

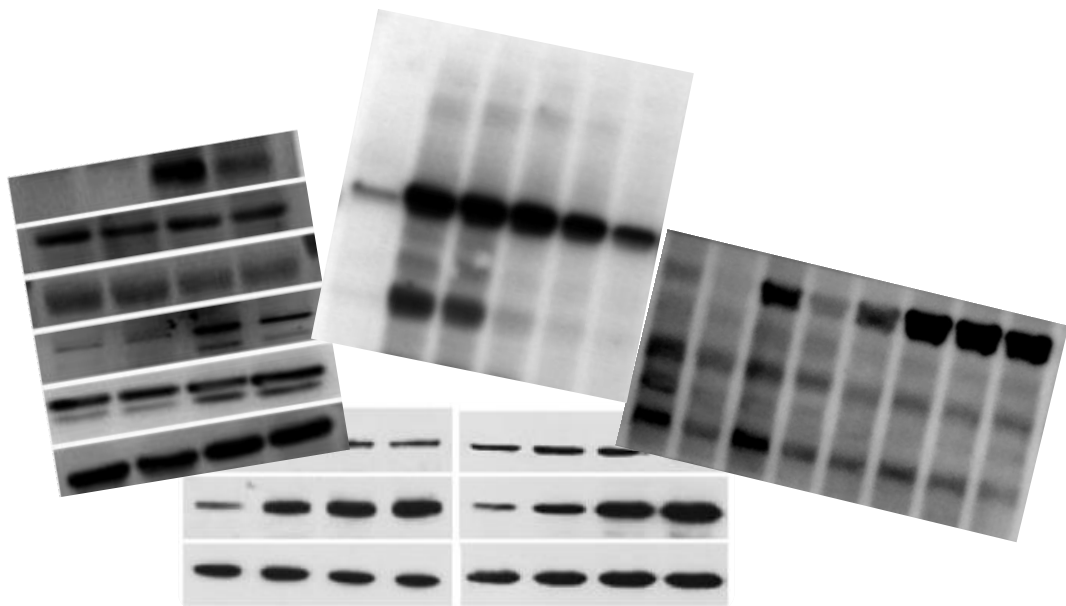
WESTERN BLOT TRAINING

正能生物 市场部



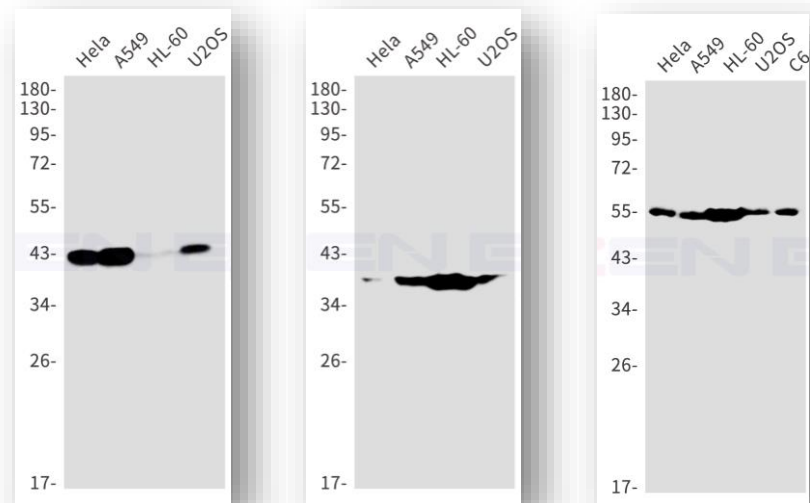
什么是WB? What is Western Blot?

Western Blot，即蛋白质免疫印迹，是在蛋白质电泳分离和抗原抗体检测的基础上发展起来的一项检测蛋白质的技术，它结合了SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳对蛋白的高分辨率及抗原抗体反应的特异性。



为什么是WB? Why Western Blot?

