTP) 低背景硝酸纤维素 NC 膜

10-6000-03	PTP 0.45 µm 300 mm * 4 m	1 卷
------------	--------------------------	-----

Hybond™ P 系列 PVDF 膜

10-6000-23	PVDF 0.45 µm 300 mm * 4 m	1 卷
10-6000-21	PVDF 0.2 µm 260 mm * 4 m	1 卷

Hybond™ LFP 低背景 PVDF 膜

10-6000-22	PVDF LF 0.2 µm 254 mm * 4 m	1 卷
------------	-----------------------------	-----

Whatman™ 3MM 印迹滤纸

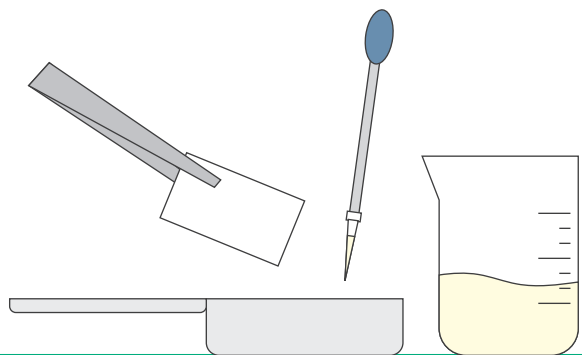
3030-704	3MM 滤纸 27 cm * 100 m	1 卷
3030-681	3MM 滤纸 15 cm * 100 m	1 卷
3030-675	3MM 滤纸 12.5 cm * 100 m	1 卷

Whatman™ GB 印迹滤纸

10-4269-81	GB005 滤纸 200 * 200 mm	25 张
10-4278-18	GB003 滤纸 200 * 200 mm	100 张

第四章

封闭



蛋白质印迹法是通过疏水相互作用将生物大分子固定在膜上。由于抗体与膜的非特异性结合不利于检测的特异性和灵敏度，因此必须“封闭”膜上尚未与蛋白质结合的部分。**封闭策略的选择主要取决于样本和所用抗体。**

蛋白质和非离子去垢剂是蛋白质印迹法中常用的两大类封闭剂。

4.1 蛋白质封闭剂

表 4.1 在蛋白质印迹法中用作封闭剂的蛋白质

蛋白质	推荐浓度	缓冲液	膜兼容性
BSA	0.2 % 至 5 % (W/V)	Tris缓冲盐溶液(TBS) /磷酸盐缓冲盐水(PBS)	硝酸纤维素/PVDF
脱脂牛奶	3 % 至 5 % (W/V)	TBS, PBS	硝酸纤维素/PVDF
Amersham™ ECL™ Prime 封闭剂（含脱脂奶）	2 % 至 5 % (W/V)	TBS, PBS	硝酸纤维素/PVDF
酪蛋白	5 % (W/V)	TBS, PBS	硝酸纤维素/PVDF
鱼明胶	2 % 至 10 % (W/V)	TBS, PBS	硝酸纤维素/PVDF

4.2 非离子去垢剂封闭剂

去垢剂可抑制蛋白质与膜的非特异性疏水结合。它们被认为是非永久性封闭剂，因为它们不会附着在膜上，只需简单的清洗步骤即可去除。通常使用 Tween-20 溶液，但也可考虑使用十二烷基硫酸钠（SDS）或 NP40 等替代品，它们对消除强背景信号特别有用。将去垢剂作为封闭剂使用时，**通常需要搭配蛋白质封闭剂。**

表 4.2 在蛋白质印迹法中用作封闭剂的去垢剂

去垢剂	推荐浓度	缓冲液	膜相容性
SDS	0.02 % 至 0.05 % (W/V)	TBS, PBS	硝酸纤维素 PVDF
Tween-20	0.05 % 至 0.1 % (V/V)	TBS, PBS	硝酸纤维素 PVDF
NP40	0.02 % 至 0.05 % (V/V)	TBS, PBS	硝酸纤维素 PVDF

