

# Western Blot 详解(原理、分类、试剂、步骤及问题解答)

Western 免疫印迹 ( Western Blot ) 是将蛋白质转移到膜上，然后利用抗体进行检测。对已知表达蛋白，可用相应抗体作为一抗进行检测，对新基因的表达产物，可通过融合部分的抗体检测。

本文主要通过以下几个方面来详细地介绍一下 Western Blot 技术:

## 一、原理

## 二、分类

### i.放射自显影

### ii.底物化学发光 ECL

### iii.底物荧光 ECF

### iv.底物 DAB 呈色

## 三、主要试剂

## 四、主要步骤

## 五、实验常见的问题指南

### 1.参考书推荐

### 2.针对样品的常见问题

### 3.抗体

### 4.滤纸、胶和膜的问题

### 5.Marker 的相关疑问

### 6.染色的选择

### 7.参照的疑问

### 8.缓冲液配方的常见问题

9.条件的摸索

10.方法的介绍

11.结果分析

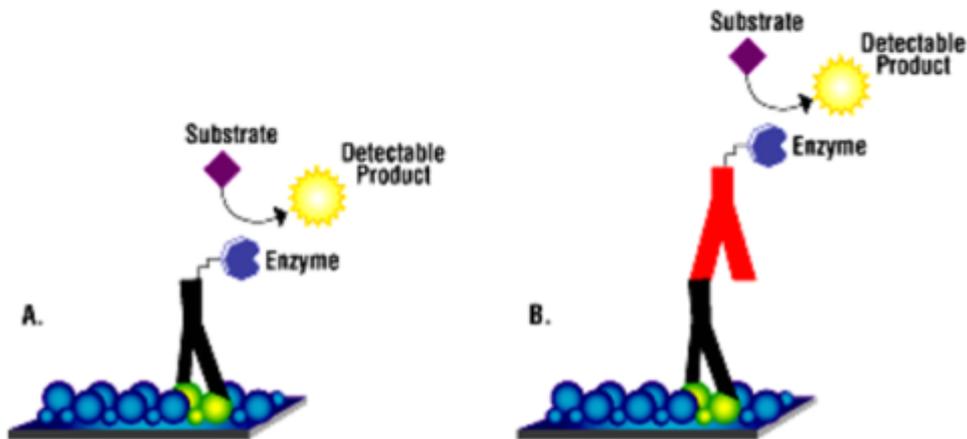
## 一、原理

1975年，Southern建立了将DNA转移到硝酸纤维素膜（NC膜）上，并利用DNA-RNA杂交检测特定的DNA片段的方法，称为Southern印迹法。而后人们用类似的方法，对RNA和蛋白质进行印迹分析，对RNA的印迹分析称为Northern印迹法，对单向电泳后的蛋白质分子的印迹分析称为Western印迹法，对双向电泳后蛋白质分子的印迹分析称为Eastern印迹法。

与Southern或Northern杂交方法类似，但Western Blot采用的是聚丙烯酰胺凝胶电泳，被检测物是蛋白质，“探针”是抗体，“显色”用标记的二抗。经过PAGE分离的蛋白质样品，转移到固相载体（例如硝酸纤维素薄膜）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，与对应的抗体起免疫反应，再与酶或同位素标记的第二抗体起反应，经过底物显色或放射自显影以检测电泳分离的特异性目的基因表达的蛋白成分。该技术也广泛应用于检测蛋白水平的表达。

## Western Blot基本原理

在电场的作用下将电泳分离的多肽从凝胶转移至一种固相支持体，然后用这种多肽的特异抗体来检测。



## 二、分类

现常用的有底物化学发光 ECL 和底物 DAB 呈色，体同水平和实验条件的是用第一种方法，目前发表文章通常是用底物化学发光 ECL。只要买现成的试剂盒就行，操作也比较简单，原理如下（二抗用 HRP 标记）：反应底物为过氧化物+鲁米诺，如遇到 HRP，即发光，可使胶片曝光，就可洗出条带。

## 三、主要试剂

1、 丙烯酰胺和 N，N' -亚甲双丙烯酰胺，应以温热(以利于溶解双丙稀酰胺)的去离子水配制含有 29%(w/v)丙稀酰胺和 1%(w/v)N，N' -亚甲双丙烯酰胺储存液丙稀酰胺 29g，N，N-亚甲又双丙稀酰胺 1g，加 H<sub>2</sub>O 至 100ml。)储于棕色瓶，4℃避光保存。严格核实 PH 不得超过 7.0，因可以发生脱氨基反应是光催化或碱催化的。使用期不得超过两个月，隔几个月须重新配制。如有沉淀，可以过滤。

- 2、十二烷基硫酸钠 SDS 溶液:10%(w/v)0.1gSDS , 1mlH<sub>2</sub>O 去离子水配制 , 室温保存。
- 3、分离胶缓冲液:1.5mmol/LTris-HCL(pH8.8):18.15gTris 和 48ml1mol/LHCL 混合 , 加水稀释到 100ml 终体积。过滤后 40C 保存。
- 4、浓缩胶缓冲液:0.5mmol/LTris-HCL(pH6.8):6.05gTris 溶于 40mlH<sub>2</sub>O 中 , 用约 48ml 1mol/L HCL 调至 pH6.8 加水稀释到 100ml 终体积。过滤后 40C 保存。这两种缓冲液必须使用 Tris 碱制备 ,再用 HCL 调节 PH 值 ,而不用 Tris.CL。
- 5、TEMED 原溶液 N , N , N' N' 四甲基乙二胺催化过硫酸铵形成自由基而加速两种丙稀酰胺的聚合。PH 太低时 , 聚合反应受到抑制。10%(w/v)过硫酸铵溶液。提供两种丙稀酰胺聚合所必须的自由基。去离子水配制数 ml , 临用前配制。
- 6、SDS-PAGE 加样缓冲液:pH6.8 0.5mol/L Tris 缓冲液 8ml , 甘油 6.4ml , 10%SDS 12.8ml , 巯基乙醇 3.2ml , 0.05%溴酚蓝 1.6ml , H<sub>2</sub>O 32ml 混匀备用。按 1:1 或 1:2 比例与蛋白质样品混合 , 在沸水终煮 3min 混匀后再上样 , 一般为 20-25ul , 总蛋白量 100μg。
- 7、Tris-甘氨酸电泳缓冲液:30.3gTris , 188g 甘氨酸 , 10gSDS , 用蒸馏水溶解至 1000ml , 得 0.25mol/L Tris-1.92mol/L 甘氨酸电极缓冲液。临用前稀释 10 倍。
- 8、转移缓冲液 : 配制 1L 转移缓冲液 , 需称取 2.9g 甘氨酸、5.8gTris 碱、0.37g SDS , 并加入 200ml 甲醇 , 加水至总量 1L。
- 9、丽春红染液储存液 : 丽春红 S 2g 三氯乙酸 30g 磺基水杨酸 30g 加水至 100ml 用时上述储存液稀释 10 倍即成丽春红 S 使用液。使用后应予以废弃。
- 10、脱脂奶粉 5%(w/v)。

- 11、NaN<sub>3</sub> 0.02% 叠氮钠(有毒，戴手套操作)，溶于磷酸缓冲盐溶液(PBS)。
  - 12、Tris 缓冲盐溶液(TBS):20mmol/LTris/HCL(pH7.5)，500mmol/LNaCl。
  - 13、Tween20(15)鼠抗人-MMP-9(16)鼠抗人-TIMP-1。
  - 14、过氧化物酶标记的第二抗体。
  - 15、NBT(溶于 70%二甲基甲酰胺，75mg/ml)。
  - 16、BCIP(溶于 100%二甲基甲酰胺，50mg/ml)。
  - 17、100mmol/LTris-HCL(pH9.5)。
  - 18、100mmol/L NaCl。
  - 19、50mmol/LTris-HCL(pH7.5)，5mmol/L EDTA。
- ( 可以参看分子[克隆](#) )

