

HUABIO

Antibody | Protein | ELISA Kit | Service

杭州华安生物技术有限公司

☎ 0571-88062880 🖨 0571-88060400

✉ sales@huabio.cn 🌐 www.huabio.cn

📍 杭州市钱塘区白杨街道6号大街452号高科技企业
孵化园区2号楼16层



 华安生物
H U A B I O

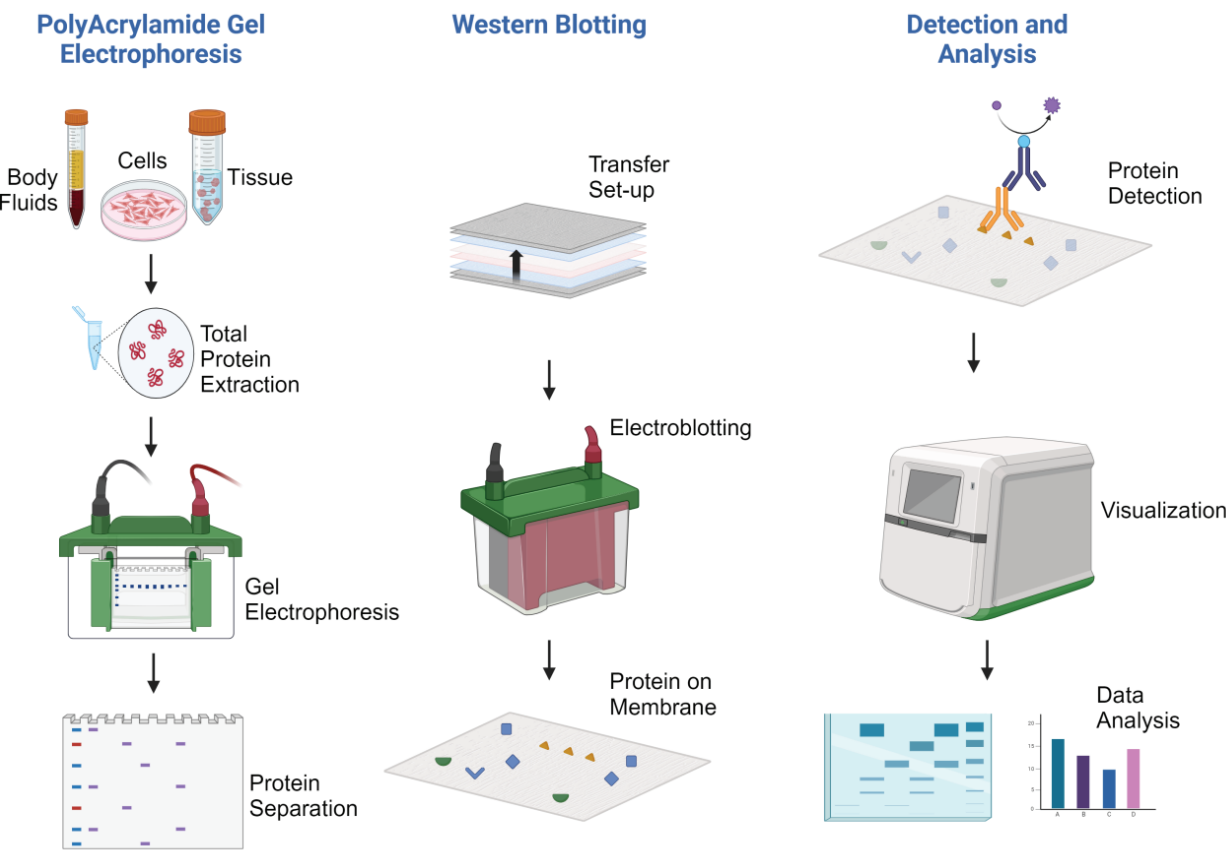
蛋白质印迹 Western Blot

让研究变得简单



前言

蛋白质印迹 (Western blot, WB) 又称免疫印迹 (Immunoblotting)，是一种用于从复杂的蛋白质混合物中识别特定蛋白质的技术。通过 SDS-PAGE 电泳分离蛋白质样品，利用电场作用将蛋白转移至固相载体（如 PVDF 膜或硝酸纤维素膜），再通过抗原-抗体特异性结合及标记二抗显色检测目标蛋白。



| 目录

CONTENTS

01	溶液与试剂	01-02
	裂解缓冲液	01-02
	电泳、转膜及封闭缓冲液	02
02	实验操作流程	03-06
	样本制备	03-04
	SDS-PAGE电泳	04
	转印（以湿转为例）	05
	抗体孵育	06
03	常见问题及解决方案	07-16

裂解缓冲液

在开始细胞或组织裂解前，先明确目的蛋白的亚细胞定位，这样可以帮助快速确定合适的裂解液。

裂解液组分

常见裂解液由缓冲体系、盐离子、离液剂、蛋白酶抑制剂和还原剂组成，其中离液剂决定了裂解液的裂解能力，也是整个裂解液中最核心的部分。

裂解液的种类

裂解液的种类主要是通过离液剂的种类及含量来划分，不同的离液剂的种类及含量也决定此款裂解液的裂解效果。以下为几种常见裂解液：

- **SDS裂解液**：裂解强度很强的裂解液。有效成分为1%SDS，高浓度的SDS能破坏蛋白质的空间结构，同时通过与蛋白质之间形成大量氢键实现助溶，裂解时间短，对于裂解困难或容易降解的样品能够起到非常好的效果。但是只推荐用于WB实验。
- **RIPA裂解液**：分为强、中、弱三种。RIPA能维持蛋白质的天然活性，应用范围更加广泛，WB、IP、Co-IP、ELISA等实验均适合。
- **Co-IP裂解液**：是非常温和的裂解液，不仅能够保持目的蛋白质的天然活性，还能保持目的蛋白质复合物不受影响。

裂解液名称	通用配方
Tris-HCl	20mM Tris-HCl, pH 7.5, 蛋白酶抑制剂。
Tris-Triton	10mM Tris pH 7.4, 100mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1% Triton X-100, 10% 甘油, 0.1% SDS, 0.5% 去氧胆酸钠, 蛋白酶抑制剂。
NP-40	150mM NaCl, 1% NP-40 (或Triton X-100), 50mM Tris pH 8.0, 蛋白酶抑制剂。
RIPA	50mM Tris pH 7.4, 150mM NaCl, 1.0% NP-40 (或Triton X-100), 0.5% 去氧胆酸钠, 0.1% SDS, 蛋白酶抑制剂。
SDS裂解液	1% SDS, 50mM Tris, 10mM EDTA, pH8.0, 蛋白酶抑制剂。