4.3 常见不同封闭剂的封闭条件

表 4.3 常见不同封闭剂的封闭条件

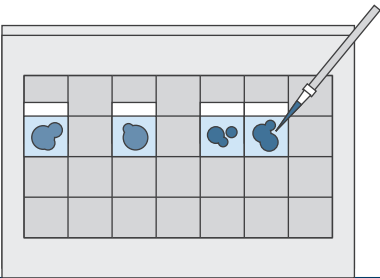
封闭剂	封闭条件
脱脂奶粉	最常见的封闭液，通常将 1 - 5 % 脱脂奶粉加入到 TBST 或者 TBS 溶液中使用。脱脂奶粉很便宜，且背景干净。不过需要注意的是， 5 % 脱脂奶粉溶液容易变质，不宜重复使用。
鱼胶	鱼胶比哺乳动物来源的明胶具有更少的氢结合氨基，因此往往具有更低的背景。 鱼胶通常使用 2 % 的浓度，40 °C 以下易于溶解。 但是，它含有一些竞争性反应物，如生物素。
BSA	BSA 相对便宜，并且对大部分实验都适用。 TBST 或 TBS 的浓度降至 0.3 % - 3 % ，在背景较深的情况下可以选 择性添加 0.1 % 的吐温-20。磷酸化实验时，建议使用 2 % 浓度的 BSA。
血清	常使用 10 % 的马或胎牛血清，溶液含有 0.02 % 叠氮化钠。 这种封闭液价格昂贵，并可能出现交叉反应。

4.4 封闭时间与温度

将印迹膜浸泡在新鲜制备的封闭剂中 10 分钟至 2 小时，同时在室温下不断搅拌。还可以将膜在温度为 37 °C 的条件下浸泡 1 小时或在温度为 4 °C 的条件下浸泡整夜，同样有助于解决持续存在的背景问题。**室温下的封闭时间不应超过 2 小时**，否则有可能出现染色伪影和高背景等问题。**如果需要延长封闭时间，则应在温度为 4 °C 的条件下进行。**

第五章

抗体孵育



通常，首先使用靶定目标蛋白质的未标记一抗对膜进行探测，然后使用靶定一抗的物种特异性标记二抗对膜进行探测。

在孵育过程中需要注意：

- 1、用于储存抗体溶液的所有容器必须严格清洁，**用于稀释抗体的所有溶液必须使用优质水配制。**
- 2、为了获得高质量的结果，请优化抗体稀释度。
- 3、应尽可能选择在与目标物种不同的物种中培育的一抗。
- 4、**确保一抗已通过蛋白质印迹法应用验证。**

