



WB 实验基本原理

免疫印迹检测法 (Western blotting), 又称蛋白质印迹, 是分子生物学、生物化学和免疫遗传学等生命科学研究中常用的一种实验方法, 其基本原理是通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳区分待测样品不同的组分, 再在电流的作用下, 使蛋白质从凝胶转移至固相载体(膜)上, 通过特异性抗体作为探针, 对靶抗原蛋白质进行检测, 通过分析特异性反应的位置和强度获得特定蛋白质在所分析的细胞或(和)组织中表达情况的信息。

一、基本原理

Western blotting 实验通常由 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、蛋白质的印迹和检测两个部分组成。

第一部分：SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

1. 蛋白质的电泳分离是指带电粒子在电场作用下, 向着与其所带电荷相反的电极移动的现象, 各种蛋白质因所带的净电荷、分子量大小和形状不同而有不同的迁移率。聚丙烯酰胺凝胶 (PAG) 是由丙烯酰胺单体 (Acr) 和交联剂亚甲基双丙烯酰胺 (Bis) 在催化剂过硫酸铵作用下聚合交联而成的三维网状结构凝胶。如果在电泳体系中加入十二烷基硫酸钠 (SDS), 则电泳迁移率主要依赖于分子量, 与所带的净电荷和形状无关。这种电泳方法称为 SDS-PAGE, 主要用于测定蛋白质亚基分子量。

2. 电泳启动后, 蛋白样品先在浓缩胶中运动, 由于浓缩胶孔径大, 蛋白质运动受阻小, 因此不同的蛋白质就浓缩到分离胶之上层, 全部蛋白质处于同一起跑线上。当蛋白质进入分离胶时, 因单位质量带负电荷多者迁移快, 反之则慢, 即分子量小的蛋白迁移快, 分子量大的蛋白迁移慢; 由于分离胶孔径小, 而且成为一个整体的筛状结构, 它们对大分子阻力大, 小分子阻力小, 因而蛋白质在电泳过程中最终达到彼此分开。

3. 由于凝胶浓度不同, 平均孔径不同, 能通过的可移动样品蛋白质的分子量也不同。选择一定的凝胶浓度, 即选择合适的凝胶孔径, 可使待分离样品蛋白质的泳动速率差异最大, 得到最佳分离效果。通常根据被分离蛋白质的分子量范围选择凝胶浓度。

凝胶浓度与蛋白质分子量测定的关系

蛋白质分子量范围(KD)	凝胶浓度(%)
<10	15
10-30	12
30-100	10
100-500	8



>500	5
------	---

第二部分：蛋白质的印迹和检测

蛋白质的印迹和检测包括五个步骤：

转膜→封闭→孵育一抗→孵育二抗→蛋白检测（显色）和分析

1. 转膜

蛋白质印迹首先是要将电泳后分离的蛋白质从凝胶中转移到固相载体(膜)上,即转膜。最常用的固相载体(膜)主要是硝酸纤维素(NC)膜和聚偏二氟乙烯(PVDF)膜。硝酸纤维素(NC)膜与蛋白质之间靠疏水作用结合,无需预先活化,对蛋白质的活性影响小;非特异性本底显色浅;价格低廉,使用方便;但结合在NC上的小分子蛋白质在洗涤时易丢失;NC韧性较差,易损坏。根据被转移的蛋白分子量大小,选择不同孔径的NC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。通常用0.45 μm 和0.2 μm 两种规格的NC膜,大于20 KD 的蛋白可用0.45 μm 的膜,小于20 KD 的蛋白就要用0.2 μm 的膜。聚偏二氟乙烯(PVDF)膜与蛋白质亲和力高,用前需在甲醇中浸泡,以活化膜上的正电基团,使其更容易与带负电荷蛋白结合。PVDF膜灵敏度、分辨率和蛋白亲和力比常规的膜要高,非常适合于低分子量蛋白的检测。

常用的转膜方式分为半干转和湿转两种。

半干转即将装有凝胶、膜和滤纸的“三明治”的凝胶夹层组合放在吸有转印缓冲液的滤纸之间,通过滤纸上吸附的缓冲液传导电流,起到转移的效果。因为电流直接作用在膜和凝胶上,所以其转移条件比较严格,但其转移时间短,效率高。

湿转即将装有凝胶、膜和滤纸的“三明治”的凝胶夹层组合卡在转移槽内,垂直悬浮在缓冲液中,利用与凝胶夹层平行的电极板的高强度电场将蛋白质从凝胶转移至膜上。其优点是可以对蛋白质进行有效转移,转移时间可适当延长获得更完全的转移,且可以同时转移几块胶的蛋白质。

2. 封闭

转移成功后的膜上有很多非特异性的蛋白质结合位点,为防止这些位点与抗体结合引起非特异的背景染色,一般用惰性蛋白质或非离子去污剂封闭膜上的未结合位点来降低抗体的非特异性结合。封闭剂应该封闭所有未结合位点而不替换膜上的靶蛋白、不结合靶蛋白的表位,也不与抗体或检测试剂有交叉反应。最常见的封闭剂是BSA、脱脂奶粉、酪蛋白、明胶和Tween-20,缓冲溶液是TBS或PBS。