*以上缓冲液在 4℃ 下可保存数周，也可分装后在 -20 ℃ 下保存长达1年。

细胞培养裂解液的制备

- 1) 将细胞培养皿放置冰上并用冰预冷的1xPBS洗涤细胞。
- 2) 吸出PBS，然后加入冰预冷的裂解缓冲液。
- 参考：每10⁷个细胞或100mm培养皿或T150培养瓶加1mL；每5x10⁶个细胞或60mm培养皿或T75培养瓶加0.5mL。
- 3) 用冰预冷的细胞刮刀将贴壁细胞从培养皿上刮下，然后将细胞悬液转移到冰预冷的EP管中。或者，用胰蛋白酶消化细胞并用PBS洗涤细胞，然后将细胞重悬浮于含裂解液的EP管中。
- 4) 4℃持续震荡（或旋转）30-60分钟；超声破碎至溶液澄清。
- 注：提取蛋白时，特别是核蛋白，为获取更多的组分，推荐超声裂解。
- 5) 4℃，12,000 rpm离心10-20分钟。
- 6) 取出EP管放置在冰上。将上清液转移至新的冰预冷的EP管中，准备后续测浓度。

组织裂解液的制备

组织蛋白提取相对较复杂，首先应设法除去血液、脂肪等非目标组织。在制备脾脏、心脏和胎盘等富含血液的组织时，尤其要洗净血液，防止后续因内源IgG产生干扰。对小鼠等实验动物心脏用生理盐水等进行灌流操作，直至肝脏和四肢颜色发白。

- 1) 用消毒后的干净器械解剖目标组织，最好在冰上，以防蛋白酶降解（最好30分钟内完成）。

注：灌注生理盐水后取材，避免血液污染样本；取材尽量去除非目标组织，避免干扰检测结果；脂肪含量较高的组织（白色/棕色脂肪组织、脂肪肝、结缔组织等）推荐使用脱脂过滤柱滤除液态脂滴。

- 2) 将组织放入圆底EP管中，浸入液氮中进行速冻。然后将样本置于-80℃储存备用。

- 3) 精确称取20-100mg组织，用眼科剪将组织剪成<1mm³碎块。

- 4) 组织破碎

- 液氮研磨：将组织碎块放入研钵，倒入液氮快速研磨至粉末状，加入适当裂解液。

参考：10mg组织可加入1mL裂解液。

- 机械匀浆：加入裂解液后放入研磨管，加入钢珠，组织匀浆机震荡。

注：如果无组织匀浆机，还可以用超声破碎的方式至溶液澄清即可（避免产热）。

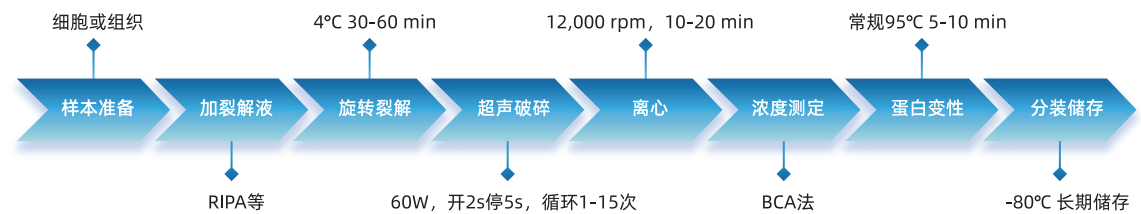
- 5) 4℃，12,000 rpm离心15-20分钟。

- 6) 取出EP管放置在冰上。将上清液转移至新的冰预冷的EP管中，准备后续测浓度。

电泳、转膜及封闭缓冲液

名称	配方
4xSDS Sample Loading Buffer	200mM Tris-cl pH6.8, 8% SDS, 400mM DTT, 6mM溴酚蓝, 32% 甘油。-20℃分装保存。
1x蛋白缓冲液（Tris-甘氨酸）	25mM Tris, 192mM甘氨酸, 0.1% SDS, pH8.3。0.22uM滤膜过滤后，室温保存。
1x电转缓冲液（湿转）	25mM Tris, 192mM甘氨酸, pH8.3, 20% 甲醇。0.22uM滤膜过滤后，4℃保存。
1x电转缓冲液（半干转）	48mM Tris, 39mM甘氨酸, 0.04% SDS, 20% 甲醇。0.22uM滤膜过滤后，4℃保存。
1xTBST缓冲液	20mM Tris, 150mM氯化钠, pH7.4, 0.1% Tween 20。0.22uM滤膜过滤后，室温保存。
封闭缓冲液	3-5% 脱脂牛奶或BSA，加入1xTBST缓冲液，充分混匀后过滤。
一抗稀释液	含5% BSA或5% 脱脂奶粉的1xTBST；或商品化一抗稀释液。

样本制备



蛋白样本制备流程

蛋白提取完成后，可以用BCA法或Bradford法测定浓度，以确保上样量稳定可控。不同蛋白测量方法的优缺点及原理参考下表。

定量方法	原理	灵敏度	优缺点
BCA法	基于双缩脲反应，在碱性环境下蛋白质将Cu ²⁺ 还原成Cu ⁺ ，产生一种紫蓝色络合物，在562nm处有高的吸光值，该反应产物的量与蛋白质浓度成正比。	0.5-2,000 µg/mL (微孔法)	试剂和结果稳定，灵敏度高；
	BCA法没有反应终点，反应会随着时间而持续进行。	20-2,000 µg/mL (比色皿法)	30min可完成； 但需每次检测同时做标准曲线。
Bradford法	考马斯亮蓝G-250在游离状态下呈红色，最大光吸收在488nm；当它与蛋白质结合后变为青色，并在595nm波长下有最大光吸收。其光吸收值与蛋白质含量成正比。其结合物在室温下1h内保持稳定。	50-1,000 µg/mL	操作简单，反应2min即可检测； 但受去垢剂影响较大。
紫外法	蛋白质具有吸收紫外光的性质（酪氨酸和色氨酸残基引起的），最大吸收峰位于280nm附近；核酸最大吸收峰在260nm，对蛋白的测定结果会引起极大误差；适合测试较纯净、成分相对单一的蛋白质。	µg级别	速度快，操作简单； 但容易受到样品中DNA的干扰。

蛋白变性

- 1) 确定每种裂解液的蛋白质浓度后，分别取等质量的裂解液，添加4xSDS Sample Loading Buffer。
- 2) 混匀后，95-100°C煮沸5-10分钟，对样本进行还原和变性。裂解液可等量分装并在-20°C下储存备用。
- 注：一些膜蛋白或跨膜蛋白，甚至核蛋白（Rb蛋白），高温煮样会导致聚集成多聚体或“鬼带”，导致电泳条带偏移或丢失（详细内容见第三章问题16）。

