

Western blot 详细操作步骤

一个基因表达终极结果是产生相应的蛋白质（或酶）。因此检测蛋白质是测定基因表达的主要标志，检测蛋白质的方法很多，除 ELISA 法外，也可用与检测 DNA 和 RNA 相类似的吸印方法。前两法有“南”和“北”之意，故本法遂被延伸称为 Western（西）印迹法，该法能用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分辨出与专一抗血清结合的专一性蛋白质。将聚丙烯酰胺凝胶上分辨出的蛋白质转移到硝酸纤维素膜上并与第一抗体共孵。第一抗体专一地与待分离蛋白质的抗原决定簇结合，然后用另一种蛋白质，如 ^{125}I -蛋白 A 或辣根过氧化物酶连接的山羊抗 IgG 检测已结合上去的抗体。本法所需时间 6 小时或过夜。

（一）蛋白质的聚丙烯酰胺凝胶电泳

几乎所有蛋白质电泳分析都在聚丙烯酰胺凝胶上进行，而所用条件总要确保蛋白质解离成单个多肽亚基并尽可能减少其相互间的聚集。最常用的方法是将强阴离子去污剂 SDS 与某一还原剂并用，并通过加热使蛋白质解离后再加样于电泳凝胶上。变性的多肽与 SDS 结合并因此而带负电荷，由于多肽结合 SDS 的量几乎总是与多肽的分子量成正比而与其序列无关，因此 SDS 多肽复合物在聚丙烯酰胺凝胶电泳中的迁移只与多肽的大小相关。在达到饱和的状态下，每克多肽约可结合 1.4 克去污剂，借助已知分子量的标准参照物，则可测算出多肽链的分子量。

SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳大多在不连续缓冲系统中进行，其电泳槽缓冲液的 pH 值与离子强度不同于配胶缓冲液，当两电极间接通电流后，凝胶中形成移动界面，并带动加入凝胶的样品中所含的 SDS 多肽复合物向前推进。样品通过高度多孔性的积层胶后，复合物在分离胶表面聚集成一条很薄的区带（或称积层）。由于不连续缓冲系统具有把样品中的复合物全部浓缩于极小体积的能力，故大大提高了 SDS 聚丙烯酰胺凝胶的分辨率。

最广泛使用的不连续缓冲系统最早是由 Ornstein(1964)和 Davis(1964)设计的, 样品和积层胶中含 Tris-Cl(pH6.8), 上下槽缓冲液含 Tris-甘氨酸(pH8.3), 分离胶中含 Tris-Cl(pH8.8)的。系统中所有组分都含有 0.1%的 SDS(Laemmli,1970), 样品和积层胶中的氯离子形成移动界面的先导边界而甘氨酸分子则组成尾随边界, 在移动界面的两边界之间是一电导较低而电位梯度较陡的区域, 它推动样品中的多肽前移并在分离胶前沿积聚, 此处 pH 值较高, 有利于甘氨酸的离子化, 所形成的甘氨酸离子穿过堆集的多肽并紧随氯离子之后, 沿分离胶泳动。从移动界面中解脱后, SDS 多肽复合物成一电位和 pH 值均匀的区域泳动穿过分离胶, 并被筛分而依各自的大小得到分离。

【材料】

分离胶及积层胶溶液

水饱和异丁醇

1×Tris · Cl/SDS,pH8.8

蛋白质分子量标准混合物

1×SDS 电泳缓冲液

电泳装置及夹子、玻璃板、灌胶支架、缓冲液槽等附件

0.75mm 封边垫片

0.75mm 样品梳子

50μl 微量进样器

恒流电源

【常用试剂】

1) 30%丙烯酰胺/0.8% N,N' -亚甲丙烯酰胺

将 30 克丙烯酰胺和 0.8 克 N,N' -亚甲丙烯酰胺溶于总体积为 60ml 的水中，加热至 37°C 溶解之，补加水至终体积为 100ml。0.45μm 微孔滤膜过滤除菌，查证该溶液 pH 应不大于 7.0，置棕色瓶中保存。

小心：丙烯酰胺具有很强的神经毒性并可通过皮肤吸收，其作用具有累积性。称量丙烯酰胺和 N,N' -亚甲丙烯酰胺时应戴手套和面具。可认为聚丙烯酰胺无毒，但也应谨慎操作，因为它还可能含有少量未聚合材料。