惰性蛋白质BSA、脱脂奶粉、酪蛋白、明胶或非离子去污剂Tween-20封闭膜上的未结

合位点可以降低抗体的非特异性结合。Tween-20这种非离子型去污剂在乳化蛋白时，不破坏蛋白的结构，可减少对蛋白质之间原有的相互作用的破坏。

封闭剂选择：

a 脱脂奶粉是最常用的经济配方

b 脱脂奶粉不能与生物素化的抗体一起使用，因为脱脂奶粉含有糖蛋白和生物素；建议使用BSA。

c 分析磷酸化蛋白须用BSA。脱脂奶粉含磷酸酶，用磷酸化特异性抗体分析磷酸化蛋白受到影响，因为磷酸酶与膜上的磷酸化蛋白接触可使之去磷酸化；也不适用于碱性磷酸酶(AP)检测系统。

d 如果用辣根过氧化物酶(HRP)检测系统，封闭液不应加叠氮钠(NaN_3)，因为叠氮钠对辣根过氧化物酶(HRP)有灭活作用。

e 如果用二抗抗体是碱性磷酸酶(AP)标记的检测系统，可使用酪蛋白封闭，同时须选择TBS缓冲溶液，不可使用PBS缓冲溶液，因为PBS缓冲溶液干扰碱性磷酸酶。

3. 孵育一抗

检测目标蛋白质的特异性一抗抗体和封闭后的膜进行孵育，膜上的目标蛋白质和一抗抗体发生特异性的结合。

在免疫印迹实验中，一抗抗体应该提前选定。一抗抗体取决于被检测的抗原蛋白质。免疫印迹一抗抗体包含单克隆抗体(MAbs)和多克隆抗体(PAbs)。单克隆抗体(MAbs)识别单个抗原表位，具有更高的特异性，可有效降低背景，但如果所识别的抗原表位被破坏，则会影响实验结果。多克隆抗体可识别多个抗原表位，通常具有更高的亲和力，即使有少数几个抗原表位被破坏，仍然不会影响实验结果。

4. 孵育二抗

特异性酶标记的针对一抗抗体的二抗抗体和孵育一抗后的膜进行孵育，膜上一抗抗体(已和目标蛋白质特异性的结合的)和二抗抗体发生特异性的结合。

大多数一抗抗体的来源是小鼠或兔，因此抗鼠免疫球蛋白和抗兔免疫球蛋白是最常见的二抗抗体。山羊是最常见的用于生产多克隆抗小鼠和抗兔抗体的动物，所以山羊抗鼠免疫球蛋白和抗兔免疫球蛋白是最常见的二抗抗体。选择二抗抗体取决于一抗抗体的动物来源。例如，如果一抗抗体是小鼠来源单克隆抗体，二抗抗体必须是抗小鼠的抗体；如果一抗抗体是兔来源多克隆抗体，二抗抗体必须是抗兔的抗体。

5. 蛋白检测(显色)和分析

(1) 蛋白检测(显色)：

酶标记的二抗和合适的底物发生反应，生成有颜色的产物，即可见的蛋白区带，通过分析特异性反应生成的可见蛋白区带的位置和强度即可获得特定蛋白质在所分析的细胞或(和)组织中表达情况的信息。

在酶标二抗抗体中使用的酶通常是碱性磷酸酶 (AP) 或辣根过氧化物酶(HRP)。碱性磷酸酶可以将无色的底物5-溴-4-氯吲哚磷酸盐 (BCIP) 转化为蓝色的产物；而辣根过氧化物酶可以H₂O₂为底物，将3-氨基-9-乙基咔唑氧化成褐色产物或将4-氯萘酚氧化成蓝色产物。另一种检测辣根过氧化物酶的方法是用增强化学发光法，辣根过氧化物酶H₂O₂存在下，氧化化学发光物质鲁米诺 (luminol, 氨基苯二酰一胍) 并发光，在化学增强剂存在下光强度可以增大1000 倍，通过将印迹放在照相底片上感光就可以检测辣根过氧化物酶的存在。

(2) 结果分析：

a 对照设计

成功进行 Western Blot 检测，设置合适正确的对照是必不可少的，只要正确设置了这些对照，即可快速和准确的找到 Western Blot 的问题所在，并保证实验结果的准确性和特异性。

一般需要设置的对照如下：

阳性对照：明确表达检测蛋白的组织或细胞，用于检测抗体的工作效率。

阴性对照：明确不表达检测蛋白组织或细胞，用于检测抗体的特异性。

二抗对照：不加一抗，用于检测二抗的特异性。

内参对照：检测标本的质量和二抗系统。

空白对照：不加一抗和二抗；用于检测膜的性质和封闭的效果。

b 内参

内参即是内部参照，对于哺乳动物细胞表达来说一般是指由管家基因编码表达的蛋白，它们在各组织和细胞中的表达相对恒定，在检测蛋白的表达水平变化时常用它来做参照物。在 Western Blotting 中使用内参其实就是在免疫印迹过程中另外用内参对应的抗体检测内参，这样在检测目的产物的同时可以检测内参的表达，由于内参在各组织和细胞中的表达相对恒定，借助检测每个样品内参的量就可以用于校正蛋白质定量、上样过程中存在的实验误差，保证实验结果的准确性。此外内参可以作为空白对照，检测蛋白转膜情况是否完全、整个Western Blotting 显色或者发光体系是否正常。

选择内参与要检测的目的蛋白的分子量最好相差5KD以上。当目的蛋白的分子量大小与选用的内参蛋白分子量大小相差比较明显，可同时进行检测；当目的蛋白的分子量大小与选用的内参蛋白分子量相差不大时，可以先进行目的蛋白的抗体检测，然后使用印迹膜再生液



洗掉膜上的抗体，重新进行内参蛋白的抗体检测。

常用内参一览

内参名称	分子量大小	适用范围
beta-actin	43kDa	胞浆和全细胞
GAPDH	30-40kDa	胞浆和全细胞
Tubulin	55kDa	胞浆和全细胞
WCA1/Porin	31kDa	线粒体
COXIV	16kDa	线粒体
Lamin B1	16kDa	细胞核 (不适于去除核膜的样本)
TBP	38kDa	细胞核 (不适于去除 DNA 的样本)

常用内参 ECL 发光检测图例