SDS上样缓冲液各组分的作用如下表所示。

成分	作用
Tris-Cl	防止蛋白质低温环境下发生肽键断裂；抑制酶促反应。
SDS	去蛋白质电荷、解离蛋白质之间的氢键、取消蛋白分子内的疏水作用、去多肽折叠维持蛋白质一二级结构。
甘油	沉降作用，增加蛋白配重。
DTT（或其他还原剂）	还原剂，破坏二硫键。
溴酚蓝	颜色视踪电泳进程；pH指示。

Tips

- 裂解液避免反复冻融。
- 长时间保存，蛋白裂解液建议保存在-80°C，但不超过2年。
- 20°C保存时，裂解液的保质期较短，建议不超过3个月。
- 若观察到裂解液颜色的明显变化（由蓝变棕色或黄色），说明pH值的已发生变化，样品变质，切勿使用。

SDS-PAGE电泳

- 1) 将等量的蛋白和蛋白marker上样至SDS-PAGE胶孔中。细胞或组织裂解液的总蛋白上样量为10-40µg，纯化蛋白的上样量为10-100ng。
- 2) 80V下跑胶20-30分钟，然后调整电压为120V继续跑1-2小时，直至溴酚蓝条带跑至胶底部（或根据实际分子量大小及时调整跑胶时间）。

注意事项

- 传统的SDS-PAGE系统一般都是Tris-甘氨酸体系，电泳缓冲液配方成分主要是由Tris、甘氨酸和SDS组成。
- 预染蛋白marker在三种不同体系中，分子量显示会有细微差异，具体要参考蛋白marker的说明书。
- 分子量较小的蛋白（分子量<15kDa），还可以利用小分子跑胶体系进行电泳。

A.配制SDS-PAGE胶，配制方法同常规。

B.负极缓冲液（Cathode Buffer）：配制10x负极缓冲液，将 60.55g Tris碱，89.58g Tricine及5g SDS加纯水溶解至终体积为500mL；然后稀释1x缓冲液加入到电泳槽的内槽。

C.正极缓冲液（Anode Buffer）：配制10x正极缓冲液，将 121.14g Tris溶于 400mL纯水中，HCl调节pH为8.8，最后定容至500mL；然后稀释1x缓冲液加入到电泳槽的外槽。

D.上样跑胶。

Tips

- 过硫酸铵会缓慢分解，需及时新鲜配制。
- 电泳时蛋白质不仅仅从上到下扩散分离，同时会向两边扩散分离，因此可在无样品孔中加入适量1x上样缓冲液（或无关蛋白样），防止“笑脸”条带出现。
- 在不影响检测信号的前提下，尽量少上样，结果条带会更sharp。
- 电泳不要过热，过热会导致条带弥散甚至蛋白降解。
- 配制好的胶，可保存于4°C冰箱约2~4周（防干燥，防冻融）。

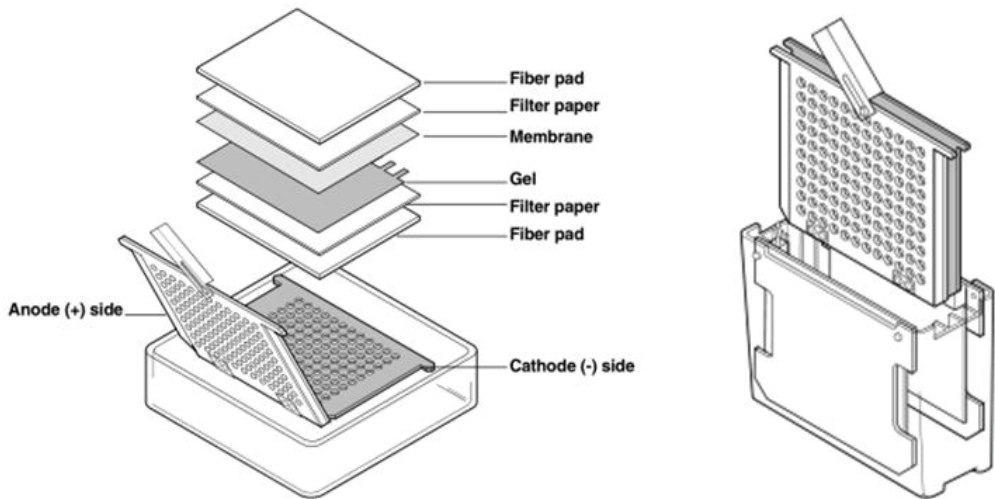
转印（以湿转为例）

- 1) 准备工作：将PVDF膜在甲醇中浸泡30秒，用纯水冲洗两遍，然后用1x电转缓冲液（湿转）浸泡。将滤纸和海绵也浸泡在转膜液中。
- 2) 拆胶：从电泳槽中取出玻片，将胶取下浸泡在转膜液中。
- 3) “三明治”组合：以海绵→滤纸→膜→胶→滤纸→海绵的方式，将其紧密排列，确保各个夹层之间没有气泡。
- 4) 可采用恒流法(一般是200-300 mA，90分钟)或恒压法（一般是75V，90分钟）进行电转。
- 5) 转移完成后，将膜取出，丽春红染色确定转印没有问题。

特性	PVDF膜	NC膜
蛋白结合力	强（疏水相互作用+偶极力）	中等（疏水相互作用）
机械强度	高，不易破	脆弱，易断裂
背景	低，信噪比高	相对较高
预处理	必须用甲醇预浸润	不需要
价格	较高	较低
重复性	优秀，可多次剥离重复使用	差，不建议重复使用

Tips

- 海绵每次转印过后，尽量清洗干净；滤纸尽量不要重复使用。
- 转印时间需根据蛋白大小优化，20~250kD湿转参考恒压：75V，80-90分钟。
- 转印液最多使用2次，避免产热过高导致蛋白降解。
- 大分子量蛋白推荐湿转，半干转即使延长时间也不一定能提高转膜效率（甚至可能导致降解）。
- 蛋白Marker和目的蛋白转印不完全对等（半干转会常见），尤其是高分子量的蛋白。