2) 4×Tris · Cl/SDS,pH8.8,

在 300mlH₂O 中溶解 91g Tris 碱(1.5mol/L), 用 1mol/L 调节 pH 至 8.8,补加 H₂O 至体积 500ml。用 0.45μm 滤膜过滤溶液，再加入 2g SDS[0.4%(w/v)], 于 4°C 可保存 1 月。

3) 4×Tris · Cl/SDS,pH6.8,

在 40mlH₂O 中溶解 6.05g Tris 碱(0.5mol/L), 用 1mol/L 调节 pH 至 6.8,补加 H₂O 至体积 100ml。用 0.45μm 滤膜过滤溶液，再加入 0.4g SDS[0.4%(w/v)], 于 4°C 可保存 1 月。

4) 4×SDS 电泳缓冲液

Tris base 24.2 g

Glycerin 115.3 g

20%SDS 20 ml

加水至总体积 1000ml。

应用时稀释 4 倍即为 1×SDS 电泳缓冲液(Tris 0.05M,Glycerin 0.38M,SDS 0.1%)。

5) TEMED (N,N,N' ,N' -四甲基乙二胺)

TEMED 通过催化过硫酸铵形成自由基而加速丙烯酰胺和 N,N' -亚甲丙烯酰胺的聚合。

6) 10%过硫酸铵

过硫酸铵提供驱动丙烯酰胺和亚甲丙烯酰胺聚合所必需的自由基。可用去离子水配制小量 10%(w/v)的贮存液并保存于 4°C。由于过硫酸铵会缓慢分解，故应隔周新鲜配制。

【步骤】

- 1) 按厂商的使用指南用两块干净的玻璃，平板和 0.75mm 垫片组装电泳装置中的玻璃平板夹层，并固定在灌胶支架上。
- 2) 按表 7.1 配制分离胶液体并脱气，然后加入 10%的过硫酸铵和 TEMED，轻轻搅拌混匀。

聚丙烯酰胺分离胶的配制

试剂成分 配制不同浓度分离胶所需试剂(ml)

5% 8% 10% 12% 15%

Acry:Bis (30:0.8) 2.50 4.00 5.00 6.00 7.50

4×Tris · Cl/SDS,pH8.8 3.75 3.75 3.75 3.75 3.75

H₂O 8.75 7.25 6.25 5.25 3.75

10%过硫酸铵 0.05 0.05 0.05 0.05 0.05

TEMED 0.01 0.01 0.01 0.01 0.01

按所需分离的蛋白质分子大小选择合适的丙烯酰胺百分比浓度，一般地，5%的凝胶可用于 60 ~ 200kDa 的 SDS 变性蛋白质分子的分离，10%用于 16 ~ 70kDa，15%用于 12 ~ 45kDa。

- 3) 用一根巴斯德吸管立即将分离胶液体沿夹层中一条垫片的边缘加入于玻璃平板夹层中，至凝胶约 5cm 高为止。样品体积少于 10μl 不需灌制积层胶。

4) 用另一根已斯德吸管, 先从一边的垫片, 再从另一边垫片往夹层的液面顶部缓缓加入一层水饱和异丁醇 (厚约 1cm)。让凝胶在室温聚合 30min。

聚合后, 可见在顶层异丁醇与凝胶的界面间有一清晰的折光线, 胶的聚合失败往往问题在于过硫酸铵或 TEMED, 或两者都有。

5) 倾去顶层的异丁醇, 并以 $1\times$ Tris-Cl/SDS, pH8.8 缓冲液冲洗凝胶的顶部表面, 尽量用吸水纸吸干。

6) 按表 7.2 配制积层胶液体, 用吸管将液体沿一条垫片加入到玻璃平板夹层, 直至夹层的顶部。

聚丙烯酰胺积层胶的配制

GEL% (3.9%) Total (10.05ml)