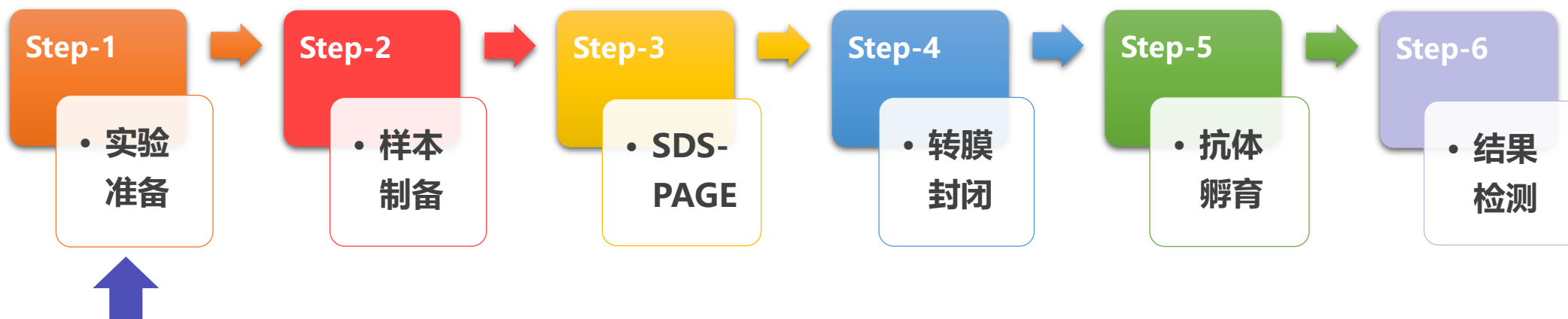
- ✓ 利用抗原抗体的特异性反应完成检测，结果更可靠
- ✓ 可以做内部参照（加入内参），分析更方便
- ✓ 相比于SDS-PAGE，可以分辨出相同分子量大小的目标表蛋白



怎么做WB?

A how-to manual of WB

- Western Blot的主要实验流程如下:



- ✓ 对实验样本、材料、仪器、原理、流程、可能遭遇的问题及解决方法的充分准备

Always have a Plan-B!

怎么做WB?

A how-to manual of WB

Step-1

✓ 充足的实验准备是保障实验顺利进行的绝对关键

• 实验准备



怎么做WB?

A how-to manual of WB

Step-2

✓ 获得高质量的样本是实验成功的良好开端

• 样本制备

Type-1 细胞培养液:

- 受到表达诱导或药物处理的细胞株，经多个细胞分裂周期的培养后得到的细胞产物。

——样本特点

- 在保证细胞株种系的前提下，样品较为“纯净”

——制备方法

- 裂解液：胞内表达，细胞培养液离心后收集的细胞实体，经破碎裂解处理后的上清液
- 上清液：胞外表达，细胞培养液离心，留上清液后浓缩
- 膜/核蛋白：需专门的提取方法

Type-2 组织破碎液:

- 临床病人的活检病理组织
- 模式动物组织：肿瘤组织、脑、肝、胚胎、卵巢等)

——样本特点

- 样本内容物较多（肌肉、筋膜、淋巴、血管等），蛋白种类复杂，检测干扰多

——制备方法

- 常通过液氮冰冻研磨来破碎组织
- 加入裂解液，获得蛋白溶液，离心后去上清液

怎么做WB?

A how-to manual of WB

Step-2

✓ 获得高质量的样本是实验成功的良好开端

• 样本制备

Type-3 重组蛋白:

- 由大肠杆菌、酵母等基因工程改造后的工程菌生产。天然蛋白的编码序列经过基因克隆、重组、表达优化后，分离纯化得到的重组蛋白

——样本特点

- 制备周期长，目前市场选择多
- 样本最为纯净，常作为阳性对照和免疫原

——制备方法

- 编码基因克隆→构建重组表达载体→诱导表达→产物纯化

Type-4 菌液: (多见于内参抗体靶标)

- 原核: 大肠杆菌、芽孢杆菌、金黄葡萄球菌
- 真核: 酿酒酵母、毕赤酵母
- 真菌: 黑曲霉、黄曲霉、青霉

——样本特点

- 菌液本质上与细胞培养液相似
- 真核生物细胞膜壁更难破碎

——制备方法

- 菌液离心（胞外蛋白）或破碎后（胞内蛋白）取上清液

商品化试剂盒已满足大多数需求!

怎么做WB?