抗体孵育

- 1) 封闭：推荐5%脱脂牛奶（in TBST）室温封闭1小时。
- 2) 一抗孵育：

a. 将膜从封闭液中取出，用1xTBST洗膜三次，每次5分钟。

b. 根据抗体推荐稀释度，用一抗稀释液稀释一抗，推荐4℃过夜孵育。
- 3) 二抗孵育：

a. 用1xTBST清洗膜三次，每次10分钟。

b. 用推荐稀释度的HRP偶联二抗（可用封闭缓冲液稀释），室温孵育1小时。
- 4) 显影：

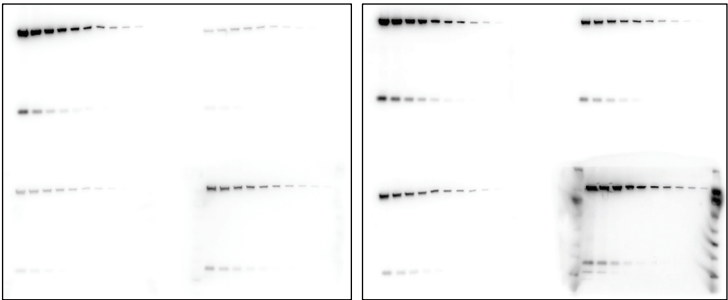
a. 用1xTBST清洗膜四次，每次10分钟。

b. 清洗过程中，ECL底物A液和B液1:1混匀配制显色液。

c. 将ECL底物和膜充分反应后，用保鲜膜将膜包裹固定在暗夹上。将膜暴露于暗照相膜或使用化学发光成像仪读取信号。

Tips

- 显色液的选择也非常重要，实验室最少常备两种灵敏度的ECL。显色液建议现配现用，第一次尝试新靶点时，最好先用灵敏度低的ECL尝试，如果较弱再换高灵敏度的ECL（如下图所示，八种不同ECL在同种裂解液中两种抗体的表现）。



Upper band: ET1605-56, HSP90 (abundant), 1/50,000
Lower band: ET1702-94, Ras (low), 1/2,000
Cell lysate: A431 cell lysate serial dilution.

- 成像仪拍摄时，不建议用机器的自动曝光模式；推荐固定时间内拍摄5张或10张的模式，后期根据实际情况选择最佳的图片。
- 成像仪一般能调整图片的缩放、分辨率/灵敏度等参数。

如果初次曝光后发现：

a. 条带非常强，重新加入ECL后，可以选择高分辨率、低灵敏度的模式。

b. 反之，如果条带有点偏弱，也可以尝试低分辨率、高灵敏度的模式。

蛋白质印迹出了问题？没关系，下面的常见问题及解决方案指南一定能帮助你找出可能的原因，并为你提供补救办法。

1、怎么选择合适的WB内参？

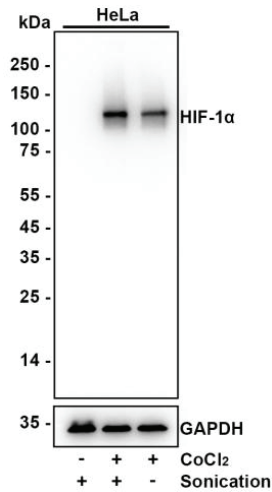
在选择内参蛋白时，我们需要遵循几个原则：

- 1) 种属来源：**样本的种属来源不同，内参的选择不一样。哺乳动物的样本需要选择哺乳动物中稳定表达的蛋白作为内参；同样，植物样本需要选择植物中稳定表达的蛋白做内参。
- 2) 细胞定位：**靶标蛋白的细胞定位不同，适合的内参也不同。如全细胞裂解液可选择 β -actin、 β -tubulin 等，膜蛋白一般选择Na/K+ ATPase，核蛋白则选择 Lamin B1、Histone H3 等（详见下表）。
- 3) 分子量：**内参蛋白的分子量需要与目标蛋白有所区别，否则两者条带无法正常分析。一般目的蛋白与内参蛋白大小最好至少相差5kDa以上。
- 4) 表达因素：**内参的选择还需要考虑实际的实验环境。GAPDH是代谢类蛋白，在活组织中表达较稳定，但在组织缺氧、糖尿病等因素条件下会导致GAPDH的表达增高，此种情况下GAPDH就不适合做内参。 β -Actin和 β -Tubulin是结构蛋白，不同组织的细胞结构会有差异性。

定位	内参	分子量kDa	注意事项
全细胞/胞质	Vinculin	125	大分子量蛋白可参考。
	α -tubulin	55	微管蛋白的表达随着抗菌和抗有丝分裂抗性药物而改变，
	β -tubulin	55	因此不适合抗癌和抗真菌药物处理的研究。
	β -actin	42	/
	GADPH	36	组织细胞缺氧会引起GAPDH表达上调，因此不适用于与氧有关的研究，糖尿病等因素会导致GAPDH的表达量增高。
	Cofilin	19	/
细胞膜	Na/K+ ATPase	100	膜蛋白，需低温煮样或不煮样。
线粒体	HSP60	60	/
	VDAC1	34	/
	COX IV	17	/
细胞核	Lamin B1	66	凋亡实验中不适合做内参。
	HDAC1	55	/
	PCNA	29	非增值细胞不适用。
	Histone H3	15	/
全血、血清、血浆	Transferrin	77	表达状况受某些疾病状态和治疗的影响，比如：视黄酸。
	Albumin	66	含量极高，降低WB实验上样。

2、样本裂解时，为何要超声？如果没有超声仪，有什么替代方法？

无论使用何种裂解液，始终建议采用超声处理来确保细胞或组织裂解充分（如下图所示，超声后条带信号明显增强）。超声的作用有以下三点。



- 1) 细胞破碎与蛋白释放：**超声通过高频机械振动产生空化效应，能有效破碎细胞膜和细胞器膜，特别是对细菌、真菌等具有坚固细胞壁的样本，或膜蛋白、核蛋白等难提取的组分，超声可显著提高蛋白释放效率。
 - 2) 打断核酸粘稠物：**裂解后释放的核酸会形成高粘度凝胶状物质，超声可打断DNA/RNA链，减少样本粘稠度，避免转膜时出现拖尾或阻塞。
 - 3) 均质化处理：**超声能确保样本充分均质，避免因局部裂解不完全导致的蛋白定量误差。
- 若缺乏超声设备，可选用以下方案：
- a. 物理机械法
 - 针头抽吸法：使用21G针头反复抽吸样本（粘稠样本可先用16G/18G针头预处理）。
 - 玻璃珠震荡法：加入玻璃珠后涡旋震荡。
 - b. 其他设备替代
 - 高压均质机：1,500bar压力循环处理3次，大规模样本适用。
 - 反复冻融法：收集细胞沉淀后，置于-80℃速冻后4℃解冻，反复循环5-10次；再加入裂解液，4℃振荡或旋转60分钟。

