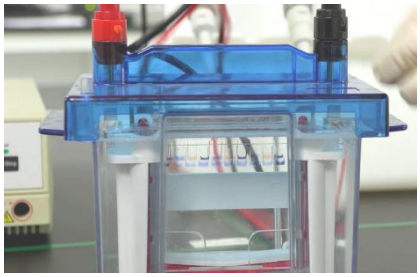
# Western Blot（WB）实验方案

*本方案适用于**细胞/组织样本**，为一般通用方案，特殊样本请参考其他资料改进。

## 简介

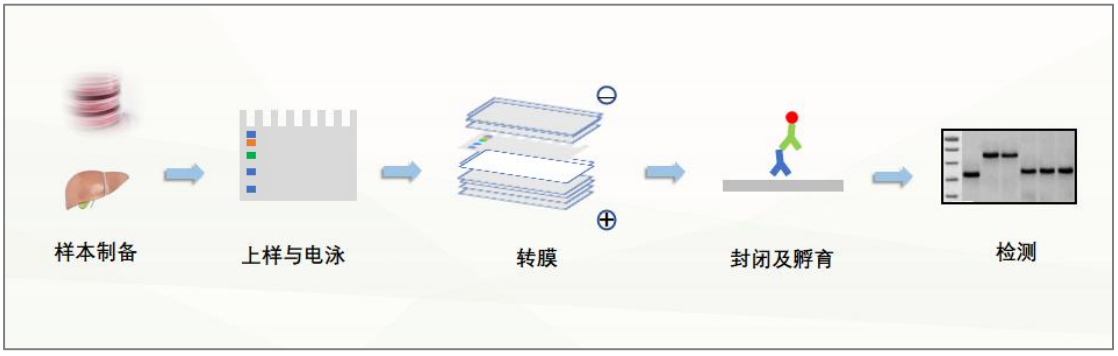
Western Blot（蛋白质印迹法，简称 WB）是分子生物学与生物化学领域的核心技术，也是蛋白质分析的金标准，它将 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳的蛋白分离能力与免疫检测的特异性相结合，实现对复杂样品中特定靶蛋白的定性、半定量的表达分析，广泛应用于基础研究、临床诊断和生物技术开发等领域。



## 核心原理

通过 SDS 使蛋白质变性并赋予均匀负电荷，经 SDS-PAGE 按**分子量大小**分离蛋白；再通过电场将蛋白转移至硝酸纤维素膜或 PVDF 膜，利用靶蛋白特异性一抗结合，结合酶/荧光团偶联的二抗实现信号可视化；最终通过条带的存在、位置和亮度分析靶蛋白的表达与分子量。

## 实验流程



## 第一步：样品制备

提取细胞/组织中的蛋白并制备裂解液，全程样本、缓冲液置于**冰上**，防止蛋白降解。

### 通用所需材料

| 所需材料 | 货号 | 产品名称 |
|---|---|---|
| PBS | abs962 | PBS 缓冲液（1×） |
| 裂解缓冲液（变性/非变性） | abs9229 | RIPA 裂解液（强） |
| | abs9116 | 免疫印迹及免疫沉淀用（WB/IP）裂解液 |
| 蛋白酶抑制剂 | abs9161 | 广谱型蛋白酶抑制剂混合物（不含 EDTA，100×DMSO 储液） |
| 磷酸酶抑制剂 | abs9162 | 广谱型磷酸酶抑制剂混合物（100×储液） |
| 上样缓冲液 | abs9829 | 上样缓冲液（5 ×）（含还原剂） |
| 蛋白定量试剂盒 | abs9232 | BCA 蛋白定量试剂盒 |

### 细胞培养物裂解液制备步骤

1. 按说明书制备裂解缓冲液，不含蛋白酶抑制剂时需补加，磷酸化蛋白检测加磷酸酶抑制剂；
2. 收集细胞
3. **贴壁细胞**密度达到 80-90%，可以用来提取蛋白。弃上清，用 4℃预冷的 PBS 清洗 2~3 次，加入裂解液（按照六孔板的每孔细胞加入 150-250 μL 裂解液的比例加量），细胞刮刮下细胞，并用移液器吹打混匀，收集至 EP 管中，冰上裂解 5min，也可用超声辅助裂解，10000-14000rpm，离心 3-5min，取上清备用。
4. **悬浮细胞**一般密度达到 0.8－1.5 × $10^6$ 个/mL 时提取（通过细胞计数确认），经 100－500 g 4℃离心 5min，PBS 洗涤 2-3 次后重悬于预冷裂解液（1×$10^7$个细胞加 1 mL 裂解液），冰上裂解 5min，也可用超声辅助裂解，10000-14000rpm，离心 3-5min，取上清备用。
5. BCA 法测定蛋白浓度，根据 BCA 测定的结果，用含蛋白酶抑制剂的裂解液把样本的蛋白浓度调齐。
6. 添加上样缓冲液（含还原剂）稀释至总蛋白浓度 1－3 μg/μL；
7. 分装，-80℃冷冻保存备用。