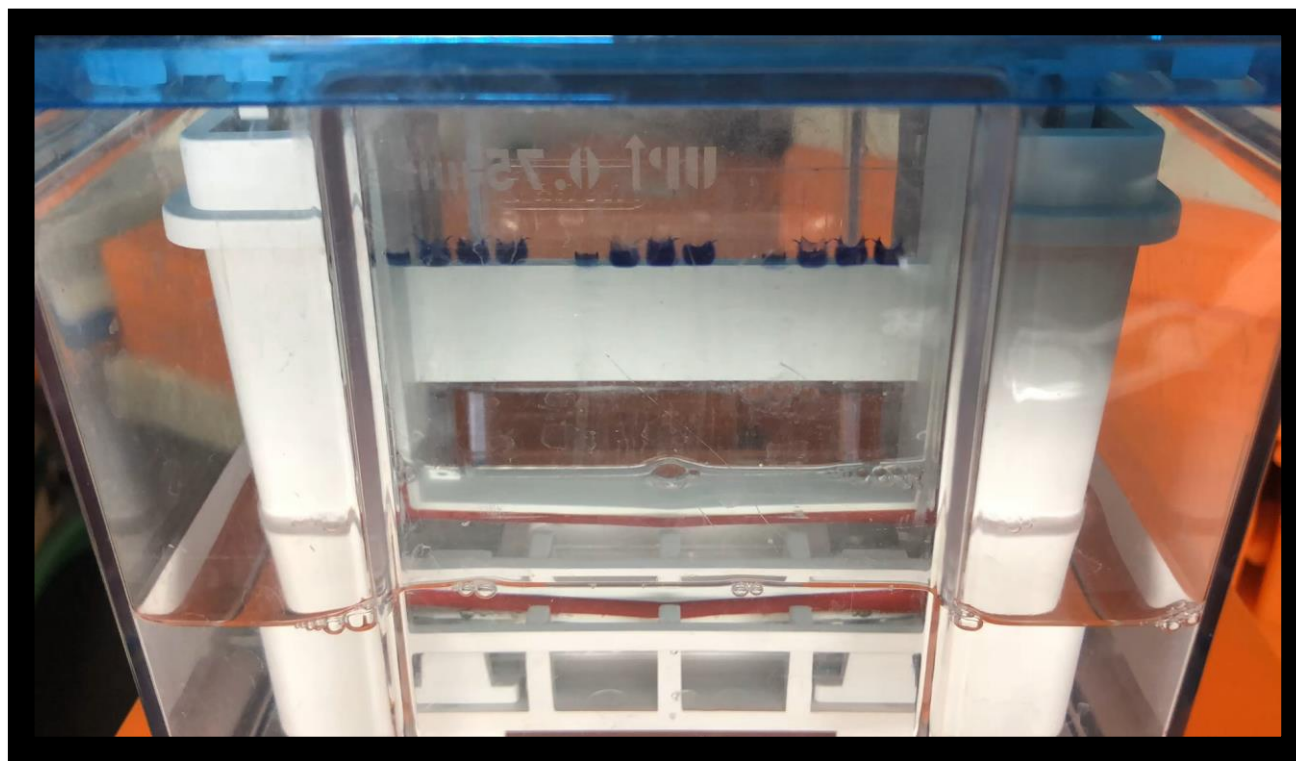
A how-to manual of WB

Step-3

✓ 让样本中的所有蛋白“从大到小”乖乖排列

• SDS-PAGE

- 聚丙烯酰胺凝胶为网状结构，具有分子筛效应，为蛋白提供“跑道”
- SDS-PAGE 仅根据蛋白质亚基分子量的不同就可以分开蛋白质。
- 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Native-PAGE)，在电泳的过程中，蛋白质能够保持完整状态，并依据蛋白质的 **分子量大小**、**蛋白质形状** 及其 **所附带的电荷量** 而逐渐呈梯度分开。



怎么做WB?