3、大分子蛋白为何推荐湿转印？相比半干转印的优势在哪里？

很多厂商推出了多种半干转印的设备，能显著缩短转印时间。有多个抗体厂家做过对比实验。

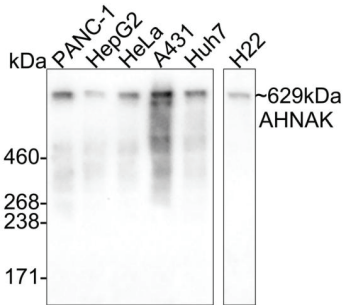
- 1) 对于低分子量靶标**（10-100kDa），用湿转印法和半干转印法获得的结果相当，且半干时间用时更短。
- 2) 对于高分子量靶标**（>100kDa），不同厚度的凝胶（1mm和1.5mm）蛋白质均能良好转移，但采用半干转印时，凝胶厚度可能会影响转印效率。

湿转和半干转差异对比参考下表。

参数	湿转	半干转
适用分子量	适用所有分子量，>100kDa的大分子量更佳	10-100kDa
转印效率	高（低温+缓冲液浸润）	较低（局部过热风险）
温度控制	冰浴系统（防降解）	易发热（可能发生降解）

对于超大分子量的蛋白（>300kDa），更加推荐使用湿转法，并且有两点可以去优化。

- 1) 缓冲液调整：降低转印缓冲液中甲醇比例至5-10%，并添加0.05% SDS（增强>150 kDa蛋白洗脱）。
- 2) 转印条件调整：低电压30V过夜转印（16小时），提高高分子量蛋白转移率。
- 如右图靶标，分子量约629kDa，利用3-8%的Tris-乙酸梯度凝胶，4℃冰箱湿转30V，16小时。



4、脱脂奶粉和牛血清白蛋白 (BSA) 封闭有区别吗？磷酸化蛋白必须要用BSA封闭吗？

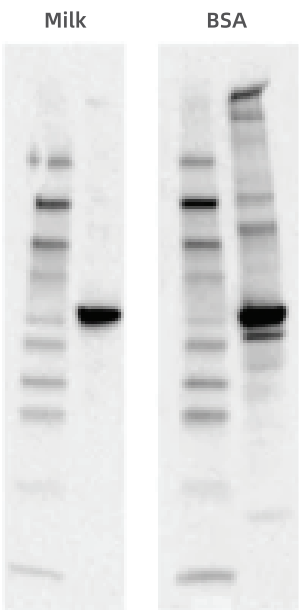
牛血清白蛋白 (BSA) 和脱脂奶粉常用于封闭液，因为它们价格低廉且易于获取。然而，它们并非总是适用，并且可能造成背景干扰。

- 1) 脱脂奶粉：含酪蛋白、乳球蛋白等多种蛋白质，封闭效果全面，但含内源性磷酸化酪蛋白和生物素，可能干扰磷酸化蛋白或生物素标记实验。
- 2) BSA：纯度较高，无磷酸化修饰，适合高特异性实验，但对疏水蛋白的封闭能力可能较弱。

抗体可能对封闭剂敏感。一般来讲，BSA封闭会产生更清晰的结果，因为BSA含有较少的蛋白，因此抗体较少与其发生交叉反应。但实际实验中，大部分抗体在牛奶中的效果更好，因为牛奶含有更多种类的封闭蛋白，能封闭更多不同类型的蛋白质。

使用针对牛或相关物种（例如羊驼、山羊、马或绵羊）抗体的抗体时，应避免使用BSA和脱脂奶粉。这种情况，建议使用二抗宿主物种的正常血清作为最佳封闭剂，以避免任何不必要的相互作用。

经过大量WB实验，对于磷酸化抗体我们推荐使用脱脂奶粉进行封闭，结果证实脱脂奶粉对磷酸化蛋白的影响其实不大。只要保证脱脂牛奶是新鲜配制的即可。如下图所示，磷酸化蛋白phospho-AKT (S473) 在脱脂奶粉和BSA两种封闭体系下展现的WB结果。结果显示，同样条件下脱脂牛奶结果背景更加干净，且阳性信号也很明显。因此，我们一般推荐5%脱脂牛奶作为日常封闭首选。尤其需要注意的是，磷酸化蛋白的WB应该使用TBST缓冲液，避免使用PBST缓冲液。



5、WB清洗缓冲液和稀释缓冲液，选择TBST还是PBST好？

TBST或PBST 作为清洗缓冲液，适合的场景见下表。

使用场景	推荐洗液	原因
常规蛋白检测	TBST/PBST	两者效果相近，但TBST更稳定
磷酸化蛋白检测	TBST	PBS可能破坏磷酸基因，导致信号丢失
碱性磷酸酶AP二抗	TBST	PBS会干扰AP标记抗体的活性

一抗和二抗孵育后，延长膜的清洗时间，能更好的去除膜上的非特异信号，但同时目的靶标蛋白的条带信号也可能发生减弱。PBST相比TBST，减弱的更加明显。

抗体稀释液的兼容性方面，绝大部分情况下都会回收利用WB抗体，在反复回收使用的过程中，TBST稳定性更好且不容易产生沉淀。

综上，TBST是更通用的选择，尤其适用于磷酸化检测或需长期保存的抗体体系。

6、一抗孵育室温1-2小时和4℃过夜哪个更好？

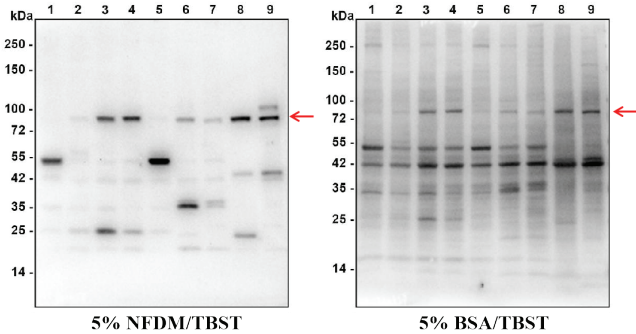
- 1) 4℃过夜（12-18小时）：适合检测低丰度蛋白或弱信号（如磷酸化蛋白、核蛋白），背景更干净。
- 2) 室温1-2小时：适合靶点丰度高、抗体亲和力强，或时间紧的情况下。

蛋白质印迹中一抗孵育时间需要最终用户进行优化。一般来讲，4℃过夜孵育灵敏度高，背景低。但许多抗体室温孵育1或2小时效果也非常好。

7、抗体稀释液对结果会有影响吗？稀释后的抗体如何保存呢？

抗体稀释液选择较多，价格较低的脱脂奶粉，稍高的BSA，以及各大厂家都在推荐的WB一抗稀释液。同一个抗体用不同的稀释液可能会得到不同效果的结果，因此一支新的抗体拿到之后建议使用不同稀释液做一个预实验。