#### 四、主要步骤

生物秀为您搜集了现阶段几乎网上所有的 Western Blot 的中英文资料，仅供实验参考，可以根据自己实验的实际情况进行调整：

Western Blot PROTOCOL：

#### 五、实验常见的问题指南

根据问题的类型主要分成以下几类（以下资料仅作参考，请勿盲目模仿！）：

##### 1. 参考书推荐

##### A. 对初学者看什么资料比较好？

解答：《抗体技术实验指南》和 Antibodies ( a laboratory manual , wrote by Ed Harlow , david lane ) 两本书不错。

## 2. 针对样品的常见问题

**B. 做线粒体膜 UCP2 蛋白的 Western Blot (以下简写成 Western Blot), 提取线粒体后冻存(未加蛋白酶抑制剂),用的博士德的一抗,开始还有点痕迹,现在越来越差,上样量已加到 120 $\mu$ g,换了个 santa cloz 的一抗仍不行。是什么原因?蛋白酶抑制剂单加 PMSF 行吗?**

解答:怀疑是样品问题,可能是:1,样品不能反复冻融;2,样品未加蛋白酶抑制剂。同时,建议检查 Western Blot 过程,提高一抗浓度。对于加蛋白酶抑制剂来说,一般加 PMSF 就可以了,最好能多加几种蛋白酶抑制剂。

**E. 同一蛋白样品能同时进行两种因子的 Western Blot 检测吗?**

解答:当然可以,有的甚至可以同时测几十种样品。

**F. 如果目标蛋白是膜蛋白或是胞浆蛋白,操作需要注意什么?**

解答:如果是膜蛋白和胞浆蛋白,所用的去垢剂就要温和得多,这时最好加上 NaF 去抑制磷酸化酶的活性。

**G. 我的样品的蛋白含量很低,每微升不到 1 微克,但是在转膜时经常会发现只有一部分蛋白转到了膜上,就是在转膜后染胶发现有的孔所有的蛋白条带都在,只是颜色变淡了,有什么办法可以解决?**

解答:你可以加大上样量,没有问题,还有转移时你可以用减少电流延长时间,多加 5 - 10% 甲醇。

**H. 想分离的蛋白是分子量 260kd 的,SDS-PAGE [电泳](#)的分离胶浓度多大合适?积层胶的浓度又该用多少?这么大分子量的蛋白容易作 Western Blot 吗?**

解答:260kd 的蛋白不好做,分离胶用 6%, Stacking Gel 3.5%。

**I. 如果上样量超载,要用什么方法来增加上样量?如果需要加大上样量使原来弱的条带能看清楚。**

解答:可以浓缩样品,也可以根据你的目标分子量透析掉一部分小分子蛋白。一般地,超载 30%是不会有问题的。如果已经超了不少了,而且小分子量的也要,可以考虑加大胶的厚度,可以试试 1.5mm 的 comb。

**J. 蛋白变性后可以存放多久?**

解答: - 80°C,一两年没有问题。最关键两条:不要被蛋白酶水解掉;不要被细菌消化掉(也是被酶水解了)。

**K. 我所测定的蛋白分子量是 105KD,按理说分离胶应当采用 7.5%,但我所查资料却要求分离胶和浓缩胶均采用 11%的配方,不知为何?**

解答:上述您提到的两种凝胶均可以使用,因为 105 K D 的蛋白在上述两种胶的线性分辨范围内,但需注意条带位置。

**L. 接下来我准备采用 DAB 显色技术,二抗是生物素化的多克隆抗体,三抗是亲和素生物素体系,不知采用这样的方案后,封闭液是否要作调整,能否再用 5%的脱脂奶粉呢?好像有资料说脱脂奶粉会影响亲和素生物素的生成,是吗?**

解答:不能使用脱脂奶粉,因为脱脂奶粉中含生物素,用 B S A 代替应该好一点。

**M. 还有一问题,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?**

解答:Western Blot 一般上样 30 - 100 微克不等,结果跟目的蛋白的丰度、上样量、一二抗的量和抚育时间都有关系,也与显色时间长短有关。开始摸条件时,

为了拿到阳性结果,各个步骤都可以量多一点时间长一点,当然背景也就出来了。要拿到好的结果,如果抗体好的话比较容易,抗体不好的话就需要反复地试了,当然有的不适合 Western Blot 的怎样做也不行。所以拿到好的结果不容易。

**N. 做组织样品的 western 的时候,处理样品有什么诀窍吗?还有,您用过大牛血清做封闭剂吗?浓度如何?效果是不是比 BSA 好一点?**

解答:必须进行研磨、匀浆、超声处理,蛋白质溶解度会更好,离心要充分,膜蛋白需用更剧烈的方法抽提,低丰度膜蛋白可能还要分步抽提(超速离心)。还有一点就是组织中的蛋白酶活性更强,需要注意抑制蛋白酶的活性(加入 PMSF 和蛋白酶抑制剂 cocktail),封闭剂一般 5%脱脂奶粉较常用。如果一抗为多克隆抗体,使用 BSA 也是不错的选择。

**O. 您是否可以介绍一下大分子量蛋白 200KD,在做 western 要注意什么呢?**

解答:做 200kd 蛋白的 Western Blot 时要注意,分离胶最好选择>7%的;剥胶时要小心;转移时间需要相应延长;要做分子量参照(否则出现杂带不知道如何分析)。

**P. 有什么方法可以提高上样量?**

解答:可以浓缩样品;增大上样体积来增大上样量。

**Q. 我要检测的目的蛋白是分子量大概为 42kd 的膜蛋白,膜蛋白提取可不可以不用到超速离心机,有没有直接用低温高速离心机就可以的提到膜蛋白的方法,42kd 的蛋白分子量算不算大?**

解答:如是需要提取膜蛋白,(而不是只需要提取膜蛋白),可以用 Ripa buffer

提取膜蛋白和胞浆蛋白，用这个做 Western Blot 就可以了。如果是非要只提取膜蛋白就要用到超速离心机。42kd 不算大，也不算小，所以，可以按照一般的转移方法实施。

#### **R. 蛋白的上样量有没有什么具体的要求？**

解答：上样量要根据实验的要求来定，如果要求是定量和半定量的 Western Blot 则上样量要均等，如果只是要定性，则没有太大的关系，尽量多上就行了，但是不要超过  $0.3\mu\text{g}/\text{mm}^2$ 。

#### **S. 一抗，二抗的比例是否重要？**

解答：比较重要，调整好一抗，二抗的比例，可以去掉部分非特异的本底。

### 3. 抗体

#### **T. 做细胞信号传导，要做磷酸化某因子 Western Blot，其二抗有何要求？**

解答：对二抗无要求，要看你实验条件来选择，一般推荐用 HRP 标记的二抗。

**U. 同一公司的另外抗体用这个稀释度做出来效果很好，所以没做预试，怕浪费时间，用什么样的稀释度比较好呢？我用的 ELL+plus 试剂盒显色。转膜过夜，一抗孵育也是过夜的，若封闭也过夜的话就要四天才看的到结果了。**

解答：不同抗体，即使是同一公司的抗体，其最佳的抗体稀释度也是不一样的，需要你实验摸索。我觉得转膜过夜好像没有必要吧，转膜的目的也就是将蛋白转到膜上就行啦，何必浪费时间呢。至于具体的转膜时间，还要看你的目的蛋白分子量的大小；转膜的设备，是半干式，还是湿式。一抗当然可以过夜，如果你想缩短 Western Blot 时间的话，可以增高一抗的孵育温度，我们实验室一般 37