Acry:Bis(30:0.8) 1.30 ml

$4\times$ Tris · Cl/SDS, pH6.8 2.50 ml

H₂O 6.10 ml

10%过硫酸铵 0.05 ml

TEMED 0.01 ml

7) 将 0.75mm 厚的梳子插入夹层的积层胶液体中, 必要时, 再补加积层胶液体充盈剩余空间。让积层胶室温聚合 30min。

8) 在具螺口盖的微量离心管中, 用 $2\times$ SDS 加样缓冲液按 1:1 (v/v) 稀释待测蛋白质样品, 于 100°C 煮沸 5-10min。如样品是蛋白质沉淀物, 加入 50 ~ 100 μ l $1\times$ SDS 加样缓冲液溶解之, 并同样在 100°C 煮沸 5-10min。按供应商的使用指南用 $2\times$ SDS 加样缓冲液溶解蛋白质分子量标准混合物。

对于 0.3cm 宽的加样孔，推荐加样体积以不超过 20 μ l 为宜。用考马斯亮蓝染色法显迹，成分很复杂的蛋白质混合物需加 25 ~ 50 μ g，而样品中只有一种或不多的几种蛋白的话，只需 1 ~ 10 μ g 蛋白量。采用银染显迹时，样品用量可减小 10 ~ 100 倍（按样品的复杂程度在小于 20 μ l 的体积溶有 0.01 ~ 0.5ng 蛋白样品不等）。

2 \times SDS 加样缓冲液(loading buffer)配制：

成分 体积(ml)

0.5M Tris · Cl (pH6.8) 12.5

20%SDS 11.5

Glycerin 10

2% Blue-Bromo-phenol 2.5

β -mercaptoethanol * 5.0

加 H₂O 至总体积 50 ml，分装

* β -mercaptoethanol 在临用前加入。

9) 小心拔出梳子，避免撕裂聚丙烯酰胺凝胶加样孔。取出梳子后，以 1 \times SDS 电泳电泳缓冲液冲洗加样孔，并以此缓冲液充满之。

10) 按厂商指南将凝胶板固定到电泳装置的上缓冲液室（上槽），同时往下缓冲液室（下槽）加入推荐量的 1 \times SDS 电泳缓冲液。

11) 将固定于上槽的凝胶板放入下槽中，并往上槽加入部分电泳缓冲液至刚好淹没凝胶的加样孔。

12) 用带平嘴针头的 50 μ l 注射器将同样浓度的蛋白质样品等体积加入到样品孔中，小心加样使样品在孔的底部成一薄层，对照孔加入蛋白质分子量标准样品，如有空置的加样孔，须加等体积的空白 1 \times SDS 样品缓冲液，以防相邻泳道样品的扩散。

13)再往上槽加入余下的 1×SDS 电泳缓冲液。此操作缓慢小心，以防冲起样品孔中的样品。

14) 连接电源，对于 0.75mm 厚的垂直板电泳，先在 60V 下电泳至溴酚蓝染料从积层胶进入分离胶，再将电压调至 120V 继续电泳至溴酚蓝到达凝胶底部为止。

15) 关闭电源并撤去连接的导线，弃去电泳缓冲液。连同上槽一起将凝胶夹层取出。

16) 将凝胶定位以便识别加样的顺序，将凝胶板从上槽解离出来，放在一叠吸水纸或纸巾上。

17) 小心将封边的垫片抽出一半，并以此为杠杆撬起上面的玻璃平板，使凝胶暴露出来。

18) 小心从下面的玻璃平板上移出凝胶，在凝胶的一角切去一小块以便在染色及干胶后仍能认出加样次序，接着就可进行蛋白质的检测。

(二)蛋白质从 SDS 聚丙烯酰胺凝胶转移至固相支持体

目前进行的 Western 印迹反应大多还是从凝胶上直接把蛋白质电转移至硝酸纤维素滤膜之上。把凝胶的一面与硝酸纤维素滤膜相接触，然后将凝胶及与之相贴的滤膜夹于滤纸、两张多孔垫料以及两块塑料板之间。把整个结合体浸泡于配备有标准铂电极并装有 pH8.3 的 Tris-甘氨酸缓冲液的电泳槽中，使硝酸纤维素滤膜靠近阳极一侧，然后接通电流约 0.5 小时。在此期间，蛋白质从凝胶中向阳极迁移而结合于硝酸纤维素滤膜上。为了防止过热并因而导致在夹层中形成气泡，转移过程应在冷室中进行。