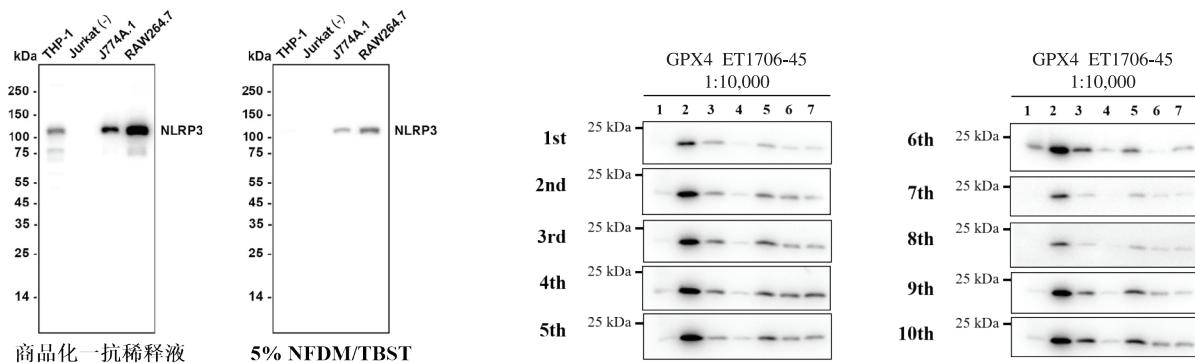
抗体浓度较高时，建议使用5%脱脂牛奶稀释以降低背景。华安生物的一抗浓度一般较高，大都为1mg/mL，当稀释比推荐为1:500-1:1,000时，使用5%脱脂牛奶封闭和稀释一抗会得到背景较为干净的结果。如下图所示的案例，两张膜裂解液一致，均用5%脱脂牛奶室温封闭1小时，在1:1,000条件下左边的5%脱脂牛奶结果背景更干净。



商品化一抗稀释液的使用越来越频繁，有以下优势：

- 含抗体保护剂和封闭成分，可缩短孵育时间。
- 相比脱脂牛奶和BSA稀释液，抗体灵敏度有明显提升。
- 抗体回收后，4℃保存方便下次使用。

华安生物近几年对比了不同厂家的一抗稀释液，同时也推出了自己的一抗稀释液。实验结果表明，一抗稀释液的确大幅提升了抗体的灵敏度（如下左图NLRP3的WB结果所示），并且回收放4℃也方便了后续使用。

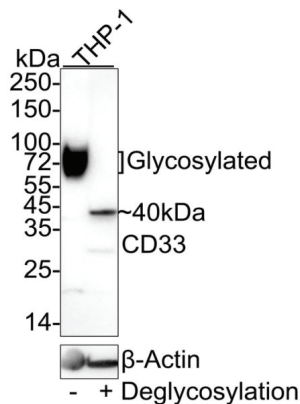


一抗稀释液配制的抗体，一般保存在4℃（市面常见的一抗稀释液说明书均推荐4℃保存）。5%脱脂牛奶稀释的抗体，可以回收后直接放入-20℃保存。为了证明可行性，我们选了几种常用抗体做了回收实验。实验时间7月到8月期间，如上右图所示的GPX4在1:10,000稀释10mL后，每隔2天从-20℃取出，置于自来水水浴中加速化冻，然后4℃过夜孵育同裂解液的PVDF膜（推荐4℃过夜孵育，天气较热的情况下室温孵育会加速牛奶的变质）。

8、为什么蛋白的理论分子量与说明书显示的大小会有偏差？

蛋白质印迹是一种基于蛋白质大小来分离蛋白质的技术。一般来讲，蛋白质越小，在胶上的迁移速度越快。但迁移速度也受其它因素的影响，因此，观察到的实际条带大小可能与预测的不同。常见的因素包括：

1) 翻译后修饰：如糖基化、泛素化等，可增加蛋白质大小。如下图所示CD33，理论分子量约40kDa，但由于糖基化修饰实际检测的分子量约70kDa。去糖基化酶处理之后，可见分子量恢复到约40kDa。



2) 翻译后切割：翻译后切割通过剪切蛋白质前体或成熟蛋白产生功能片段，可能导致实际分子量与理论值显著偏离。如Tau蛋白（MAPT编码），在阿尔茨海默病（AD）中发生异常剪切，产生截短亚型。

3) 剪接变体和异构体：可变剪接和异构体可能从同一基因产生不同大小的蛋白质。

4) 相对电荷-氨基酸（带电和不带电）多聚体组分，例如蛋白质的二聚体。

9、WB结果条带呈现“手拉手”的现象，如何解决？



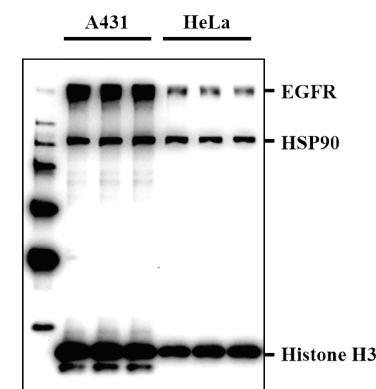
若出现如上左图“手拉手”的条带形式，一般是由于条带太强导致。解决办法如下：

1) 显影优化：同一张膜，无需重新跑胶。

- 重新加入ECL后，可以选择高分辨率、低灵敏度的如“2x2”或“1x1”的模式（如Thermo的iBright成像仪，一般机器默认为“4x4”的模式），再选择短时间内多次曝光显影。
- 如成像仪没有上述模式可选，可以先清洗膜（去除上一次残留的ECL底物），重新配制低灵敏度的ECL底物，或者对原先的ECL底物进行适当的稀释，然后再立刻去曝光显影。

2) 抗体孵育优化：原有的膜若无法通过显影得到优化，可以考虑重新跑胶。

- 减少上样量：电泳时蛋白质不仅仅从上到下扩散分离，同时会向两边扩散分离，因此越是靠下的蛋白，条带宽度会越来越宽。分子量小的蛋白，如果表达量较高，很有可能出现“手拉手”的条带情况。如右图所示，分子量最小的Histone H3出现“手拉手”的情况，而表达量同样较高的EGFR和HSP90均没有出现“手拉手”。这种情况下，尽量减少蛋白的上样量。



- 降低一抗使用浓度：“手拉手”的现象一般是由于强度太强导致，因此条件允许的情况下，优先考虑降低一抗的使用浓度，同时也可以节省抗体。
- 降低二抗使用浓度或缩短孵育时间：二抗浓度过高也会导致条带强或者背景高的情况，因此也可以优化二抗的使用浓度。特别二抗一般是室温孵育，夏天和冬天同样的使用浓度，也会得到不同的效果。