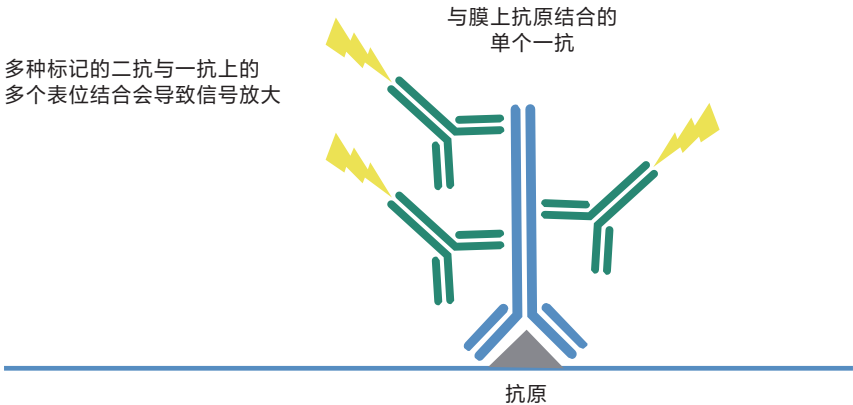


图 5.1 与酶或荧光基团偶联的二抗可与一抗结合，放大信号，从而提高WB的灵敏度

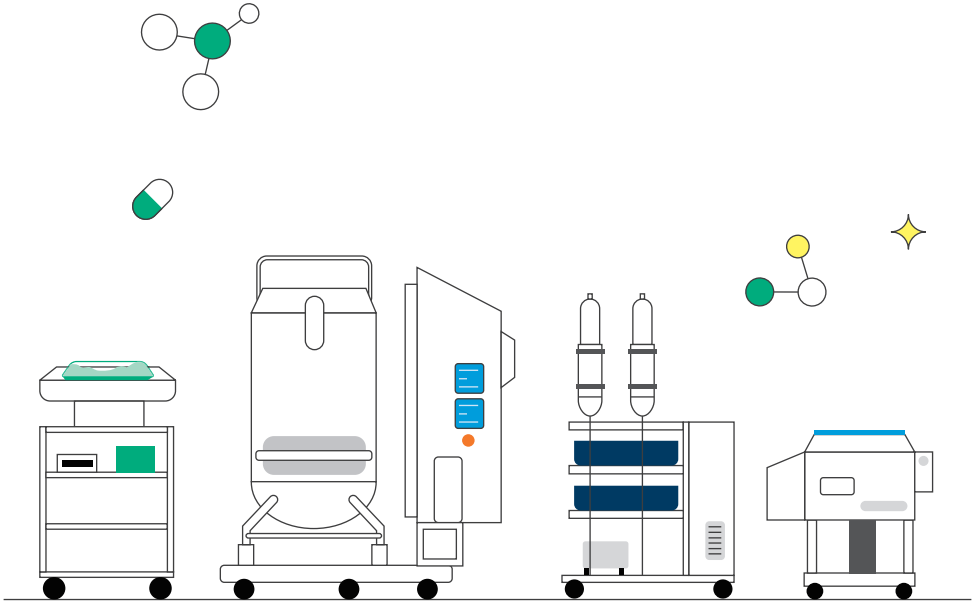
5.1 抗体孵育的实验步骤

- 1 封闭好的膜用 15 mL 的 TBST 洗 3 次，每次 5 min。
- 2 用 PBS-Tween / TBS-Tween 稀释一抗。
- 3 如果需要按照不同靶蛋白将膜剪裁成几段，可以在洗完膜之后，将膜夹在透明干净的塑料膜中间，根据 Marker 的指示从合适的地方剪裁开，**整个实验过程中要注意保持膜的湿润**。剪裁好的膜放到孵育盒不同的格子里，并做好记号。
- 4 将膜（蛋白面朝上）放入一抗溶液中，**室温下搅拌孵育 1 小时或 4 °C 条件下放置过夜**。
- 5 用 PBS-Tween 或 TBS-Tween 冲洗孵完一抗的膜三至六次，每次 5 分钟，或根据生产商的建议进行冲洗。
- 6 将膜放入用 PBST 或 TBST 稀释的二抗中（稀释比例从 1 : 100 到 1 : 500,000 不等，详见说明书），室温下搅拌孵育 1 小时或在 4 °C 下放置过夜。
- 7 将膜放入清洗溶液中，**清洗四至六次，每次 5 分钟**。
- 8 继续按照所选检测试剂和成像系统的建议进行检测。

Cytiva 二抗相关产品

货号	品名	规格	类型
NA931-1ML	Amersham™ ECL™ HRP标记鼠抗（羊血来源）	1 mL	HRP
NA933-1ML	Amersham™ ECL™ HRP标记人抗（羊血来源）	1 mL	HRP
NA934-1ML	Amersham™ ECL™ HRP标记兔抗（驴血来源）	1 mL	HRP
NA9310-1ML	Amersham™ ECL™ HRP片段标记鼠抗（羊血来源）	1 mL	HRP
NA9340-1ML	Amersham™ ECL™ HRP片段标记兔抗（驴血来源）	1 mL	HRP

货号	品名	类型	规格
PA45009	Amersham™ ECL™ Plex IgG-Cy™5荧光标记二抗（山羊-鼠）	150 µg	荧光
PA45011	Amersham™ ECL™ Plex IgG-Cy™5荧光标记二抗（山羊-兔）	150 µg	荧光
PA43009	Amersham ECL Plex IgG-Cy3荧光标记二抗（山羊-鼠）	150 µg	荧光
28901106	Amersham™ ECL™ Plex IgG-Cy™3荧光标记二抗（山羊-兔）	150 µg	荧光
29360786	Amersham CyDye 700 山羊抗兔	0.1 mg	荧光
29360784	Amersham CyDye 700 山羊抗小鼠	0.1 mg	荧光
29360790	Amersham CyDye 800 山羊抗兔	0.1 mg	荧光
29360788	Amersham CyDye 800 山羊抗小鼠	0.1 mg	荧光