度，两小时就足够了；你可以参照抗体说明书。至于一抗和二抗得稀释度，你可以一抗 1 : 1500 ; 二抗 1 : 20000 试试。另外建议你洗膜时，多洗几次，最好是在封闭；一抗和二抗后至少是 5x5min，跑一张好膜不容易，多尽点心吧，这样不会浪费你的时间，只会节省你的时间！

## **V. 免疫组化和 Western Blot 可以用同一种抗体吗？**

解答：免疫组化时抗体识别的是未经变性处理的抗原决定簇（又称表位），有些表位是线性的，而有的属于构象型；线性表位不受蛋白变性的影响，天然蛋白和煮后的蛋白都含有；构象型表位由于受蛋白空间结构限制，煮后变性会消失。如果你所用的抗体识别的是蛋白上连续的几个氨基酸，也就是线性表位，那么这种抗体可同时用于免疫组化和 Western，而如果抗体识别构象形表位，则只能用于免疫组化。一般抗体说明书上都有注明此种抗体识别的氨基酸区间。（限于单抗）

## **W. Western Blot 中抗体的重复应用问题**

解答：抗体工作溶液一般不主张储存反复使用，但是如抗体比较珍贵，可反复使用 2 - 3 次。稀释后应在 2 - 3 天内使用，4 度保存，避免反复冻融。

### **4. 滤纸、胶和膜的问题**

## **X. NC 膜\ PVDF 膜\ 尼龙膜怎样鉴别？**

解答：尼龙膜是较理想的核酸固相支持物，有多种类型；硝酸纤维素膜是目前应用最广的一种固相支持物，价格最便宜；PVDF 膜介于二者之间。

就结合能力而言：尼龙膜结合 **DNA** 和 [RNA](#) 能力可达 480 - 600 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>，可结

合短至 10bp 的核酸片段；硝酸纤维素膜结合 **DNA** 和 [RNA](#) 能力可达 80 - 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ，对于 200bp 的核酸片段结合能力不强；PVDF 膜结合 **DNA** 和 [RNA](#) 能力可达 125 - 300 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。

就温度适应性而言：尼龙膜经烘烤或紫外线照射后，核酸中的部分嘧啶碱基可与膜上的正电荷结合，硝酸纤维素膜依靠疏水性相互作用结合 **DNA** 结合不牢固；PVDF 膜结合牢固，耐高温，特别适合于蛋白印迹。

就韧性而言：尼龙膜较强；硝酸纤维素膜较脆，易破碎；PVDF 膜较强。

就重复性而言：尼龙膜可反复用于分子杂交，杂交后，探针分子可经碱变性被洗脱下来；硝酸纤维素膜不能重复使用；PVDF 膜可以重复使用。

#### **Y. 在做 Western Blot 时，PVDF 膜用甲醇浸泡的目的？**

解答：PVDF 膜用甲醇泡的目的是为了活化 PVDF 膜上面的正电基团，使它更容易跟带负电的蛋白质结合，做小分子的蛋白转移时多加甲醇也是这个目的。

#### **Z. 检测磷酸化的 JNK 和非磷酸化的 JNK 可以在同一张膜上吗？**

解答：可以

#### **AA. 转膜后经丽春红染色的条带，为什么大蛋白分子的一端（即点样空的一侧）的转膜好象不是很好，为什么？**

解答：这是正常的，大分子的蛋白转移的慢，你延长转移时间和电流，大分子一端就会好的多，但是小分子的就有可能会变淡。

**BB. 我想问您裂解细胞用三去污裂解法，还是用上样缓冲液？**

解答：用上样缓冲液，这样有几个好处，可以提取总蛋白，同时又可以让磷酸化酶失活。

**CC. 采用 tank system 有什么讲究？**

解答：建议低电压，长时间，（一般 tank System 用衡压好点），如 28V 14 - 16hrs。

**DD. 做 HSP WESTEN 定量，同样的抗体免疫组化能做出，而 WESTEN 却不能？**

解答：这多半是抗体的问题，要看抗体的说明，是否能做 Western Blot 和 IHC。

**EE. 膜一般要如何处理？**

解答：一般用甲醇泡泡就可以了。

**FF. 如果是 6×8 转印膜，要加多少一抗？**

解答：一抗的稀释度是有说明的，根据你的一抗看看就知道了，但是那么大的膜孵育体积一般最少为 3 - 5ml。

**GG. 上下槽缓冲液有何要求，怎样才能达到最佳效果。**

解答：无要求。

**HH. 跑电泳的时候配的胶总是“缩”是什么原因呢？是有的成分不对吗？**

解答：没什么问题，就是你胶里的水分被蒸发了。过夜时拿保鲜膜包起来，在里面加点水保持湿度就可以了。如果过夜，胶里的水分被蒸发，采用保鲜膜包上也

可以；也可能母液（30%聚丙烯酰胺）有问题，你可以重新配制一份观察；能够替换的试剂，尽量换一下，选用好的试剂，避免找问题麻烦。脱色液中甲醇的含量太高也会造成胶缩。

## **II. 膜、滤纸、胶大小有何讲究？**

解答：如果是用的是半干转，顺序为：阴极 - 》滤纸 - 》胶 - 》膜 - 》滤纸。滤纸的长宽分别比胶小 1 - 2mm，而膜的长宽分别比胶大 1 - 2mm。绝对禁忌：上下两层滤纸因为过大而相互接触，这样会短路，电流不会通过胶和滤纸。

## **JJ. 蛋白质的分子量跨度很大，如要分离小 21KD，中至 66KD，大至 170KD，可以一次做好吗？**

解答：这么广的分布不好转移，一般建议：21kd 和 66kd 可以一起转，12% SDS-PAge，湿转 36V，3 - 5hrs 就可以了，可以根据你实验室的经验调节；170kd 用 7%SDS - page，48V 10hrs - 16hrs。

## **KK. 不能很好地将大分子量蛋白转移到膜上，转移效率低怎么样解决？**

解答：可以考虑：转移缓冲液中加入 20%甲醇（是指终浓度）(优化的转移缓冲液，可以参考《蛋白质技术手册》)，因为甲醇可降低蛋白质洗脱效率，但可增加蛋白质和 NC 膜的结合能力，甲醇可以防止凝胶变形，甲醇对高分子量蛋白质可延长转移时间；转移缓冲液加入终浓度 0.1%SDS，也是为了增加转移效率；用优质的转移膜，或使用小孔径的 NC 膜（0.2 微米）；使用戊二醛交联；低浓度胶，如低至 6%。太大时还可以考虑用琼脂糖胶；提高转移电压 / 电流；增加转移时间。

## 11. 如何选择最合适的蛋白杂交膜？

解答：蛋白质印迹杂交是分子生物学实验中极为常用的一门技术。选择质量上层、合乎要求、方便适用的杂交膜是决定这项实验成败的重要环节。根据杂交方案、被转移生物大分子的特性以及分子大小等等因素，我们要量体裁衣，从杂交膜的材质、孔径和规格上都要做出合理的选择。