10、WB结果无信号条带或信号较弱，如何解决？

WB实验流程较长，其结果受到很多因素的影响，总体可分为样品制备问题、电泳转印问题、抗体孵育问题和显影问题。对于WB结果无信号条带的问题，可以从四个方面去解决。

1) 样品制备：样品制备是容易忽视的环节，因此需要确保上样的样品是没有问题的。

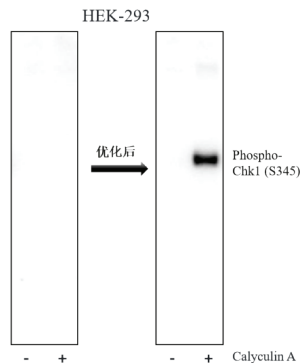
- 选择合适的裂解液，并添加合适的蛋白酶抑制剂（磷酸化蛋白还需添加磷酸酶抑制剂），防止蛋白降解。
- 某些膜蛋白、跨膜蛋白和核蛋白（Rb）需考虑蛋白聚集的问题，避免高温煮沸。
- 尽量使用超声破碎，以充分裂解蛋白。

2) 电泳转印：

- 确定转印槽的正负极方向正确。
- 确保蛋白充分转移至膜上。胶的厚度一般有两种，1mm和1.5mm，在转印前确定胶的厚度，厚度较厚的胶，转印时间需相应延长，特别是分子量超过100kDa的蛋白。

3) **抗体孵育**：磷酸化靶标注意封闭和抗体孵育过程中不要使用PBST。

- a. 封闭：适当降低封闭液浓度，或缩短封闭时间，可以增强条带的信号。
- b. 一抗：适当增加一抗的浓度，4℃过夜孵育（如下图所示，改为4℃孵育后信号明显增强）；更换一抗稀释液，可能也会改善检测效果，具体可参考常见“问题7”。



- c. 二抗：确定二抗种属正确；适当增加二抗浓度或二抗孵育时间，但注意二抗浓度增加或孵育时间延长都有可能导致背景加深，优化时需注意平衡。

4) **显影**：

- a. ECL底物：可以更换灵敏度更高的ECL底物。
- b. 成像仪曝光模式：条带阴性或偏弱，还可以尝试调整成像仪的参数，改为高灵敏度低分辨率的“6x6”或“8x8”的模式（成像仪默认“4x4”）。

11、WB结果高背景，如何解决？

对于WB结果高背景的问题，与信号弱类似，也可以从这四个方面去解决。

- 1) **样品制备**：样品制备是容易忽视的环节，尽量使用超声破碎，以充分裂解蛋白。
- 2) **电泳转印**：确保蛋白充分转移至膜上，转印不充分，可能会导致信噪比不好。
- 3) **抗体孵育**：从封闭开始，膜需要保持湿润，避免干燥。背景的问题主要从这点去优化。
 - a. 封闭：如果主带条带清晰，可以考虑适当增加封闭液浓度，或延长封闭时间；或者更换一种封闭液，封闭液推荐5%脱脂牛奶（TBST配制）。
 - b. 一抗：如果主带条带清晰，可以考虑降低一抗的浓度，4℃过夜孵育。
 - c. 二抗：整体背景较深，可以优先考虑降低二抗浓度或二抗孵育时间。
 - d. 清洗：若清洗不充分，建议适当增加清洗次数和清洗液体积，也可尝试提高清洗缓冲液中Tween 20的比例。

4) **显影**：若弱主带明显，背景较深的环境下。

- a. ECL底物：可以更换灵敏度更低的ECL底物，或稀释现有ECL后再使用。
- b. 成像仪曝光模式：还可以尝试调整成像仪的参数，改为低灵敏度高分辨率的“2x2”或“3x3”的模式（成像仪默认“4x4”）。

12、WB结果多条带，如何解决？

对于WB结果多条带的问题，可以从下面几个方面去解决。

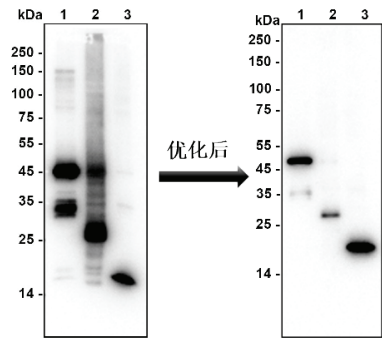
1) **样品制备**：

- a. 细胞样品：确保细胞代次不要过高，或有支原体污染等情况发生，避免蛋白表达出现差异。
- b. 蛋白修饰或剪切活化形式：排除蛋白修饰或剪切活化形式的原因，查阅文献确定靶标蛋白是否有修饰发生，如糖基化、泛素化等。
- c. 蛋白降解：选择合适的裂解液，并添加合适的蛋白酶抑制剂（磷酸化蛋白还需添加磷酸酶抑制剂），防止蛋白降解。
- d. 多聚体：确认目标蛋白是否有二聚体或者多聚体形式，建议上样前再次煮沸5分钟，同时确保上样缓冲液中含有足量的还原剂。

2) **电泳转印**：转印过程防止产热过高，避免蛋白发生降解。

3) **抗体孵育**：排除以上原因后，重点考虑一抗和二抗浓度过高导致。

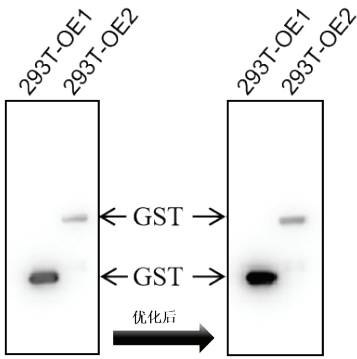
- a. 一抗：降低一抗孵育浓度，或尝试更换抗体稀释液（参考常见“问题7”）。
- b. 二抗：适当降低二抗的使用浓度。



13、WB结果出现反白或空心化，如何解决？

条带出现反白或空心化，一般是由于抗体浓度过高（排除转印问题的前提下），显色底物被迅速消化掉导致的。

- 1) **转印**：制作“三明治”的每一层都需注意排空气体，避免转印问题。
- 2) **上样量**：可以适当降低蛋白的上样量。
- 3) **抗体孵育**：可降低一抗的使用浓度，如下图所示，一抗稀释比从1:10,000调整至1:100,000后，条带更加紧实。



4) **显影**：如果是抗体浓度过高导致的，滴加上显影液后需立即放入成像仪中开始曝光，避免底物消耗殆尽，同时可以更换灵敏度更低的底物或者稀释原显色底物。

14、WB结果出现斑点，如何解决？

最常见的原因是封闭液中出现不溶性物质。不溶性颗粒附着在膜上，会导致发光时候膜上出现黑点。建议5%脱脂牛奶用TBST配制好后，置于摇床上充分溶解，最后过滤后使用。若没有过滤装置，溶解过程至少持续1小时，保证完全溶解。