### 组织裂解液制备步骤

1. 将组织剪切成细小的碎片。
2. 充分融解 RIPA 裂解液，之后混匀。取适当量的裂解液，使用前数分钟内加入 PMSF（分子量：174.2 g/mol），使其最终浓度为 1mM。
3. 按照每 20mg 组织加入 150-250L 裂解液的比例加量。
4. 用匀浆器匀浆，充分裂解后，10000-14000g 离心 3-5min，取上清，即可进行后续实验
5. 后续蛋白浓度测定、稀释、保存步骤同细胞样本。

【注意】：RIPA 裂解液的裂解产物经常会出现一小团透明胶状物，属正常现象。该透明胶状物为含有基因组 DNA 等的复合物。在不检测和基因组 DNA 结合特别紧密的蛋白的情况下，可以直接离心取上清用于后续实验；如果需要检测和基因组结合特别紧密的蛋白，则可以通过超声处理打碎打散这些透明胶状物，随后离心取上清用于后续实验。像检测一些常见的转录因子，例如 NF-kB、p53，通常不必进行超声处理，就可以检测到这些转录因子。

## 第二步：上样与电泳

根据靶蛋白分子量选择凝胶和缓冲液系统，通过 SDS-PAGE 分离蛋白。

### 所需材料

| 所需材料 | 货号 | 产品名称 |
|---|---|---|
| Marker | abs924 | 预染蛋白 Marker（10-180kDa |
| 预制胶 | abs9305 | Glass gel 预制胶 Hepes-Tris 4-20%，10wells，1.5mm |
| 缓冲液 | / | abs9305 自带电泳液 |

### 凝胶 / 缓冲液系统选择

| 蛋白分子量大小（KDa） | 凝胶百分比（%） |
|---|---|
| 12-45 | 15 |
| 15-60 | 12 |
| 20-80 | 10 |
| 30-120 | 8 |
| 60-200 | 6 |

**爱必信三种常见预制胶体系特点对比**

| | Tris-Glycine胶 | Bis-Tris胶 | Hepes-Tris胶 |
|---|---|---|---|
| 电泳条件 | 180V, 50-60min<br>220V, 20-30min(搭配abs9952超快电泳缓冲液) | 150V, 40-50min | 150V, 40-50min |
| 分离特性 | 5-200kDa<br>(10kDa小分子的分离能力更优)<br>条带清晰锐利 | 11-245kDa<br>条带清晰锐利 | 3.5-200kDa |
| 缓冲体系 | Tris-Glycine电泳液：<br>abs9955 Tris-Glycine-SDS电泳缓冲液（粉末）<br>abs9953 Tris-Glycine-Native电泳缓冲液（粉末）<br>abs9360 Tris-Glycine-Native电泳缓冲液（10×）<br>abs951 Tris-Glycine-SDS电泳缓冲液（10×）<br>abs9952 Tris-Glycine-SDS电泳缓冲液（10×，超快）<br>高性价比、效率更优，容错率高 | MOPS电泳液：<br>abs9964 Tris-MOPS-SDS电泳缓冲液（粉末）<br>abs9962 Tris-MOPS-Native电泳缓冲液（粉末）<br>MES电泳液：<br>abs9965 Tris-MES-SDS电泳缓冲液（粉末）<br>abs9963 Tris-MES-Native电泳缓冲液（粉末）<br>成本稍高 | Hepes电泳液<br>(赠送5L配套粉末)<br>abs90167 Tris-Hepes-SDS电泳缓冲液（粉末） |
| 转膜方式 | Tris-Glycine转膜液<br>abs950 电转液（10×），常规型，湿转需要冰浴<br>abs9286 快速转膜液（10×），15-35min完成转膜，湿转时需要冰浴<br>abs9940 Western免冰浴快速转膜液（10×）湿转可以不冰浴<br>湿转和半干转 | Bis-Tris转膜液<br>abs90571 Western Bis-Tris专用转膜液（粉末）<br>湿转 | Tris-Glycine转膜液<br>abs950 电转液（10×），常规型，湿转需要冰浴<br>abs9286 快速转膜液（10×），15-35min完成转膜，湿转时需要冰浴<br>abs9940 Western免冰浴快速转膜液（10×）湿转可以不冰浴<br>湿转 |
| 使用情景 | 常规蛋白电泳实验，能够实现对最小5kD蛋白的分离 | 搭配MOPS使用更好的分离大分子蛋白（>30kD），搭配MES使用能更好的分离小分子蛋白（<30kD） | 中性或弱酸性蛋白，适合蛋白表达分析、蛋白纯化后的检测 |
| 材质 | 玻璃板&塑料板 | 塑料板 | 玻璃板 |
| 保存条件 | 2-8℃，12个月 | 2-8℃，12个月 | 2-8℃，18个月 |