【步骤】

1) 当 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳行将结束时，用蒸馏水淋洗电极板，然后用不被吸收的纸巾揩干电极板上粘附的液滴。

2) 戴上手套，切 6 张滤纸和 1 张硝酸纤维素滤膜，其大小都应和凝胶大小完全吻合。

如果滤纸或滤膜面积大于凝胶，滤纸和滤膜伸出的边缘就大有机会相接触，造成电流短路而使蛋白质不能从凝胶向滤膜转移。用铅笔在滤膜一角作好标记。拿取凝胶、滤纸和硝酸纤维素滤膜时必须戴手套。因为皮肤上的油脂和分泌物会阻止蛋白质从凝胶向滤膜转移。

3) 把硝酸纤维素滤膜漂浮于一盘去离子水的水面上，借毛细作用使之从下往上湿润后，将之浸没于水中，浸泡 5 分钟以上以驱除留于滤膜上的气泡。

4) 在一浅托盘中加入少量转移缓冲液，把 6 张滤纸浸泡于其中。

转移缓冲液

190 mmol/L 甘氨酸

25 mmol/L Tris 碱

20% 甲醇

配制 1L 转移缓冲液，需称取 14.4g 甘氨酸、3g Tris 碱，并加入 200ml 甲醇，加水至总量为 1L。

5) 戴上手套按如下方法安装转移装置：

a. 平放底部电极（阴极），放一张海绵垫片。

b. 在海绵垫片上放置 3 张用转移缓冲液浸泡过的滤纸，逐张叠放，精确对齐，然后用一玻璃移液管作滚筒以挤出所有气泡。

d. 从电泳槽上撤出放置 SDS 聚丙烯酰胺凝胶的玻璃，把凝胶转移到一盘去离子水中略为漂洗一下，然后准确平放于硝酸纤维素滤膜上。把凝胶左下角置于硝酸纤维素滤膜的标记角上，戴手套排除所有气泡。切记：为避免发生短路，不要切去凝胶的左下角。

c. 把硝酸纤维素滤膜放在聚丙烯酰胺凝胶上，要保证精确对齐，而且在硝酸纤维素滤膜与聚丙烯酰胺凝胶之间并不留有气泡。

e.把最后 3 张 3 滤纸放在硝酸纤维素滤膜上方，同样须确保层精确对齐并不留气泡。

6) 将靠上方的电极（阳极）放于夹层物上，连接电源。根据凝胶面积按 300mA 接通电流，电转移 0.5-1.0 小时。

7) 断开电源并拔下槽上插头，从上到下拆卸转移装置，逐一掀去各层。将凝胶转移至盛有考马斯亮蓝染液的托盘中，进行染色，以便检查蛋白质转移是否完全。

8) 可做可不做：取出硝酸纤维素滤膜置于一张干净的滤纸上，于室温干燥 30 - 60 分钟，使硝酸纤维素滤膜干燥，据称可以改善滤膜在随后的处理中保留蛋白质的能力；但是，这也可能导致蛋白质进一步变性并因此改变其免疫反应性，所以干燥滤膜对某些蛋白质/抗体组合来说可能是优点，但对另一些组合则可能是缺点，此一时而彼一时，只能针对具体靶蛋白根据实验来决定。

9) 切去滤膜的左下角，以免铅笔标记被抹去。

(三)对固定于硝酸纤维素滤膜上的蛋白质进行染色

可供对固定于硝酸纤维素滤膜上的蛋白质进行染色的方法有多种，但仅有丽春红 S 染色法可与所有免疫学检测方法兼容，这是因为该染料只会短暂显色而且在进行 Western 印迹时可被洗去。因此，丽春红 S 染色并不影响随后用于检测抗原的显色反应，这些显色反应是由已偶联抗体的碱性磷酸酶或乳过氧化物酶等催化的。然而，由于其显示的紫红色不容易拍摄下来，这种染色不能提供永久性实验记录，而只能提供蛋白质转移情况的直观证据并对蛋白质分子量标准参照物进行定位，标准蛋白在硝酸纤维素滤膜上的位置可用铅笔或不褪色的墨水标记下来。