15、WB结果出现条带呈微笑状（U型）或倒微笑状（∩型），如何解决？

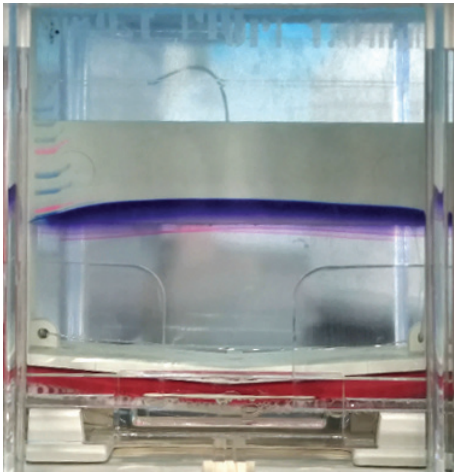
在WB实验中，条带出现微笑状（U型）或倒微笑状（∩型）通常与电泳系统或凝胶制备问题相关。

1) 微笑状条带的成因与解决方法

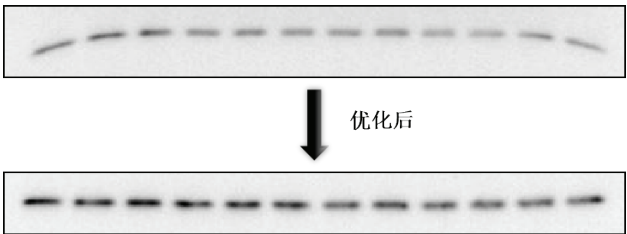
- a. 电泳条件不当：电压过高导致迁移过快，或电泳槽冷却不均（中间温度高于两侧）。这种情况可以降低跑胶电压，或将电泳槽置于冰水浴中降温。
- b. 样品盐离子浓度过高：高盐样品在凝胶中形成局部电流差异。这种情况可以先低电压10-20V跑20分钟，让低分子量的盐离子与蛋白分离开，再转高电压分离蛋白。

2) 倒微笑状条带的成因与解决方法

- a. 装置没有装配好，导致漏液。这种情况如果及时发现，可以重新夹紧后再跑胶，或往内外槽中补加电泳缓冲液至液面齐平（如下图情况，可以补加缓冲液至液面齐平）；如果情况严重，建议重新配胶。



- b. 凝胶玻璃板底部有气泡，也可能导致倒微笑，特别是胶厚度较厚的情况。这种情况下，用注射器将底部的气泡排尽。
- c. 两端的加样孔未加样导致目的上样孔两边呈现倒微笑状的情况，可以在胶孔的两端样品孔中添加1x上样缓冲液或无关蛋白的裂解液，如下图优化之后的效果。



16、膜蛋白在凝胶顶部跑不下来，出现“鬼带”，如何解决？

在WB实验中，膜蛋白（或跨膜蛋白等）会经常出现“鬼带”（即大分子未知条带或沉淀滞留于浓缩胶顶部）的问题。主要原因有：

- 1) 还原剂失效：加热过程中上样缓冲液中的还原剂（DTT/β-巯基乙醇）被氧化，导致蛋白重新折叠聚合。
- 2) 样品处理不当：膜蛋白（或跨膜蛋白等）未充分溶解，或离心不彻底导致残留不溶性颗粒在胶底部。

针对性解决方案：

1) 增强还原剂活性

- a. 煮沸后补加还原剂：加热样品后添加适量新鲜DTT或β-巯基乙醇。
- b. 添加抗氧化剂：在上样缓冲液中添加1-2mM EDTA，抑制还原剂氧化。

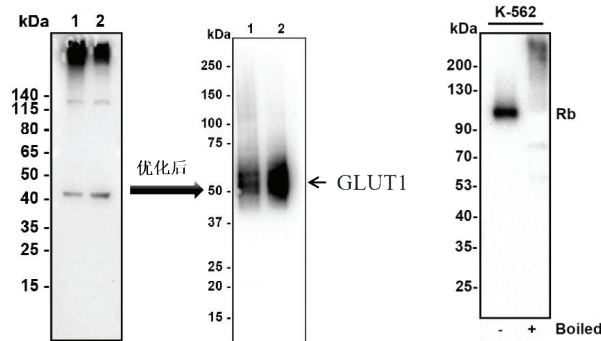
2) 样品制备优化

- a. 离心除沉淀：上样前，12,000 rpm离心取上清上样。
- b. 加强溶解：对于某些膜蛋白或跨膜蛋白（甚至有一些核定位蛋白，如Rb），RIPA中的NP-40或Triton X-100不能有效的溶解疏水区域，这类情况建议：

• 优先使用1% SDS裂解缓冲液裂解蛋白，确保充分溶解膜蛋白，高温煮样方式不变。

• 裂解缓冲液不变时，需避免煮沸，建议用低温煮样

（50-70℃）或不煮样温和变性。如右图所示，GLUT1理论分子量约为54kDa，膜蛋白，如果按照常规RIPA裂解液、煮沸检测，会在约40kDa和胶孔最上面看到一串黑带（“鬼带”）；但改为不煮样后，在54kDa附近检测到单一的条带。Rb一种核定位蛋白，煮沸后也会存在“鬼带”形式，不煮样得到约100kDa的单一条带。



17、小分子蛋白容易出现弥散，如何解决？

小分子蛋白（<20kDa）在SDS-PAGE中易弥散的主要原因：

- 1) SDS结合特性：小分子蛋白与SDS形成的复合物与凝胶中游离SDS差异小，导致横向迁移增加。
- 2) 浓缩胶作用不足：常规浓缩胶对小分子蛋白的聚集效果有限。

优化方案：

1) 凝胶体系优化

- a. 浓缩胶增量：将浓缩胶高度提升至1.5-2cm（常规0.5-1cm），延长小分子蛋白聚集时间。
- b. 选低浓度分离胶：使用8-12%分离胶，降低大分子阻力对小蛋白的干扰。

2) 电泳条件优化：浓缩胶阶段，低电压跑胶；分离胶阶段，可适当缩短跑胶时间，溴酚蓝不用跑到胶的最底下，同时电泳过程中注意做好降温，高温会加快分子运动，导致弥散加剧。

3) 样品处理优化：防止蛋白重新折叠，可添加新鲜DTT等；样品制备尽量超声处理，打断DNA/RNA链，减少样本粘稠度，避免转膜时出现拖尾或阻塞。

4) 转印优化：采用低甲醇比例（10%-15%）转膜液，缩短转膜时间；电泳结束后10分钟内完成转膜，防止蛋白扩散。