第六章

检测



WB实验的检测方法多种多样，根据原理可分为**化学发光**、**化学荧光**、**荧光**、**显色**等。

基于酶的检测方法，如化学发光法和化学荧光法，需要额外添加发光液，当发光液与二抗偶联的酶发生反应时就会发光。

基于荧光的检测在结合荧光基团标记过的二抗之后则不需要添加额外的试剂，但是需要额外的光源激发荧光基团进行检测。

蛋白质印迹检测方法

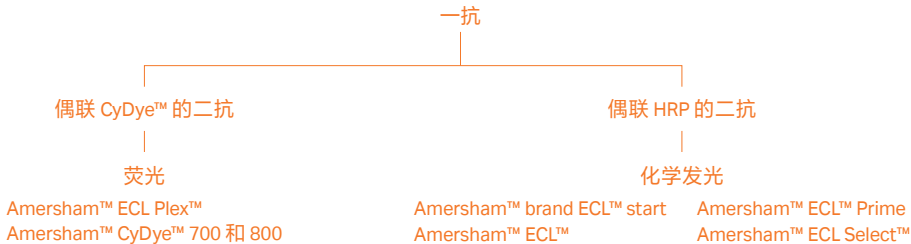


图 6.1 用于蛋白质印迹法检测的 Cytiva 试剂组合

6.1 化学发光

HRP 偶联二抗与和膜上目标蛋白质特异性结合的一抗结合。加入鲁米诺过氧化物检测试剂后，HRP 酶会在多步反应中催化鲁米诺的氧化。反应过程中会发出 428 nm 的低强度光。若加入某些化学物质，**发射的光会增强 1000 倍**，使其更容易被检测到，从而提高反应的灵敏度，这一过程被称为增强化学发光（ECL）。

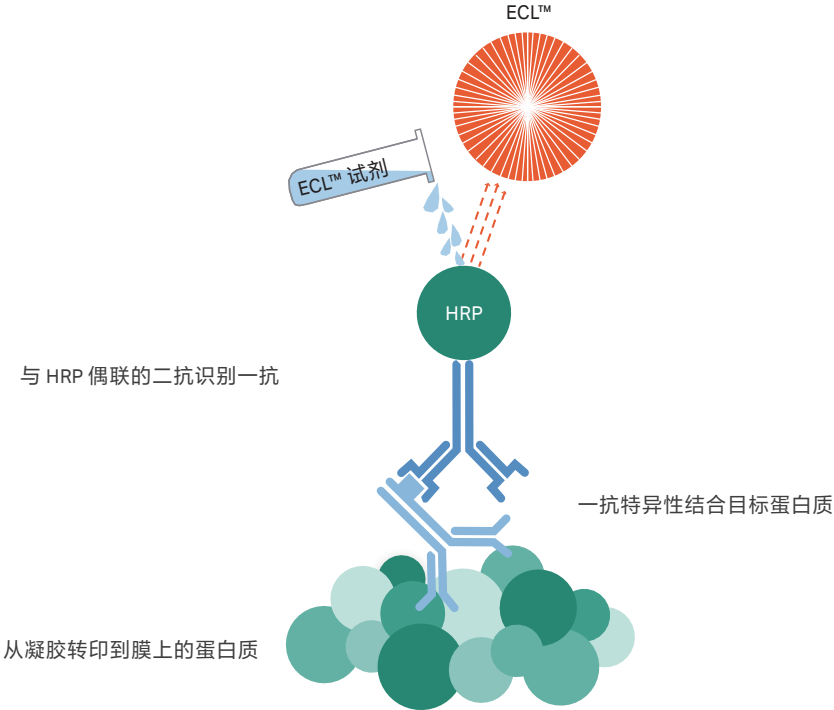


图 6.2 ECL 的成像原理

表 6.1 Amersham™ ECL™ start、ECL™、ECL™ Prime 和 ECL Select™ 适用于不同的蛋白质印迹应用，具体取决于所需的灵敏度和一抗的可用性

表 6.1

	Amersham™ ECL™ start	Amersham™ ECL™	Amersham™ ECL™ Prime	Amersham™ ECL Select™
应用	用于确证分析和检测中高水平的内源蛋白质	用于确证检测和分 析或其他应用，目 标蛋白质不受限制	可在广泛的蛋白质 水平范围内实现高 灵敏度和精确定量	可实现中低水平蛋 白质的高灵敏度和 精确定量
一抗，工作 范围稀释	1：500至1：3000	1：100至1：5000	1：1000至1：30000	1：5000至1：30000
二抗，工作 范围稀释	1：5000至1：30000	1：1000至1：50000	1：50000至1：200000	1：100000至1：300000

