

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，以 VirTis 探头超声仪为例，超声条件是：输出电功率是 30%—40%，10-15s，3 次(期间每次间隔 15s)，大约电流 30A；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；
- 5) 在 4 °C 预冷的离心机中以 16,000 × g 的转速离心 20 分钟。
- 6) 轻轻地从离心机中取出离心管，置于冰上。将上清液转移至放置在冰上的新离心管中，弃去沉淀。

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。
- 2) 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）2

小时。随后进行超声处理，以 VirTis 探头超声仪为例，超声条件是：输出电功率是 30%—40%，10-15s，3 次(期间每次间隔 15s)，大约电流 30A；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；

- 3) 4 °C 下在微型离心机中以 16,000 × g 离心 20 分钟。轻轻地从离心机中取出离心管，置于冰上。将上清液转移至放置在冰上的新离心管中。弃去沉淀。

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）

样品制备

1. 取出小部分 (50 μL) 裂解物，用于蛋白分析。确定每种细胞裂解物的蛋白浓度。
2. 向剩余体积的细胞裂解物中加入等体积的 2× Laemmli 样品缓冲液。我们推荐采用以下方法来还原样品和使样品变性，除非在线抗体数据表指明应使用非还原和非变性条件。
3. 还原和变性：在 100 °C 下将样品缓冲液中的每种细胞裂解物煮沸 5 分钟，并进行分装。在 -20 °C 下保存裂解物。注意：分装细胞裂解物 (50 - 100 μL)，避免反复冻融循环。
4. 在 37 °C 下解冻装有细胞裂解物的离心管。在微型离心机中以 16,000 × g 离心 5 分钟。

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 μg，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 °C 下封闭过夜。
2. 用适当稀释度的一抗在 5% 封闭溶液中 4 °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

可能原因	解决方案
样本上样量不足或者蛋白浓度过低	加大上样量或者浓缩样品
抗体浓度偏低	增加抗体浓度或者延长孵育时间
显色剂底物浓度不足	增加显色剂用量
显色剂失效	更换显色剂，显色剂A和B不可交叉混用
显色或曝光时间不足	延长显色或曝光时间

2. 转膜效率低

可能原因	解决方案
转膜缓冲液PH值与目的蛋白等电点相近	提高转膜缓冲液PH值
凝胶与转印膜之间存在气泡	转膜时应排除所有气泡
凝胶与转印膜两侧滤纸大面积接触	滤纸、转印膜裁剪与凝胶大小相等
转印膜种类选择不当	使用质量可靠的PVDF或者NC膜
电压或者电流过小	调高电压或者电流
转印时间过短或者过长	根据蛋白大小和装置类别选择合适的转印时间
湿转过程中温度过高	使用预冷的转膜液，湿转置于冰水中

3. 显色或曝光后无条带

可能原因	解决方案
选用一抗、二抗或者显色液不合适	更换一抗、二抗或者显色方法
目的蛋白低于检测下线	加大上样量或者浓缩样品
抗体效价过低	增加抗体浓度
抗体孵育时间不足	增加孵育时间
抗体过度洗涤	减少洗涤时间和次数
加入底物反应与曝光间隔时间过长	减少间隔时间

4. Western blot 背景高且不均匀

可能原因	解决方案
封闭物用量不足	提高封闭浓度，使用适当体积保证孵育时完全覆盖转印膜
封闭物使用不当	检测生物素标记的蛋白时不可用脱脂奶封闭
封闭的时间不够	延长封闭时间
抗体非特异性结合	减少抗体的浓度和孵育时间
抗体浓度过高或洗涤不彻底	降低抗体浓度，增加洗涤时间和次数
化学显色底物过多	减少显色底物用量

5. 非特异性条带

原因：一抗非特异性与蛋白结合

解决办法：在添加抗体的稀释液中添加 0.5% 的 SDS，或者更换一抗

经验：此种情况绝大多数是因为一抗不好，你无法判断哪一条是目的条带。如果实在没有更好的抗体，建议采用阴性对照和阳性对照来确定上述哪个条带是目的条带。当然这种情况下有一种很小几率的可能是一抗浓度太高引起的非特异性结合。

6. 条带拖尾

原因：蛋白量太大，一抗浓度和时间太长

解决办法：根据情况调整蛋白量，同时一抗浓度和时间也可以缩短。

经验：这种情况很容易出现，因为很多原因都可能导致这一个结果。一般来说，蛋白量都是我们经过很多次摸索得出的最适蛋白量，因此不太可能是蛋白量过多引起的。最有可能的是因为一抗浓度太高，作用时间太长引起的。另外洗一抗和洗二抗千万不要偷工减料，建议 5min*5 次。

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）

8. 条带呈哑铃状

原因：配置胶有问题

解决办法：把胶配好，不合格的胶坚决不用

经验：出现哑铃最大的可能是胶没有配置好，胶凝固后不均一。另外还有一种可能是样品中含有太多杂质，没有离心下来，然后杂质沉积在孔的中间，蛋白自然被推挤到两边。

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