硝酸纤维素膜：硝酸纤维素膜是蛋白印迹实验的标准固相支持物。在低离子转移缓冲液的环境下，大多数带负电荷的蛋白质会与硝酸纤维素膜发生疏水作用而高亲和力的结合在一起，虽然这其中的机制还不是十分清楚，但由于硝酸纤维素膜的这个特性，而且易于封闭非特异性结合，从而得到了广泛的应用。在非离子型的去污剂作用下，结合的蛋白还可以被洗脱下来。根据被转移的蛋白分子量大小，要选择不同孔径的硝酸纤维素膜。因为随着膜孔径的不断减小，膜对低分子量蛋白的结合就越牢固。但是膜孔径如果小于 0.1mm，蛋白的转移就很难进行了。因此，我们通常用 0.45 $\mu$ m 和 0.2 $\mu$ m 两种规格的硝酸纤维素膜。大于 20kD 的蛋白就可以用 0.45 $\mu$ m 的膜，小于 20kD 的蛋白就要用 0.2 $\mu$ m 的膜了，如果用 0.45 $\mu$ m 的膜就会发生“Blowthrough”的现象。从膜的质地上来看，最重要的指标就是单位面积上能够结合的蛋白的量。硝酸纤维素膜的结合能力主要与膜的硝酸纤维素的纯度有关，市场上有些硝酸纤维素膜通常会还有大量的醋酸纤维素，因而降低了蛋白的结合量。S&S 公司采用的是 100%纯度的硝酸纤维素，保证了最大的蛋白结合量，可达 80-150 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>。由于 100%的纯度，因而也大大减少了非特异性的结合，降低杂交背景，无需高严谨度的洗脱步骤。其次，膜的强度和韧性也是需要考虑的因素。常规的硝酸纤维素膜比较脆，漂洗一两次就会破损，不能反复使用。

PVDF 转移膜：PVDF 是一种高强度、耐腐蚀的物质，通常是用来制造水管的。PVDF 膜可以结合蛋白质，而且可以分离小片段的蛋白质，最初是将它用于蛋白质的序列测定 因为硝酸纤维素膜在 Edman 试剂中会降解 所以就寻找了 PDVF 作为替代品，虽然 PDVF 膜结合蛋白的效率没有硝酸纤维素膜高，但由于它的稳定、耐腐蚀使它成为蛋白[测序](#)理想的用品，一直沿用至今。PVDF 膜与硝酸纤维素膜一样，可以进行各种染色和化学发光检测，也有很广的适用范围。这种 PVDF 膜，灵敏度、分辨率和蛋白亲和力在精细工艺下比常规的膜都要高，非常适合于低分子量蛋白的检测。但 PVDF 膜在使用之前必需用纯甲醇进行浸泡饱和 1-5 秒钟。

离子交换型转移膜：硝酸纤维素和 PVDF 膜是靠疏水作用结合蛋白的，还有一类膜是根据离子交换的方式结合生物大分子的。由 DEAE (二乙氨基) 修饰的纤维素制成的 DEAE 阴离子交换膜同样可以 作为蛋白质印迹的固相支持物。DEAE 可以有效的结合阴离子基团，包括那些高于其等电点的蛋白质。在 pH10 以下，DEAE 基团都能带电荷，在低离子强度的转移液中结合蛋白分子。其最适的 pH 环境为 5-7。DEAE 膜可以用于蛋白多糖、病毒、酶以及血红蛋白的研究。这种 0.45 $\mu$ m 孔径的 DEAE 膜，除了可以做 [Western Blotting](#) 外，还可以用于核酸结合研究。

还有一种离子交换型膜是羧甲基 (CM) 修饰的纤维素膜，它可以结合蛋白和多肽分子，以及其他的一些带正电荷的样品，最适结合 pH 范围在 4-7。结合的多肽分子可以从 CM 膜上洗脱下来，用于氨基酸系列分析或[微测序](#)。

5. Marker 的相关疑问

**MM. 我用的是可视 marker ( BIO\_RAD ) , 但是电泳总跑不全 8 条带 , 请问什么原因 ? 怎样改善 ? 胶用过 8% , 10% , 12% , 都是这样。marker 是新买的。**

解答 : 一般来说 , 是小分子量 Marker 跑走了 , 增加胶浓度或减少电泳时间试试看。当然梯度胶也是不错的选择。

**NN. 用的是 Roche molecular Biochemicals 公司的由 100kd , 75kd , 45kd , 30kd , 20kd , 10kd 组成的 marker。开始做 Western Blot 时还能够看到 marker , 当然也仅能看见其中最多三条带。用 80V 进行 SDS-PAGE 电泳 , 用恒压 10V45min 转印的。前几次做 Western Blot 时没有进行丽春红染色 , 但尽管用了此方法也仅能看到 marker 有一条大约是 30KD 的条带出现。再就是把 70KD 和 130KD 两个目的蛋白同时在一块胶上进行分析 , 用培养基样品进行分析 , 没有用间接法 , 而是直接用融合蛋白 C 端的 V5 表位的酶联抗体 ( Anti-V5-HRP )。但就是出不来结果 , 我很茫然。谢谢您过给予指点 !**

解答 :1、 “我用的是 Roche molecular Biochemicals 公司的由 100kd , 75kd , 45kd , 30kd , 20kd , 10kd 组成的 marker。开始做 Western Blot 时还能够看到 marker , 当然也仅能看见其中最多三条带。” 有的时候 , Prestained Marker 放久了效果就会变差 , 电泳是条带不清晰 , 扩散。但是你的问题可能还有其他的方面的问题 , 可能是蛋白跟膜结合的不紧密。转移是多加点甲醇。

2、 “前几次做 Western Blot 时没有进行丽春红染色 , 但尽管用了此方法也仅能看到 marker 有一条大约是 30KD 的条带出现。” 转移时半干法建议用恒流 , 你这样的也就 30kd-50kd 的转移地比较好。

3、 “再就是把 70KD 和 130KD 两个目的蛋白同时在一块胶上进行分析 , 用培

培养基样品进行分析，没有用间接法，而是直接用融合蛋白 C 端的 V5 表位的酶联抗体 ( Anti-V5-HRP ) 。”

是否检测了表达量，二抗是否是好的，你做了阳性对照？你要做这么大的蛋白最好转移时间延长到 1.5hrs。

## 6. 染色的选择

### OO. Western Blot 哪种染色好？

解答：( 1 ) 阴离子染料是最常用的，特别是氨基黑，脱色快，背景低检测极限可达到 1.5 $\mu$ g，考马虽然与氨基黑有相同的灵敏度，但脱色慢，背景高。丽春红 S 和快绿在检测后容易从蛋白质中除去，以便进行随后的氨基酸分析。缺点是：溶剂系统的甲醇会引起硝化纤维素膜的皱缩或破坏。不能用语正电贺的膜。灵敏度低。