A how-to manual of WB

Step-4

✓ 转换“检测战场”，把目标蛋白留给抗体

• 转模封闭

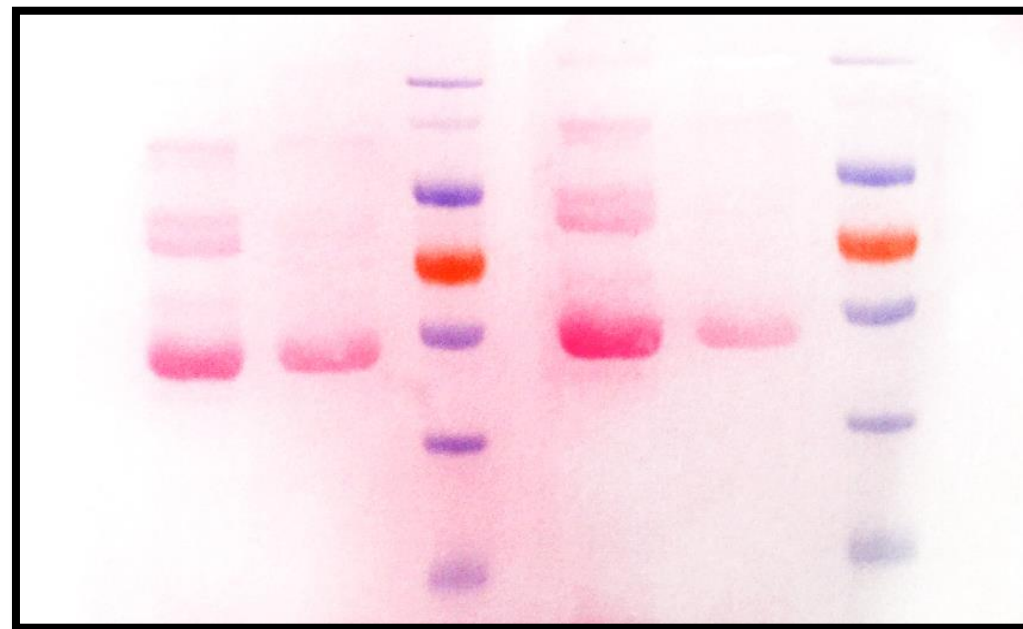
转模

- 将蛋白样本从凝胶转移至转印膜上
- 蛋白转印方向随电流方向，依据分子量选用孔隙合适的转印膜

封闭 (避免抗体的非特异性结合)

- 让转印膜浸泡在惰性蛋白溶液中，用惰性蛋白封锁膜上的空白区域。
- 封闭剂选择：

封闭剂与膜的亲和力，应高于其与抗体的亲和力



有经验的研究者会用丽春红等可逆染料进行预染，观察转膜效果

怎么做WB?

A how-to manual of WB

Step-5

✓ 用一抗找出目标，用二抗报告位置

• 抗体孵育

Round-1:

孵育一抗：完成目标蛋白
与一抗的特异性结合

Round-2:

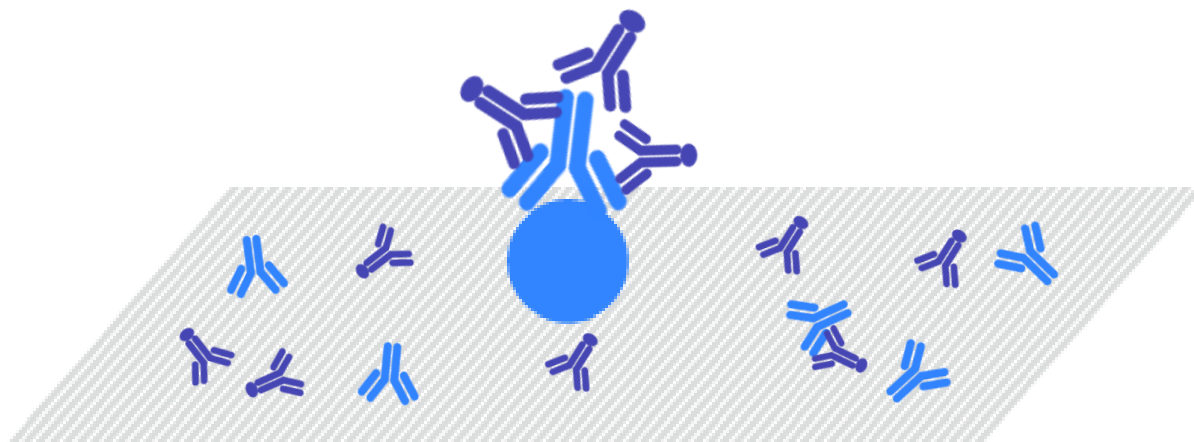
洗去未结合的多余一抗，
避免对二抗的孵育产生干
扰

Round-3:

孵育二抗，完成一抗
与二抗的特异性结合

Round-4:

洗去未结合的多余二
抗，避免对最后发光显
色的干扰



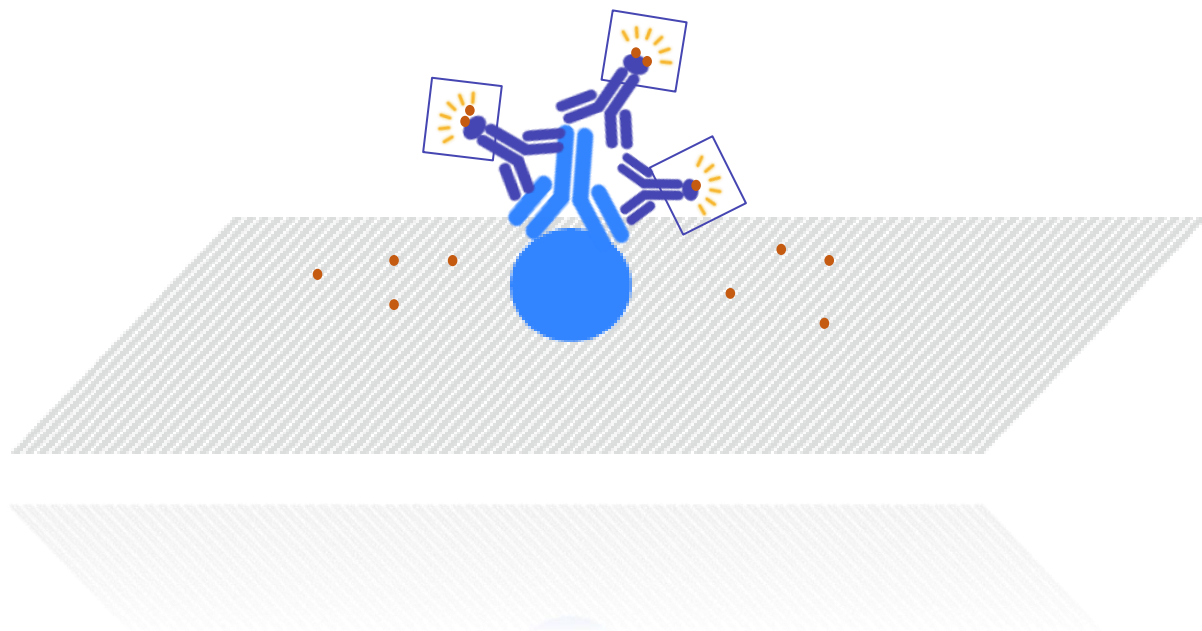
怎么做WB?

A how-to manual of WB

Step-6

✓ “点亮” 我们的目标蛋白

• 结果检测



Round 1:

按1:1比例，等比加入鲁米诺溶液和过氧化氢溶液，制作ECL工作液



Round 2:

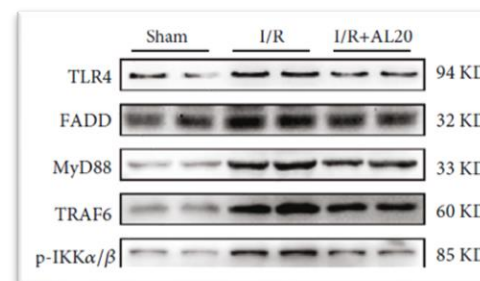
将孵育完二抗并洗去多余抗体后的转印膜，浸没在ECL工作液中，1-5分钟

Round 3:

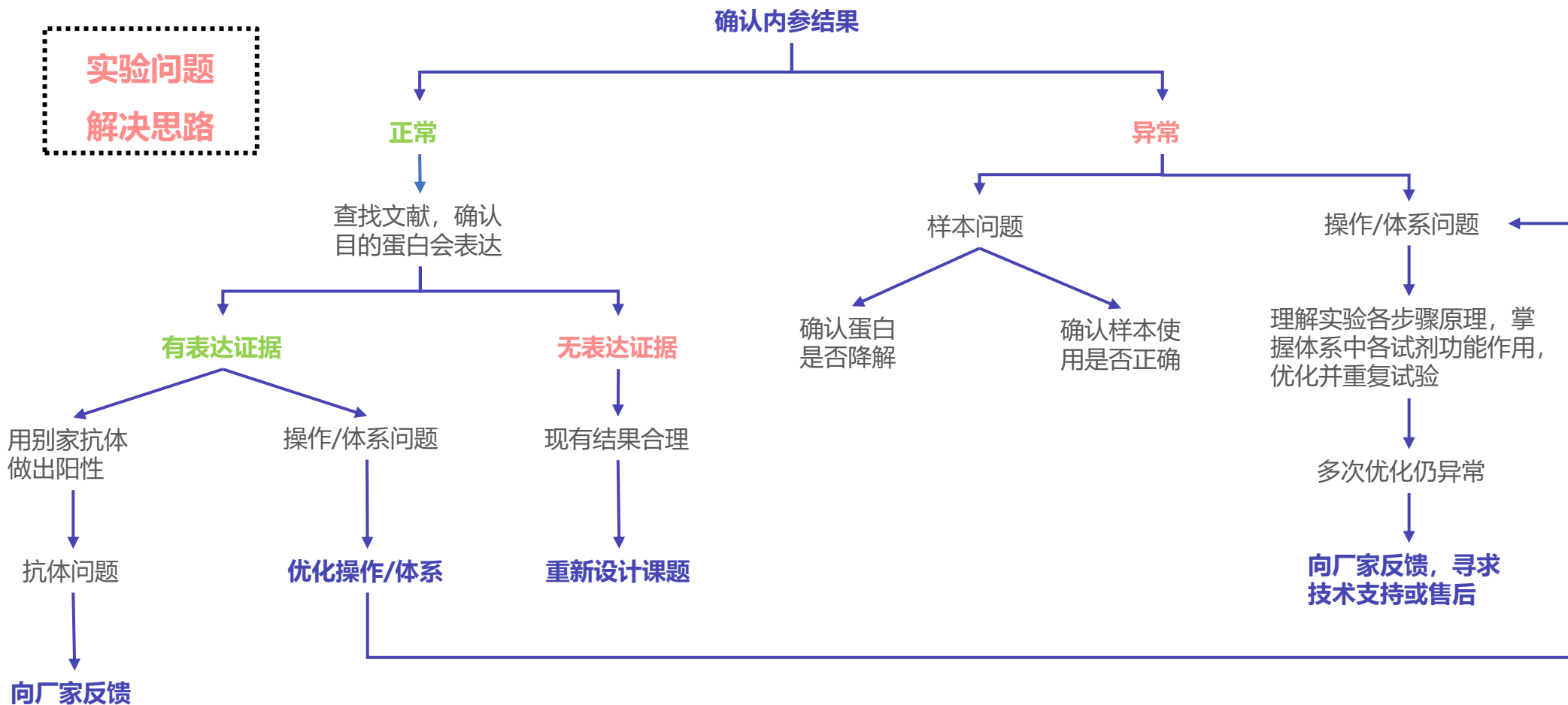
洗去多余ECL工作液，选择合适的曝光时间，拍照成像，完成灰度分析

Round 4:

实验完成



我的WB怎么了? Troubles in WB Process



我的WB怎么了?

Troubles in WB Process

案例1：我的膜曝光之后一片空白...