【步骤】

1) 如果硝酸纤维素滤膜已干，则把它漂浮于一盘去离子水的水面上，通过毛细作用使滤膜自下而上湿润。然后把滤膜浸泡于水中，浸泡 5 分钟以上以驱除留于其上的气泡。

2) 把滤膜转移到含有丽春红 S 使用液的托盘中染色 5-10 分钟，其间轻轻摇动染液。

混合下列成分，配成丽春红 S 贮存液(10×)：

丽春红 S 2g

三氯乙酸 30g

磺基水杨酸 30g

加水至 100ml

用 1 份上述贮存液加 9 份去离子水即成丽春红 S 使用液，使用后应予废弃。

3) 蛋白带出现后，于室温用去离子水漂洗硝酸纤维素滤膜，其间换水数次。

4) 用防水性印度墨汁标出作为分子量标准的参照蛋白的位置。

(四)封闭硝酸纤维素滤膜的免疫球蛋白结合位点

正如从 SDS 聚丙烯酰胺凝胶转移出来的蛋白质可以与硝酸纤维素滤膜结合一样，免疫学检测试剂中的蛋白同样也能与之结合。Western 印迹法的灵敏度取决于封闭可能结合非相关蛋白的位点以降低这类非特异性结合背景的效果。现已设计的封闭液有多种，其中脱脂奶粉最为价廉物美，既使用方便又可与通常使用的所有免疫学检测系统兼容。只有一种情况，也就是当牛奶中可能含有要用 Western 印迹法检测的蛋白质时，不能使用脱脂奶粉作为封闭剂。

【步骤】

1) 把硝酸纤维素滤膜放入可以加热封接的塑料袋中，根据滤膜面积以 $0.1\text{ml}/\text{cm}^2$ 的量加入封闭液，尽可能排除里面的气泡，然后密闭袋口，平放在平缓摇动的摇床平台上于室温温育 1 小时。

封闭液

0.25%(w/v)卡塞因(Caesin)

0.01%叠氮钠（小心：叠氮钠有毒，使用时应戴手套谨慎操作，含有叠氮钠的溶液应标记清楚。）

溶于 pH7.4 的 PBS 中。

如果免疫探针的非特异结合背景仍然太高以致难以接受，可加入 Tween-20 至终浓度为 0.02%。在大多数情况下，加入这种去污剂不至影响抗体与靶抗原的特异性结合。

2) 剪开塑料袋，弃去封闭液，立即加入抗靶蛋白抗体溶液与滤膜一同温育。

(五)抗体和靶蛋白的结合

实际上，Western 印迹膜的检测分两步进行：首先靶蛋白特异性的非标记抗体在封闭液中先与硝酸纤维素滤膜一同温育。经洗涤后，再将滤膜与二级试剂—放射性标记的或与辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶偶联的抗免疫球蛋白抗体或 A 蛋白一同温育。进一步洗涤后；通过放射自显影或原位酶反应来确定抗原-抗体-抗体或抗原-抗体-A 蛋白复合物在硝酸纤维素滤膜上的位置。

间接法即两步检测法的主要优点是使用单个二级试剂则可测定多种多样的第一抗体，从而免却了逐一纯化并标记各种第一抗体之累。因为向厂商购置的二级免疫试剂，价格颇为低廉，所以可大大节约时间和金钱。

1. 用抗靶蛋白的第一抗体与硝酸纤维素滤膜共温育的方法

1) 在装有用上页所述方法处理过的硝酸纤维素滤膜的塑料袋中，按每平方厘米 0.1ml 的量加入封闭液和适量的第一抗体。

应进行预实验并按实际情况确定第一抗体的加量，推荐使用以下稀释度：

a.多克隆抗体：1:100 - 1:5000。

b.杂交瘤细胞培养上清液：不稀释— 1:100。

c.杂交瘤小鼠的腹水：1:1000-1:10,000。

2) 尽可能排除藏匿的气泡后密封袋口, 将滤膜平放在缓慢摇动的摇床平台上, 于 37°C 温育 1~2 小时。

3) 剪开塑料袋, 废弃封闭液和抗体, 用 25ml PBS 漂洗滤膜 3 次, 每次 10 分钟。

4) 按下面介绍的方法, 立即用二级免疫试剂与滤膜一同温育。

2. 用二级免疫试剂与硝酸纤维素膜温育的方法

二级试剂 (通常是抗免疫球蛋白抗体或 A 蛋白) 可用 ^{125}I 进行放射性标记, 也可与辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶共价偶联。与酶共价偶联的免疫球蛋白和 A 蛋白均有商品出售。