( 2 ) 胶体金，灵敏度高，检测范围可到 pg 级，但染色比稳定。

( 3 ) 生物素化灵敏度位于 1、2 之间，可用于任何一种膜。

## 7. 参照的疑问

### PP. 是否 Western Blot 实验半定量一定要加 ACTIN 内参？

解答：对于发表文章的实验最好加内参，实验严谨。

### QQ. 用 BANDSCAN 分析结果行吗？

解答：分析一般的结果没问题。

**RR. 核内抗原 Western Blot 内参选择什么合适？**

解答：可以选用组蛋白，组蛋白在细胞核中的表达是很稳定的，有很多都可以当成内参，在网上查查就可以选出你要的内参。

**SS. 转膜时采用电流是否比电压准确，是否根据  $0.8\text{mA}/\text{cm}^2$ ，一般 1 小时左右？**

解答：不是的，半干法推荐用恒流，一般根据目的蛋白的大小来确定电流和时间。

**TT. 做半定量人卵巢癌细胞系的 Western Blot，内参 B-actin，GAPDH，哪个好？**

解答：选用 beta-actin 就可以。

**8. 缓冲液配方的常见问题**

**UU. 转膜后的脱脂奶粉封闭时，所用的防沫剂 A 是什么？还有 Tris-HCl 是不是就是用 Tris 和盐酸配出来的呢？**

解答：转膜后的脱脂奶粉封闭液是 5% 的 TBST 脱脂奶粉。Tris - HCl 就是 Tris 盐用 HCl 调 pH 值，配置而成。

**VV. 准备做大鼠脑子的 Western Blot，蛋白质位于细胞核中，请问此蛋白质的提取液及操作方法是？每一步都必须低温吗？这种蛋白质是磷酸化的蛋白质，操作时如何防止去磷酸化的发生？**

解答：可以用提取总蛋白的 buffer 提核蛋白，可以加 NaF 防止去磷酸化。

**WW. 想问一下细胞裂解液选择蛋白酶抑制剂时有什么原则吗？受不受组织来源的影响？胞膜和胞浆有区别吗？**

解答：一般来说提取时加入光谱的蛋白酶抑制剂就可以了，操作时保持低温。除非有文献特别指明用特殊的方法，一般来说都没有区别。

**XX. 最近作了两次 Western Blot，不但没阳性结果，显色背景都没有，电泳和转膜都染过，有条带。底片和显色液及 DAB 显色液均试过，没问题。1、检测 GAD--分子量 67kd，提取液有蔗糖，其余同三去污裂解液。蔗糖不会有影响把？样本--20 度放置一周内测。2、一抗放置 2 年，可能效价不高！用的是 1:100。如果是一抗的原因，不会背景都没有把？3、第一次有不均匀背景，因为一抗过夜时密封袋不均匀。后两次无背景显色。4、封闭液用的是含 15%脱脂奶粉 TBST，漂洗液用的是含 1%BSA 的 TBST 液，TWEEN-20 为 0.1%，不会是封闭液的问题吧？**

解答：可以在下面几个问题上找找原因。1. 封闭液用 5%Milk，漂洗液(washing buffer 用 TBST) 2. 看看一抗是否能 work，降到 1:20。3. 看看二抗是否有问题。

**YY. 加甲醇的目的是什么？**

解答：加甲醇起着一定的固定作用，因为小分子蛋白质容易转出去。(特别是在硝酸纤维素膜上，因为 NC 膜结合蛋白质的能力较弱)。

**ZZ. “转膜后的脱脂奶粉封闭液是 5%的 TBST 脱脂奶粉”，其中 TBST 最后那个 T 是 Tween 吗，浓度多大？**

解答：是 Tween，配方如下:Tris-Buffered Saline Tween-20 (TBST), Dissolve

8.8g of NaCl , 0.2g of KCl , and 3g of Tris base in 800ml of distilled H<sub>2</sub>O, Add 500ul of Tween-20, Adjust the pH to 7.4 with HCl, Add distilled H<sub>2</sub>O to 1L, Sterilize by autoclaving.

**AAA. 封闭 ,一抗 ,二抗时的温度有没有什么规定呢 ,比如现在我就在室温里做 ,或者要在 4 度下?**

解答 :均可在室温进行 ,如果时间不够 ,一抗孵育可以先在室温进行一个小时 ,然后 4 度过夜。

**BBB. 实验室暂无 NP40 我用 sds 可以吗 ? 另外有过用尿素和硫脲提取膜蛋白吗 ?**

配方如下 :7M 尿素 ,2M 硫脲 ,Triton-x-100 0.2ml ,新鲜加入 :65mM DTT

蛋白酶抑制剂 :试剂盒 Halt™ Protease inhibitor cocktail kit 1%(v/v)

是用于抽提双向电泳用蛋白的配方。不止用于抽提细胞全蛋白(主要是想得到其中的膜蛋白)是否可行?

改良的 RIPA 裂解缓冲液(Tris.HCl , 50 mmol/L , pH 7.5; NaCl , 150 mmol/L; NP-40 ,1%; 脱氧胆酸钠 , 0.5%; SDS , 0.1%; EDTA , 1 mmol/L; PMSF , 1 mmol/L; Leupeptin , 2 μg/ml)不知对于膜蛋白效果如何?此外该方中的 EDTA , 是否用做蛋白酶抑制剂?

解答 :做 2 - D 绝对不推荐使用 NP - 4 0( 因为即使进口的 NP - 4 0 也不纯 , 其中的杂质会影响质谱结果 )。对于动物细胞 ,其蛋白酶活性较弱 ( 相对于组织和大肠杆菌等 ) , 可以不使用 cocktail , 因为 7M 尿素 + 2 M 硫脲 + 4 % C H A P S 构成的变性环境已经足以抑制大部分蛋白酶的活性 , 2 M 硫脲 + 4 % C H A P S 对于抽提膜蛋白有很大的帮助 , 不过如果您专职做膜蛋白建议采用分级抽提

法。此外还可以采用梯度离心法和一些基于去垢剂的方法。EDTA用于灭活金属蛋白酶(主要是其螯合作用)。加过多的蛋白酶抑制剂可以导致蛋白质的修饰,做WB无所谓,做M A I L D I时会给正确鉴定带来麻烦。裂解缓冲液中少了两性电解质(在2-D裂解缓冲液中,两性电解质起的作用:提供连续的PH梯度,从很大程度上增加蛋白质的溶解性;还可以去除一部分核酸);也不推荐采用SDS,因SDS会与蛋白质结合导致其等电点发生改变,如果您实在要用,终浓度降到0.1%以下。

## METHOD2

(50ml总量): $\beta$ -mercaptoethanol 342  $\mu$ l; 20% SDS 5 ml; Tris-Cl pH 6.7 3.125 ml; 加 ddH<sub>2</sub>O 至 50 ml。

方法:将用过的膜浸入 stripping buffer 中,置 50°C水浴箱中 30min,间断振荡。之后用 TTBS 洗 3\*5min 就好。此时你已经可以按新的转移好的膜来再次使用了。

该方法的优点:省事,省力,省钱,符合国际惯例。

## METHOD3

- 1、 $\beta$ -mercaptoethanol 35ul
  - 2、10%SDS 1ml
  - 3、tris (0.5M, pH6.7) 625ul
  - 4、dH<sub>2</sub>O 3.34ml
- 50-55°C, 30min。

## METHOD4

stripping buffer 应该是可以放置很久的。不过我习惯于现配——毕竟，加了  $\beta$ -mercaptoethanol 以后太难闻了，配了就用；而且，有了现成的 Tris-HCl 缓冲液和 SDS 的母液 现配还是很方便的。每次用量 5ml 少了点 我每次用 50ml。

#### METHOD5

0.5M NaCl , 0.5M HAc ; 室温摇床 15min。

#### METHOD6

将用过的膜泡在 1\*TBS 中室温振摇过夜，中间可以换液 2-3 次，然后封闭，加一抗，二抗（同第一次发光），实践证明方法完全可行。

不管用那种方法，洗脱后都要用 PBS 或 TBS 再洗几次。

#### 9. 条件的摸索

**DDD. 用的是 Santa Cruz 的抗体，也实验过一抗和二抗肯定能结合，二抗加 DAB 肯定能显色。电泳的胶用考马斯亮蓝染色没问题，但是不知道与 Marker 对应的条带是否是我要的（我目的蛋白的分子量分别是 55KD、29KD）。半干法 2 小时转膜后，丽春红染色发现大分子量蛋白转过去的较少。难道是裂解液出了问题？我用的是三去污剂，但没加叠氮钠和大概叫 Apoptin 的那种蛋白酶抑制剂。冰上裂解 -80 度冻存的细胞，4 度 12000g 离心 5 分钟，取上清，与分子克隆（第二版）上的加样 buffer 混合，沸水变性 5 分钟，上样。不知道是哪里出了问题？**