6.1.1 化学发光的操作

为保证信号强度，发光液“现用现配”，建议使用前再混合发光液的 A 液和 B 液试剂。如果混合试剂在使用前必须储存，**请用铝箔纸包裹容器或储存在阴暗处避光。**

使用 ECL 发光液进行检测时，将混合好的发光液溶液倒入干净的容器中，然后将印迹膜放入发光液中，轻轻摇晃，待充分接触后，控干或用吸水纸去除多余的发光液，再进行成像。

6.1.2 化学发光的注意事项

- **在实验过程中的任何时候都不要让膜变干。**如果膜干透，任何残留分子都会永久地与膜结合，无法剥离。这一点在使用 PVDF 膜时尤为重要。
- 为保证实验的可重复性，**使用前应让所有试剂平衡至室温。**
- 许多化学发光底物发出的信号强度可能会随时间减弱。如果检测信号很弱，请检查以下可能的原因：
 - 1、印迹膜接触发光液后，不宜长时间放置，应尽快进行检测。
 - 2、确保检测试剂未过期并已妥善保存，溶液不应直接暴露在光线下。
 - 3、确保检测溶液烧瓶的瓶盖未被混用，以免污染溶液。
 - 4、不要交叉污染溶液；使用新鲜、干净的移液器吸头。

Cytiva ECL 发光液产品

货号	产品描述	包装规格
RPN3243	ECL™ Start 试剂	200 mL
RPN3244	ECL™ Start 试剂	400 mL
RPN2209	ECL™ 试剂	250 mL
RPN2106	ECL™ 试剂	500 mL
RPN2134	ECL™ 试剂	750 mL
RPN2232	ECL™ Prime 试剂	100 mL
RPN2236	ECL™ Prime 试剂	300 mL
RPN2235	ECL Select™ 试剂	100 mL

6.2 荧光

荧光基团是一种分子，当它们吸收光线时，就会产生荧光。在基态下，荧光基团不发光，但当接收到光（激发）时，它们的能级被提升到短暂但不稳定的激发状态。当荧光基团回到它们的基态时，它们以比激发光更低的能量、更高的波长（发射）释放光。

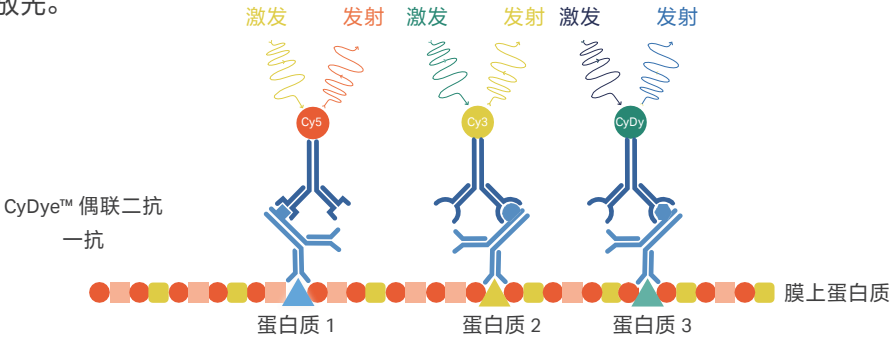


图 6.3

图 6.3 上图显示了多重检测的原理。针对两种蛋白质的一抗被与荧光 CyDye™、Cy™3 和 Cy™5 偶联的物种特异性二抗识别。**直接荧光检测减少了处理和成像步骤**，从而节省了时间，同时降低了定量误差。

6.2.2 荧光检测的注意事项

荧光污染会导致背景信号不均匀，请**确保所有材料都非常干净**。

- 使用低荧光背景的印迹膜，NC 膜或低荧光 PVDF 膜，避免背景信号干扰成像。
- 请清除膜上残留的凝胶碎片。
- 膜上若有溴酚蓝（BPB）会产生不必要的荧光信号。在转印到膜上之前，请清除 SDS-PAGE 凝胶底部的所有 BPB。
- 确保托盘、镊子和容器保持干净，无考马斯蓝染色剂，因为这也可能导致背景问题。
- 避免用圆珠笔标记膜，因为这会产生污染信号。**剪下膜的一角，并记下剪下的是哪个角。**
- 不要用手指接触印迹膜，要使用干净的镊子进行处理。
- 处理膜时应戴上无粉手套。实验室手套中使用的粉末会发出荧光，也可能会散射光线，从而干扰图像判读。