原因-1：样本降解，膜上根本没有蛋白

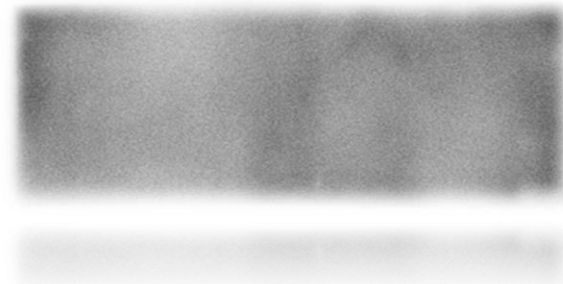
- 获取样本后，未进行蛋白浓度检测；未进行均一上样，蛋白提取失败 **(可能性较小)**

原因-2：样本中根本不应该表达目标蛋白

- 对样本中蛋白表达情况并不是很熟悉，可能需要检测的目标蛋白，根本就没有表达 **(有可能)**

原因-3：抗体未结合/抗体失效/一二抗不匹配

- 一抗鼠源，二抗却选了山羊抗兔 **(可能性较小)**
- 一抗与靶标结合失败 **(有可能)**
- 抗体存放不当或存放过久导致失效 **(有可能)**



处理方法-1

- ✓ 使用BCA法、Folin酚法、Bradford法等进行蛋白浓度检测，保证样本提取成功；或对凝胶进行染色，确认蛋白表达和分布情况

处理方法-2

- ✓ 在参考文献或Uniprot/NCBI上查找对应蛋白的组织表达特异性，分析可能的表达量，判断自己样本中的表达情况

处理方法-3

- ✓ 重新选择配对的一二抗
- ✓ 买其他品牌的相同靶标抗体对照试验
- ✓ 将该抗体和样本寄回厂家进行质检

我的WB怎么了?

Troubles in WB Process

案例2：我的膜曝光之后背景脏.....

原因-1：封闭不完全

- 膜的空白部分结合了一抗，导致二抗的不规则结合，显影曝光导致背景 **(可能性较小)**

原因-2：一抗/二抗与封闭剂非特异性结合

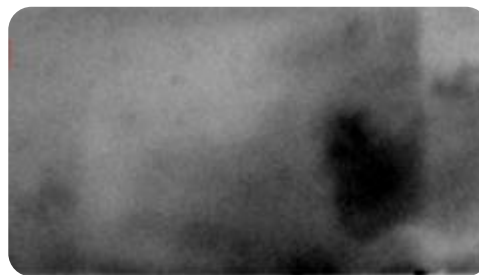
- 一抗/二抗与封闭剂搭配不当或浓度过高 **(较大可能)**

原因-3：封闭、抗体孵育后洗涤不彻底

- 同“原因-2” **(有可能)**

原因-4：转移膜选用不当

- 硝酸纤维素膜出现高背景的情况比PVDF膜低 **(有可能)**



处理方法-1

- ✓ 延长封闭时间

处理方法-2

- ✓ 更换合适的封闭剂或二抗
- ✓ 梯度稀释各试剂进行预实验，找到最优体系

处理方法-3

- ✓ 增加洗涤力度

处理方法-4

- ✓ 更换膜材质

我的WB怎么了?

Troubles in WB Process

案例3：为什么同一位置出现多条带？

原因-1：目标蛋白具有多种修饰形式

- 磷酸化、甲基化、乙酰化、糖基化等不同修饰作用在同一关键通路枢纽靶标上 **(有可能)**

原因-2：蛋白表位相似但结构不同

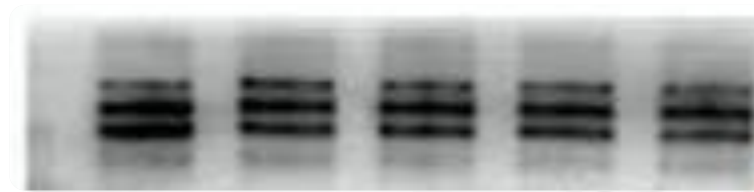
- 新检测出文献未报到蛋白或同一家族蛋构型不同，或是细胞株纯度不够 **(有可能)**

原因-3：细胞传代过多，蛋白表达异常

- 多次传代发生基因组紊乱，二倍体消失或其他编码表达异常的现象 **(有可能)**

原因-4：目标蛋白有多聚体

- 非单体结构的蛋白，在SDS-PAGE前的煮沸时间不足，导致蛋白解聚不充分 **(有可能)**



处理方法-1

- ✓ 结果正常

处理方法-2

- ✓ 接受该结果作为分析讨论的对象

处理方法-3

- ✓ 更换细胞株或重新分离原代细胞

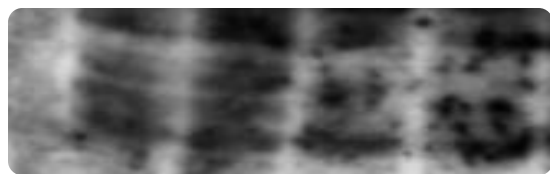
处理方法-4

- ✓ 充分做好课题调研，了解目标蛋白特性和结构
- ✓ 优化样品处理方式

我的WB怎么了?