解答：建议：1、首先确定您提的蛋白质量如何？可用 PIERCE 公司的 BCA 试剂盒测蛋白的浓度，一般来讲，其浓度应该在几-20 微克/微升。

2、若是蛋白没问题，那就看是不是电泳的问题，首先要看胶的浓度，您目的蛋白的分子量分别是 55KD、29KD，建议分别用 10%和 12%的胶。60-80V，1 小时左右。跑过积层胶与分离胶的线时，换用 100V，3-4 小时。

3、转膜，建议恒压，15V，不用转 2 小时，45 分钟足以。您所说的大蛋白转过去的，并不是真正的少，而是因为提的蛋白中大蛋白本身就很少。我曾经也转过 2 小时，但和 45 分钟的区别并不大。

4、根据 MARKER 的条带( 我的是 7 条带 :14、18、25、35、45、66、116KD )，您根据 MARKER 的条带剪下 25 与 35 之间( 29KD )的条带 ,45-66 之间( 50KD )的条带。这样第一，可以节省抗体，第二，您要的目的条带肯定在上面。

5、延长 1 抗、2 抗孵育时间( 我曾室温 1 小时，4 度过夜 )，适当加大 1 抗浓度。

6、我买的也是 Santa Cruz 的抗体，我觉得质量还可以，我想您应该先找其他方面的原因。

EEE. 电泳用的是恒流，一块胶，20mA，100 分钟左右。转膜也是恒流，38mA，100 分钟。而且我用别人的细胞和一抗在我的整个反应体系下做出来了，当然彼此的目的蛋白不同。所以，我想问题应该出在抗原和一抗上，不知对不对。

解答：电泳的条件：样品的分子量决定了胶的浓度，一般使样品跑至胶的中部即可。正常条件下，电泳时溴酚蓝和 10kd 左右蛋白跑在一起。由此可以决定电泳的电压和时间。建议你用恒压 80 - 100 伏。

FFF. BIO-RAD 的半干转运系统有一个很致命的弱点就是无法控温( 我用的就是这种 )，当电流过高，而系统的散热又比较差，滤纸的吸水性比较差的情况下，

**就很容易烧胶。**

**就转膜时，是采取恒压还是恒流的问题，我想和大家探讨一下，我感觉我这个系统用恒流很容易烧胶，我的胶有 68cm<sup>2</sup>，用 50mA 恒流来转膜，刚开始电压就很高，有 20 v 左右，而用恒压，开始电流有 110mA，但 15min 后，电流就降到 80mA，30min 后就稳定在 40mA，不就相当于恒流吗？**

解答：恒流时电压逐渐升高的原因是湿滤纸逐渐变干因而电阻逐渐增大的缘故，如果电压升得太快，可以使滤纸更湿一些以克服。就我的感觉，20V 的电流 30min 以后 20Kd 以下的分子丢失很多，不过我用的是小胶 40cm<sup>2</sup>，不知有无不同。

**G.G. 我想尽量提高转膜的效率（我的实验要求转到膜上的蛋白越多越好，不管是什么大小蛋白）不知道有那些办法？**

解答：不管怎么转都会存在蛋白转移不完全（电压过小时间过短）或过度转移（电压过大时间过长）的问题，鱼（小分子量蛋白）和熊掌（大分子量蛋白）不可得兼呵呵。建议把胶切成两半，比如以 35KD 为界，分别进行转膜，下半时间短，上半时间长一点，应该会好一些。

**H.H. 请问一下 PVDF 膜和硝酸膜结合蛋白的原理是什么？**

解答：一般而言，硝酸纤维素膜是通过疏水作用来和蛋白质相联，这样的话，反复洗几次后，蛋白容易掉下来，结果较差。尼龙膜主要通过它膜上的正电荷和蛋白接合（注：常用的 PVDF 即带正电荷的尼龙膜），同时也有疏水作用，但相对较弱。这样的话，PVDF 膜和蛋白接合较牢，不易脱落，结果较好。

**III. 1、煮好后的样品，若没有及时上样分离，应如何保存，可以保存多久？2、有没有人在用 bio-rad 的小型垂直电泳槽，有没有操作手册？3、湿式转移时是**

否必须要用 bio-rad 的专用滤纸？4、恒压转移的条件如何确定，因为我要分离小至 21KD，中至 66KD，大致 170KD 的蛋白质，转移条件能够相同吗？5、凝胶的浓度是不是可以用一个浓度？书上写不同的凝胶浓度分离的分子量范围不同，还给出了一个线性范围，是不是不在这个范围内也能分离，只是就不是线性范围了？

解答：1、煮好后的样品，放到-20，我们在一个月后此样品，效果一样。

2、bio-rad 的小型垂直电泳槽的操作手册在他们的主页 Bio-Rad USA 上有。

3、转移时一般的 WATERMEN 滤纸就可以。

4、转移条件是和蛋白质大小有关的：以次确定电压和时间。具体可让 ptglab 帮你定夺。

5、凝胶的浓度也是和分离蛋白质大小有关。不是随心所欲选的，否则分离效果可能不是你所期望的。

### **JJJ. 怎样设计实验来确定最佳的条件？**

解答：随便说一点，具体的还是需要自己想：

1、在每个上样孔里上同样的蛋白样品，量也一样，最好是组织样，（也可以跑 1 个大 well，不插梳子，多上样，）SDS-page；

2、转移，设定电流或电压；

3、每隔 1 ( or n ) 小时，取一点膜染色，看转移效果。

**KKK. 我要测两种抗体，一种为磷酸化的目的蛋白，一种为总的目的蛋白，不知道用什么方法 strip 最好，我用甘氨酸 ( PH2.9 ) 漂洗 15 分钟，似乎没什么效果？**

解答：你可以加巯基乙醇（loading buffer 一样的浓度），56 度，30mins，看看。

**LLL. 1、在用 PBS 洗涤抗原-抗体-ProteinA-Agarose 复合物时，每次要重悬多长时间合适？2、最后用 2xSDS 重悬抗原-抗体复合物离心后，由于 2XSDS 中已经加入了溴酚兰，因此下面的 Agarose 珠子几乎看不到，所以吸取上清加样时也不知道里面是否吸进了 Agarose。不知有什么方法可以解决这个问题，或者即使吸进了一些 Agarose 也不要紧呢？**

解答：1、不用重悬多久，重悬起来了就可以离心了。

2、加 2X BUFFER 前大体上已经知道有多少胶粒了，吸到那个位置时小心点就是了。我也试过一些次，首先离心稍微长一点，长 20 秒吧，希望胶粒能沉得结实点（我想象的），再吸取。如果感觉枪头不是很顺畅的时候可能就是碰到胶粒了。很难一点胶粒也吸取不上来的，尽力做好就是了。

**MMM. 磷酸化抗体的检测样本制备时是否一定要加 NaF 等？**

解答：NaF 是一种广谱磷酸化酶的抑制剂，一般最好加。但是不加也可以，大部分时候是不用加的。我做的时候从未加过，都做出来了。

**NNN. Western Blot 中 block 的最短时间？**

解答：每一步 1 小时足够了，中间换抗体要洗的话多换液几次，每次时间 10 分钟就够，洗 3 次只要半小时。跑胶 1 小时，转移 1 小时，block 半小时就行，1 抗 1 小时，洗半小时，2 抗 1 小时，洗半小时，显色 10 分钟。一般跑两块胶，一块染色，一块 western。一天肯定完事，一般不用等到第二天。

**OOO. 想用 Western 检测基因转染后细胞培养上清中表达的目的蛋白( 定性 ), 分子量为 20KD , 浓度约为几百 ng/ml。蛋白样品需浓缩、纯化吗? 如何浓缩、纯化上清液中的目的蛋白? 对小分子蛋白 Western blot 时需特别注意哪些条件?**

解答 :按照你提供的浓度 ,如果做 Western Blot ,是不用浓缩样品的. 对于 20kd 的小分子的蛋白 , Western Blot 中要注意的是 :

- 1、转移时的时间 ,
- 2、转移时的电流或电压.
- 3、transfer buffer 中加 20%的甲醇.
- 4、可以用 13-15%的分离胶.

