



Western blot 实验注意事项

一. 蛋白样品的制备

按组织净重 (g) : 裂解液体积 (ml) = 1:10 的比例加入相应体积的裂解液 (加入终浓度为 1mM 的 PMSF 适当浓度的蛋白酶抑制剂和磷酸化酶抑制剂, 以避免内源性酶分解蛋白, 影响蛋白质的抽提) 进行匀浆。

蛋白质的样品制备是 western blotting 的第一步, 也是关键步骤, 要求可获得所有蛋白质, 应注意以下问题:

- (1) 在合适的盐浓度下, 应保持蛋白质的最大溶解性和可重复性。
- (2) 选择合适的表面活性剂和还原剂, 破坏所有非共价结合的蛋白质复合物和共价二硫键, 使其形成各自多肽的溶液。
- (3) 尽量去除核酸, 多糖, 脂类等分子的干扰, 在裂解完毕离心之后小心取中层澄清溶液, 注意不要吸到底层沉淀和上层脂类。
- (4) 防止蛋白在处理过程中的人为修饰, 制备过程必须在低温下进行, 以避免细胞破碎释放出各种酶类的修饰。(可以加入 PMSF 等酶抑制剂)
- (5) 样本制备完后分装保存, 但是注意不要反复冻融

二. 凝胶的制备

均一胶的制备, 分子量较小的蛋白选用较大浓度的凝胶。

30%的 PAG 配置完后过滤于 4°C 保存。10%SDS 室温保存。AP 不稳定, 用时现配。

制胶关键是聚合时间, 分离胶聚合控制在从加入 10%AP 和 TEMED 至开始凝胶, 时间为 10-20min (未完全凝聚)。浓缩胶最佳聚合时间为 8-10min。可通过控制 AP 和 TEMED 量来控制。AP, TEMED 的量过高, 局部胶凝的太快, 会使凝胶不均匀, 电泳蛋白条带会弯曲。环境温度较高时, 应减少 AP, TEMED 的量。空气中氧气也会影响胶的聚合, 所以在分离胶上面应加一层水或正丁醇以隔绝氧气。

三. 电泳常见问题:

- (1) 条带出现“微笑”现象(中间凹两边翘起): 主要是凝胶中间部分凝固不均所致, 应待凝胶充分凝固后电泳, 或者催化剂加入后充分混匀。
- (2) 条带出现“皱眉”现象(中间鼓坡两边向下): 两玻璃板之间底部气泡所致, 应排除底部气泡。
- (3) 带出现拖尾现象: 主要是样本溶解效果不佳; 分离胶浓度过大, 电泳缓冲液放



置时间过长。建议：加样前离心，选择适当的样本缓冲液，加适量的样品促溶剂；使用新配置的电泳缓冲液，降低凝胶浓度或使用梯度凝胶。

- (4) 蛋白条带出现纹理现象：样品不溶性颗粒引起的。建议：加样前离心，加入适量的促溶剂。
- (5) 指示的溴酚蓝已跑出底板，但蛋白质未跑下来：与缓冲液和分离胶的浓度有关。应更换正确 PH 值的缓冲液，降低凝胶浓度或使用梯度凝胶

四. 转印

湿式电转印注意事项：

- (1) 要使蛋白质组分能有效的从凝胶转移到固相纸膜上，缓冲液的 PH 值很重要。有些分子量不是很大的蛋白质区带，即使延长电转印时间也不能从凝胶转移到膜上。这是由于蛋白质在转移缓冲液中恰好处于等电点状态造成的，因此应适当改变转移缓冲液的 PH，以利于转膜。另外，对于分子量较小的蛋白质，可在缓冲液中加入适量甲醇，因为甲醇能促进它们固定在固相膜上。但是对于大分子量的蛋白质，尤其是碱性蛋白质，缓冲液中是不宜加入甲醇的，因为甲醇使凝胶孔径变小，不利于分子量较大的蛋白的转移，甲醇能将结合在碱性蛋白质上的 SDS 解离出来而使其带正电或呈电中性，蛋白质就更难从凝胶中转移出来。
- (2) 电转印膜的选择：有 NC 膜，重氮化膜和阳离子尼龙膜，PVDF 膜。其中 NC 膜使用的最为普遍，它的蛋白质容量大，可用各种染色方法进行检测，但是它与蛋白质的结合是非共价性的，膜干燥后很脆。此外膜的孔径大小也是考虑的重要因素，目的蛋白 30KD 以下用 0.22um 孔径的 NC 膜，30KD 以上用 0.45um 孔径的 NC 膜。
- (3) 转印选择恒流，每个转印槽 150mA，10KD 以下转印 40min，10-30kd 转印 50min，30-100KD 转印 70min，100kd 以上转印 80min，转印完毕可用丽春红 S 染膜，检测转印是否成功，转印结束后，去除 NC 膜置于丽春红 S 溶液中，室温 5-10min 即可看见红色条带，用 TBS 洗数次即可洗掉红色条带进行后续实验。

五. 封闭

- (1) 电泳转膜过后，膜上其他没有结合蛋白质的空白位置需要用封闭液加以封闭，以避免一抗或二抗非特异性结合。这是由于 WB 的灵敏度很大程度上取决于封



闭的好坏，封闭时间过长（过度封闭）导致抗原表位的遮蔽，从而降低检测灵敏度；封闭时间过短（不完全封闭）又会导致最终背景增高或信噪比太低，因此封闭液的选择和条件的优化很重要。

- (2) 封闭液中应加入适量的防腐剂，避免封闭蛋白变性影响封闭效果。

六. 抗体的杂交

- (1) 若非特异性条带过多，可适当降低抗体的浓度，增加洗膜次数，蛋白电泳前延长变性时间，减少上样蛋白量，延长封闭时间。
- (2) 若信号弱，可能转膜不完全，可优化转移时间和电流，增加抗体的浓度，适当延长曝光时间。
- (3) 若背景较高，可适当降低抗体的浓度，过滤二抗，延长封闭时间，增加漂洗时间，减少曝光时间。

七. 检测

- (1) 胶片曝光几秒到数分钟，具体情况要看膜上化学发光条带明暗强度而定。胶片曝光时间不宜过长，时间过长会照成胶片背景变深。冲洗胶片以确定所测抗原的正确曝光时间
- (2) 冲洗胶片的步骤：曝光完的胶片先在显影液中冲洗至出现条带为止，一般在1min 以内,时间过长也会照成胶片背景变深。再放入定影液中漂洗,十秒即可。显影液漂洗完后，要多用清水冲洗，以免定影液中成分残留在胶片上。