Troubles in WB Process

案例4：膜上有黑色斑点

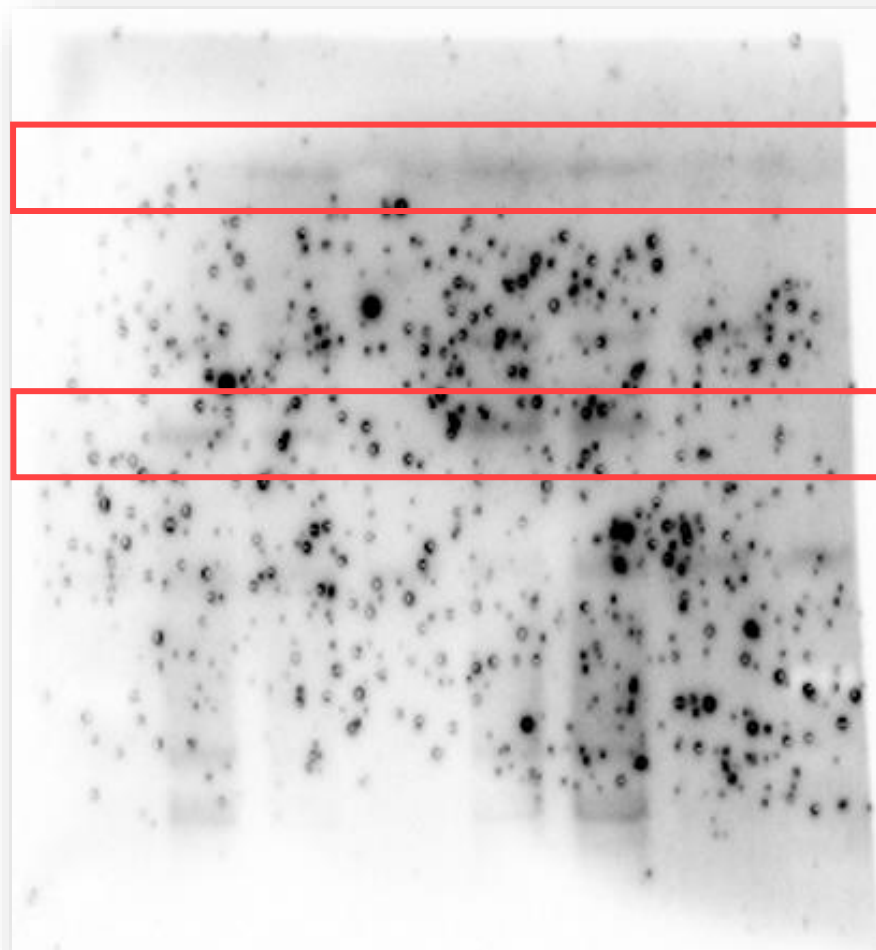


原因：抗体与封闭剂非特异性结合

- 抗体和封闭剂出现反应 (有可能)
- 封闭剂有杂质，或脱脂奶粉未溶解完全

处理方法

- ✓ 更换封闭剂
- ✓ 增加封闭后的洗涤时间



- 曝出条带，但很模糊
- 出现了非常多的黑点

我的WB怎么了?

Troubles in WB Process

案例5: 膜上有白色斑点或斑块



原因: 转模时模具组装贴合不良

- 凝胶和转移膜之间有气泡, 蛋白未迁移过去
(有可能)

处理方法

- ✓ 重新电泳, 小心转膜



ZENBIO

ANTIBODY EXPERTS BY YOUR SIDE!

正能生物
您身边的抗体专家!