**PPP. 蛋白分子量大小分别为 21kd、28kd , 用的是湿转 , 请问多大电流 , 多长时间比较合适?**

解答 :分子量比较小 ,最好是用干转 ,湿转效率太高 ,易转过了。干转的话 ,用 2.5 A/cm<sup>2</sup> , 30min 就应该够了。湿转 , 按照 bio-rad 的说明 , 用 100mA , 也得要半个多小时吧。

**QQQ. 需要测同一种蛋白质的总量与磷酸化的量 , 但相互间干扰太大 , 怎么办?**

解答 :将膜放入 stripping buffer ( SDS 2% , Tris·Cl (PH=6.7) 62.5mM , beta-巯基乙醇 100mM ) 中 , 50°C 孵育 30 分钟 , TTBS 洗三次 , 再重新加入一抗 , 进行另一种抗原的检测。

**RRR. 做 Western Blot 实验时 , 发现转膜时的电流总是偏小 , 转膜的效率也偏低. 100V 恒压转膜时的电流只有 190mA 左右 , 而以前都有 250mA。体系和**

**条件都和以前一样，只是环境温度比以前低了很多。**

解答：有可能重复使用了转移缓冲液，随着离子的逐渐减少，电阻越来越大，当然恒压时电流越来越小了。建议更换转移缓冲液。反复使用不要超过三次。环境温度低是有利于转移的。

**SSS. 我电泳用的是恒流，一块胶，20mA，100分钟左右。转膜也是恒流，38mA，100分钟。而且我用别人的细胞和一抗在我的整个反应体系下做出来了，当然彼此的目的蛋白不同。所以，我想问题应该出在抗原和一抗上，不知对不对。一抗我买的是单抗，推荐的稀释度是1：100——1：1000。我用的是1：100。难道非要用多抗吗？按道理单抗也应该出条带呀！细胞用三去污剂裂解的，没有做定量，加巯基乙醇变性后，每孔上样20微升。提出的蛋白我保存在4度了，这样行吗？**

解答：1、建议您用恒压进行电泳，先用70V，等跑过积层胶与分离胶的界限时，换用90-100V，再跑3小时左右。2、转膜可用恒流，但要根据你的膜的面积及所要检测的蛋白的分子量的大小来确定电流的大小，一般来讲，0.8-3.0mA/CM<sup>2</sup>，分子量大的蛋白就用的电流大些，譬如，你膜的面积是30CM<sup>2</sup>，蛋白的分子量是80KD，那么你就可以以2.0mA/CM<sup>2</sup>的条件进行，你就可以60mA的电流进行。3、我觉得你的抗体应该没问题。4、你提出的蛋白怎么保存在4度呢？我们实验事都是保存在-20度的，提出蛋白分装保存在-20度。

**TTT. 目的蛋白是一种6KD的分泌性蛋白，RT - PCR就显示细胞中mRNA表达不高，估计将培养上清冻干浓缩后采用Western Blot还可能检测不出，但如果用western，是否一定要用0.2μm的膜？用Tris-tricine SDS - PAGE电泳，电泳时分别管制三层凝胶，分离胶用40%T丙稀酰胺(2.6%C)浓度为16.5%，**

**另外两层都用 30%丙稀酰胺，中间一层浓度为 10%，积层胶浓度为 4%，凝胶厚度 1mm，转膜的条件试过 30V70 分钟，膜上可见到小分子蛋白 marker 的条带，似乎见到目的条带，上样量为 60 $\mu$ g 细胞胞浆总蛋白，转膜的条件怎么样合适？**

解答：一定要用 0.2 $\mu$ m 的膜，并且转移的条件要摸索一下，小分子的 Western 不好做，要根据你的实验器材来定，一般你要是有 prestained marker 就可以参照一下，如果相应的分子量大小的 marker 转移的好就可以了。

**UUU. 怎样才能把胶跑的非常漂亮，泳道和 band 都能很直，是不是上样的量很重要，灌胶有什么技巧吗？想跑漂亮，是不是应该先小电压，再高电压，总体上电压小些会跑的好些？还有前面有人说电泳液平玻璃板会使电泳条带漂亮些？**

解答：影响跑胶跑的质量，有以下几个因素：1、电压，小的电压会使胶的分子筛效应得到充分发挥。电压越小，条带越漂亮，浓缩胶 80v，分离胶 100v 就能跑得很好。2、胶的均匀度，胶越均匀，条带越窄，分离越均匀。倒胶之前，一定要充分混匀，玻璃板一定要干净，双蒸水隔离时，一定要比较轻地加上去，避免稀释上层的分离胶，使胶不均匀。

**VVV. 为什么提高大分子量蛋白的转移的时候，小分子量蛋白会丢失一些哪？什么原因？**

解答：小分子的蛋白在转移过程中，会透过膜去，所以大分子的上去以后，有一部分小分子的就透过去了。

**WWW. 上次转染了 1.6\*10<sup>6</sup> 细胞 收集 收集到了 400 微升体积 加 6\*loading buffer，95 度煮 5 分钟，-20 度，交替 3 次，离心，上样，7%分离胶，先**

80v 跑进分离胶，在 100v [电泳](#)至溴酚兰出胶，biorad 半干转 PDVF 膜，15v 转 30 分钟，预染 marker 全部进膜，转移后的胶考马斯亮兰染，可见残留的蛋白带，大分子量多些。blot 时，封闭用 5%奶粉 TTBS 1 小时，抗体稀释液 TTBS，一抗(1:10，单抗上清，2000 年制备)1 小时，二抗(1:2000)1 小时，均在室温。结果，50kd 的小分子显色，160kd 大分子未显色。

**原因分析及准备改进：**转染大容量的质粒(融合蛋白的质粒)的效率会相对较低，大分子量表达也会相对较低，加上大分子量蛋白的转移不完全，可能是我没有拿到大分子量条带结果的原因。另外背景稍微有一些脏(背景整体均匀一致)，估计是二抗的浓度高了些，准备降至 1:5000，另外抗体稀释液准备改用 5%奶粉 TTBS，封闭改为室温 2 小时。这个过程有没有问题？

解答：首先分析你的整个实验步骤。我发现了两个比较大的毛病：

- 1、一抗用 TBST 稀释。按照我的理解，一抗最好用 5%的 TBST 脱脂牛奶稀释，和你的封闭液相一致，这样可以降低背景。
- 2、“biorad 半干转 PDVF 膜，15v 转 30 分钟”，你是这么做的吗？因为我大部分时间是做的恒流转移，用的是 0.1mA/膜，100kd--200kd 转 2 小时。到最后电压会升到 20v 左右。你用恒压法，我不是很肯定你转 30 分钟能将大分子 (160kd) 的抗原转上去。我建议你最好能将时间延长，如果是恒流，可按我的做法；如果是恒压，可摸索一下，适当延长时间。有时候你的 marker 也有可能欺骗你，因为 marker 的量比较大，是很容易转上去的，实际上目标蛋白的量远远少于 marker 量。