第七章

常见问题排除指南

7.1 转印中的问题

转印后膜上蛋白少或没有	
可能原因	解决方案
凝胶与膜接触不好	确保转印时滤纸、凝胶、膜摆放位置正确并接触紧密，无气泡。转印后，凝胶可以用 Ponceau 染色或者预染 marker 检查转印效率。转印中使用较厚的 3MM，17CHR 或 GB 系列转印滤纸。
转印装置正负极摆放不对	确保膜处在阳极位置，凝胶在阴极。确保转印正负电极连接位置正确。
目的蛋白被其他高丰度蛋白掩盖，如白蛋白，IgG 等	去除高丰度蛋白。

膜上蛋白条带出现拖尾	
可能原因	解决方案
转印过程过热	对于湿转： 确保转印槽中 buffer 没过转印模块。buffer 可先预冷或者在低温环境下转印。降低转印电流电压，延长转印时间。 对于半干转： 降低转印电流，不要超过 0.8 mA/cm²。 增加转印滤纸数量。

膜上蛋白条带出现拖尾

可能原因	解决方案
蛋白样品过量或者有杂质干扰，如脂类、核酸、IgG、白蛋白等	使用 Cytiva 相应的样品分级及除杂试剂盒，去除杂质。

分子量小的蛋白转印效率低

可能原因	解决方案
小蛋白在膜上结合量少	使用蛋白结合能力更强的膜。 增大 SDS-PAGE 凝胶浓度。 使用小孔径印迹膜，如 0.1 μm 或 0.2 μm Protran 印迹膜。
转印 buffer 中残留的 SDS 影响蛋白与膜的结合	转印 buffer 中不要有 SDS。 转印前凝胶与转印 buffer 平衡至少 15 min 以上。
转印 buffer 中甲醇浓度太低	提高甲醇的浓度（15 % - 20 %）
蛋白结合时间不够	调低电压，延长转印时间。

分子量大的蛋白转印效率低

可能原因	解决方案
甲醇浓度太高	降低甲醇浓度至 10 %（V/V）以下。
蛋白结合时间不够	使用湿转代替干转。延长转印时间。
蛋白凝胶浓度太高	降低凝胶浓度转印 buffer 中添加 0.1% SDS，促进蛋白溶解。 （注意：SDS 可以促进蛋白的溶解，但是也会破坏蛋白与膜的结合）

半干转印时效率低

可能原因	解决方案
电流未经过“三明治”印迹膜 / 滤纸组合	确保滤纸、凝胶和膜的尺寸大小一致。 PVDF 膜预先用甲醇浸泡，转印三明治先用转印 buffer 充分浸湿。

转印后膜上蛋白不平整	
可能原因	解决方案
气泡的影响	转印前确保膜充分浸湿。 使用玻璃棒赶除气泡。
指纹污染	操作时戴手套，避免手指与膜直接接触。
膜变干	避免膜变干。

7.2 标记与检测中的问题

信号弱	
可能原因	解决方案
封闭试剂不合适（封闭试剂可与目的蛋白相结合）	更换不同的封闭试剂，或者降低封闭试剂浓度。 使用 Biotin / Streptavidin 检测系统时，不要使用牛奶作为封闭试剂。 降低封闭试剂中去污剂的浓度，通常 0.05 % - 0.1 % Tween-20或 SDS 足够去除膜的高背景（可以尝试使用 TritonX-100 代替 Tween-20）。 对与单抗或者高度纯化的抗体，封闭试剂中不含去污剂效果会更好。优化洗涤的次数降低信噪比。 如果检测磷酸化的蛋白，避免使用含有磷酸的缓冲液（如 PBS）。
过度封闭	室温封闭不超过 1 hr 或者低温 4 度过夜。
曝光时间过短	延长曝光时间。
抗体结合时间不够或者温度不合适	一抗或二抗在室温通常结合 1 - 2 小时，如需要长时间抗体反应，可以在 4 度下反应 12 - 16 小时。
一抗选择不合适	确保一抗能够识别目的蛋白，可通过 dot-blot 检验。
抗体浓度太低	优化抗体浓度。