(1) 酶联二级试剂

1) 经 PBS 最后一次洗涤后, 把硝酸纤维素滤膜转移到装有 PBS 溶液的托盘中, 于室温缓慢摇动温育 10 分钟。切记在加入酶联第二试剂之前须清除滤膜上的叠氮钠。

2) 把滤膜转移至一个可以加热封接的塑料袋, 按滤膜面积加入 $0.1\text{ml}/\text{cm}^2$ 无叠氮钠的封闭液。

3) 根据厂家说明书加入酶联二级试剂, 如果使用塑料袋则应予封口。二级试剂的稀释度一般推荐用 1:200 - 1:2000。

4) 于 37°C 缓慢摇动、将滤膜与酶联二级试剂一同温育 1 小时。

5) 把滤膜转移至 PBS 溶液。于室温缓慢摆动, 温育 10 分钟。重复 3 次, 每次更换新的 PBS 溶液。

6) 按下文介绍的方法加入合适的生色底物。

3. 酶联抗体生色底物的使用

(1) 碱性磷酸酶经免疫反应固定的碱性磷酸酶可催化底物 5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸/氮蓝四唑 (BCIP/NBT) 在原位转变为深蓝色化合物。

1) 配制下列 3 种溶液:

NBT 在 10 ml 70%的二甲基甲酰胺中溶解 0.5g NBT。

BCIP 在 10 ml 100%的二甲基甲酰胺中溶解 0.5BCIP。

碱性磷酸酶缓冲液

100 mmol/L NaCl

5 mmol/L MgCl₂

100 mmol/L Tris-Cl (pH9.5)

放在密闭容器中保存于室温，这一溶液是稳定的。

2) 取 66μl NBT 溶液与 10 ml 碱性磷酸酶缓冲液混匀，加入 33μl BCIP 溶液。这一生色底物混合液应在 30 分钟内使用。

3) 把经洗涤的硝酸纤维素滤膜[本页页首步骤 5]转移至一浅托盘上，按滤膜面积加入 0.1ml/cm² 的生色底物混合物，于室温平缓摇动进行温育。

4) 细心观察反应过程，一俟蛋白带的颜色深度达到要求（约 20 分钟），则把滤膜移到另一托盘中，内装有 200μl 0.5mol/L EDTA (pH8.0) 和 50ml PBS。

5) 拍摄滤膜照片留作永久实验记录。

(2)辣根过氧化物酶免疫偶联的辣根过氧化物酶最敏感的底物是 3,3'-二氨基联苯胺，它在过氧化物酶所在部位转变成棕色沉淀。在钴或镍离子存在下进行反应可以加深沉淀的颜色并提高反应的灵敏度。但是，使用辣根过氧化物酶不可能完全排除背景颜色，因此须十分小心地观察生色反应，一俟特异性染色蛋白带清晰可见，就应尽快终止生色反应。

1) 在 9ml 的 0.01 mol/L Tris-Cl (pH7.6) 溶液中溶解 6mg 的二氨基联苯胺（临用前配制）。

2) 用滤纸过滤底物溶液以去除可能形成的沉淀物。

3) 加入 10 μ l 30% H_2O_2 , 混匀后立即使用。得到的 30% H_2O_2 溶液, 应保存于密闭的棕色瓶中, 数周后应予废弃。

4) 把经漂洗的硝酸纤维素滤膜移至一浅托盘上, 按滤膜面积加入 0.1 ml/ cm^2 的底物溶液, 于室温轻轻摇动温育之。

5) 细心观察反应过程, 一俟蛋白带的颜色深度达到要求 (约 1-3 分钟) , 即用水略为漂洗, 然后把滤膜转移到 PBS 中。

6) 拍摄滤膜照片, 留作永久实验记录。过氧他物酶染色的蛋白带经日光照射数小时后将褪去颜色。