我对你的结果分析如下：

- 1、你的结果很好，估计离目标不远了，很快就可以成功。

2、没有 160kd 的带是因为你的转移时间过短，适当延长转移时间（我怀疑这是主要的问题）。

3、你的一抗用 1 : 10，2 抗可以降到 1 : 5000，背景会低一点。

## 10. 方法的介绍

**XXX. 我想将 hbx 转到 hepg2 细胞里 通过检测 hbx 蛋白的水平来 检验转染的效率 不知道可不可行？**

解答：Western Blot 检测 HBX 蛋白的表达来检测转染效率不是一个好办法，建议还是：

- 1、最好是带有荧光标签的 HBX 转染来看转染效率，最可靠
- 2、其次，HBX 和荧光载体共转染，相对说明问题
- 3、荧光载体单独转染，主要是看细胞好不好转了呵呵

转染效率高低荧光显微镜下一目了然了。有的细胞荧光强，有的细胞荧光弱，有的没有。所以 HBX 表达强很可能是少数细胞荧光强的结果，不代表转染效率。

**YYY. 半干法转移与胶的面积和蛋白分子两大小好像都有关系，那么湿法转移是不是所有的转移条件都一样呢？一般的条件是怎样的？**

解答：半干转的电流大小是按照面积来算的，时间是根据蛋白分子大小定的；而湿转的话电流是恒定的，时间也是根据分子量而定。

**ZZZ. 转膜时何为湿法，何为半干法？**

解答：半干法和湿法转移是两种不同的转移装置下的转移系统，将膜，胶，滤纸整个浸泡在 buffer 的 Tank 里转移的，叫湿法；用滤纸吸 buffer 来做转移体系的叫半干法。

**AAAA. 为什么浓缩胶和分离胶的电压不一致？同样的电压可以吗？**

解答：浓缩胶的目的使得 loading 的样品能够在同一条水平线上进入分离胶，如果电压太大前端的蛋白容易在后面的蛋白赶上来前进入分离胶。而在分离是理论上（实际上也是）小电压长时间分离的效果会更好，但是在操作过程中没有必要等那么长的时间，所以就用大电压快点跑。

**BBBB. 如果目的蛋白比较小，21 和 38kd，转膜时（Biorad 的湿转仪）时间是否能缩短些？100 伏电压，甲醇的量是否也可以相应增加？**

解答：如果是小蛋白可以用小电压 28V - 36V，4 - 6hours，（4 度）。甲醇 10% - 20% 就可以了。

**DDDD. 显色目的条带又细又浅 靶蛋白是 27KD 的 bcl-xl 和 67KD 的 c-myc，应该是高表达。每个涌道上 50-70 $\mu$ g 蛋白，开始用半干转移，后来用湿转 14v，16h，用 PVDF 膜转移。胶转移后染色检测，发现小分子量的基本转移走了，可是为什么条带老是不粗不浓呢？**

解答：可能跟你的一抗有关系，还有应该高表达，那实际做的阳性对照是否是高表达；还有跟抗原量相关，你多上点蛋白会好的多；跟显色条件相关。

**EEEE. 背景很花，当然条带也很淡，如果我在显影液中多洗一会儿，背景就很深，以致无法辨认，但有时条带又很明显，背底很淡。**

解答：这跟你 washing 的时间和强度有关，很可能你在这方面没有掌握好。显影时间是有范围的，久了肯定不行。

**FFFF. 纯化过的目的带包括其上下都出现了色带，而且对照菌也出现了条带，会是什么原因？**

解答：一抗有问题，效价太低，且未纯化；表达量太低；提蛋白时可能出了问题。

**GGGG. 做 Western Blot 的检测的时候，用 DAB 显色还能看出条带，但是换成 ECL 的时候什么样结果都没有。我用的 NOVA 公司的发光底物，胶片是普通的 X 片，定影液和显影液都是别人留下来的，不知道是什么原因？**

解答：一般的说，Ecl 比 DAB 更灵敏，但是 DAB 是 HRP 最敏感的底物，所以有几种可能：

ECL 底物失活了，你可以检测一下；敏感度正好不到 ECL 底物的范围。DAB 能显色可不能催化 ECL 底物；显影液没用了。

**HHHH. 怎样分析结果，需要什么软件？**

解答 如果你做定量或半定量，至少要用到一个光密度扫描分析软件，如果不是，直接分析就可以了。

**IIII. 积层胶、分离胶一般多少左右合适？**

解答：一般电泳是积层胶 60-80v，分离胶 100v。

**JJJJ. 采用生物素标记的二抗 - SABC-DAB 检测系统做 western，非特异性的条带和背景高？总蛋白考染的时候发现接近积层胶的条带比较清楚，条带也很窄，可是越靠下面的条带越来越宽，有的跑得都连在一起了，这是什么原因，如何解决？sds - page 的时候恒压和恒流哪个好？**

解答：非特异性的条带和背景高：可能性太多了，一抗，二抗，封闭的原因都可

能。

总蛋白考染的时候发现接近积层胶的条带比较清楚，条带也很窄，可是越靠下面的条带越来越宽，有的跑得都连在一起了，这是什么原因，如何解决？正常的，另外，是否是你的积层胶有问题。sds - page 的时候，恒压和恒流都可以用。

**KKKK. 血清样品进行 Western Blot 分析 ,目的蛋白 21kD ,结果显色出来后 ,目的条带很淡 , 而白蛋白和 IgG 条带很浓 ?**

解答：可能是因为白蛋白为 67kD 和目的蛋白相差教大，且他的浓度较低，你可以以底物二氨基联苯胺和 0.01%过氧化氢溶液显色的时间延长为 30 分钟，再用去离子水漂洗以终止反应;也可能是抗体的特异性不好。把封闭的时间延长，同时提高封闭液的浓度，可以减少以下背景噪音。同时洗的时候要彻底，而目的条带弱，说明浓度不足，如果不考虑后续功能的话，你可以过 G-50( 细 ) 柱子，纯化你的靶蛋白，接着真空冷冻浓缩，可以得到很漂亮的结果。

**LLLL. Western 转膜已经成功了，但是 Marker 泳道未见蛋白条带（正常应该有 6 条），其余各泳道均有清晰的蛋白条带，经考马斯亮蓝染胶，结果相同。经 5%的脱脂牛奶封闭 1 小时 45 分钟后，进行一抗孵育（1：200，建议起始浓度）过夜，二抗孵育 5 个半小时（1：2000），均在室温下，DAB 显色，虽出现蛋白条带，但较弱，且出现非特异性条带。请问：1、Marker 是 MBI 公司的，可分离 14-116KD 的蛋白，买了大概有一年的时间，是否有问题？2、一抗（为多克隆抗体）、二抗的浓度及孵育的时间是否合适？**

**3、封闭的时间是否太短？**

解答：1. marker 有可能被降解了，也有可能是它标称的上样量太少，不够，

我做过一个标称每次 5ul 可我上了 20ul 才行的。

2.建议，一抗 4 度过夜也很好，建议 1:100，室温 2hrs 就够了，

3. 二抗室温 1 小时，1:2000，我喜欢 4 度封闭过夜（室温 2hr 就够了），1 抗室温 1hr，2 抗室温 1hr，最好是一抗 4 度过夜（或室温 2 小时）1:200，2 抗室温 1 小时 1:2000，换 ECL 法。