信号弱

可能原因	解决方案
二抗被 NaN ₃ 保护剂抑制	如果二抗是 HRP 标记的，确保二抗中不含有 NaN ₃ 保护剂。
蛋白的上样量太少	增大上样量。
抗体或者检测试剂过期	检查 Western blotting 相关试剂有效期。

表 8.1 2X上样缓冲液，10 mL

	终浓度	体积或质量
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	0.125 M	2.5 mL
10 % SDS	4 %	4 mL
甘油	20 %	2 mL
台盼蓝	0.02 %	2 mg
DTT*	200 mM	0.31 g
水	添加至最终体积为 10 mL	

DTT 应新鲜制备，并在将上样缓冲液加入样品前加入上样缓冲液中。β-巯基乙醇（500 μL / 10 mL）可替代 DTT。

表 8.2 分离胶溶液，40 mL

胶浓度	5 %	7.5 %	10 %	12.5 %	15 %
30 % 丙烯酰胺溶液	6.7 mL	10 mL	13.3 mL	16.7 mL	20 mL
1.5 M Tris-HCl (pH8.8)	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL
10 % SDS	0.4 mL	0.4 mL	0.4 mL	0.4 mL	0.4 mL
水	22.7 mL	19.4 mL	16.1 mL	12.8 mL	9.5 mL
10 % APS*	200 μL	200 μL	200 μL	200 μL	200 μL
TEMED*	13.3 μL	13.3 μL	13.3 μL	13.3 μL	13.3 μL

* 脱气后添加

表 8.3 浓缩胶溶液，10 mL

终浓度	4 %
30 % 丙烯酰胺溶液	1.33 mL
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	2.5 mL
10 % SDS	0.1 mL
水	6 mL
10 % APS*	50 µL
TEMED*	5 µL

* 脱气后添加

1.5 M Tris-Cl, pH 8.8: 在 150 毫升水中加入 36.3 克 Tris (分子量 (MW) 121.1) 。用盐酸将 pH 值调至 8.8，然后用水将最终体积调至 200 毫升。

0.5 M Tris-HCl, pH 6.8: 在 40 毫升水中加入 3 克 Tris (分子量 121.1) 。用盐酸将 pH 值调至 6.8，然后用水将最终体积调至 50 毫升。

10% SDS: 在 50 毫升水中加入 10 克 SDS，然后加水至 100 毫升。

5 × 电泳缓冲液，含 SDS: 0.125 M Tris, 0.96 M 甘氨酸, 0.5 % SDS, pH 8.3

将 15.1 g Tris 、 72 g 甘氨酸和 5 g 电泳级 SDS 溶于水中，加水至总体积为 1 L。稀释后溶液的 pH 值应为 8.3 (无需调节 pH 值) ， 室温保存。将 1 份缓冲液加入 4 份水中，配成工作溶液。



关于 Cytiva 思拓凡

Cytiva（思拓凡）是全球生命科学领域的先行者，是Danaher（丹纳赫集团）旗下独立运营公司。

作为值得信赖的合作伙伴，Cytiva 积极携手学术及转化医学领域的研究人员、生物技术开发者和制造商，专注于生物药物、细胞与基因疗法以及以 mRNA 为代表的一系列创新技术的研究，通过提升药物研发和生物工艺的能力、速度、效率和灵活性，为惠及全球患者开发和生产变革性药物和疗法。请访问 cytiva.com.cn 获取更多信息。

智荟专线：400-810-9118

官微订阅号：Cytiva

官微服务号：CytivaChina

cytiva.com.cn

Cytiva 和 Drop 标识是 Global Life Sciences IP Holdco LLC 或其附属公司的注册商标。

Amersham、Biacore、HCPQuant、ImageQuant、MabSelect PrismA、PrismA ELISA 和 Typhoon 是 Global Life Sciences Solutions USA LLC 或以 Cytiva 名义开展业务的附属公司的商标。

丹纳赫商标是丹纳赫公司的专有商标。

所有其他第三方商标都是其各自所有者的财产。

© 2025 Cytiva

所有商品和服务的销售需遵守在 Cytiva 运营之供应商公司的销售条款和条件。如需查看当地办公室的联系信息，请访问 cytiva.com.cn/contact。

CY54173-02JUL25-BR