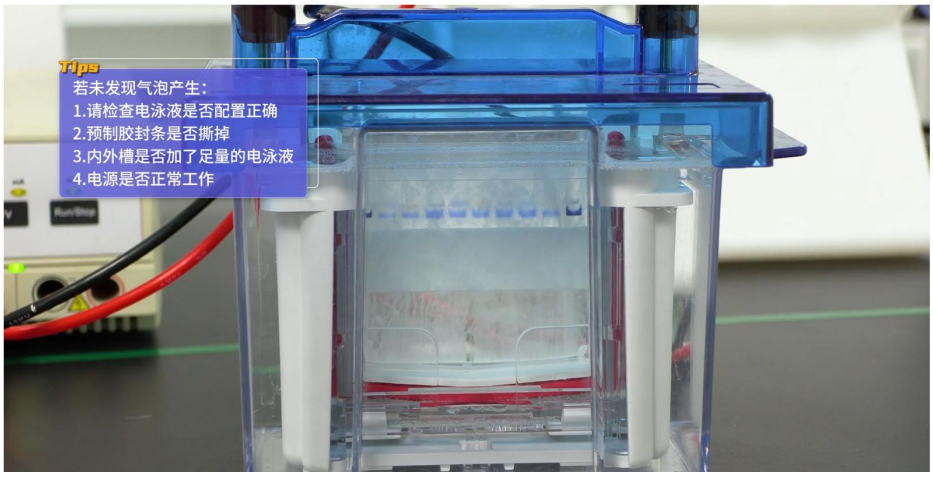
*除了常见体系，爱必信还有小分子蛋白(Tris-Tricine 体系）、大分子蛋白（Tris-Acetate 体系）、非变性电泳（blue native page 体系）、磷酸化（Phos-Key 系列）。

### 操作步骤

1. 将蛋白样本金属浴 95℃，加热 5min，加热完毕后样本冷却至室温，瞬离收集蛋白至管底。
2. 安装凝胶至跑胶装置，正确放置预制胶，按照说明书配制电泳缓冲液，加缓冲液至浸没凝胶，可以静置观察是否漏液，缓慢向上拔出梳子。

【注意】：有些预制胶需要撕掉底部胶条，拔出梳子时，不要造成胶条弯曲

3. 用移液枪在胶孔中分别加入 marker 和样品，推荐细胞样本 20-50ug，组织样本 50-100ug，纯化蛋白 10–500 ng（避免过载，移液器吸头不触碰孔底，防止条带变形）；
4. 连接电极，根据靶蛋白大小优化电压 / 时间（蛋白越大，电压越高、时间越长），一般可 150V 恒压跑 30-50min，观察溴酚蓝跑至底部即可停止。




## 第三步：转膜

将凝胶中的蛋白转移至膜上，支持**半干转移**和**湿转移**，核心要求：**凝胶靠近负极，膜靠近正极**。

### 通用所需材料

| 所需材料 | 货号 | 产品名称 |
|---|---|---|
| 转印膜 | abs932 | PVDF 膜（0.45μm） |
| | abs931 | PVDF 膜（0.22μm） |
| | abs959 | NC 膜（0.22μm） |
| | abs960 | NC 膜（0.45μm） |
| 转膜液 | abs9286 | 快速转膜液（10×） |
| 甲醇 | / | / |

### 转印膜的选择

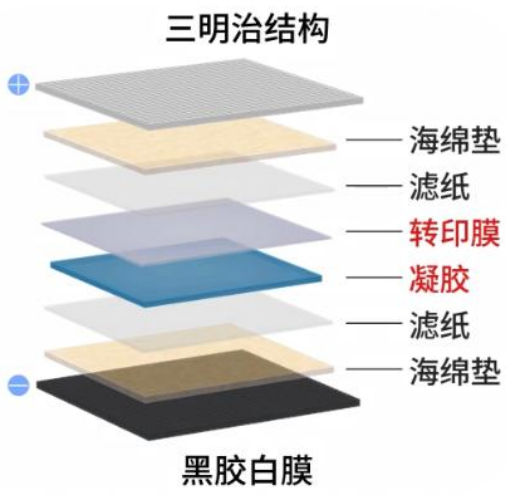
转印膜有 PVDF 膜和 NC 膜两种，PVDF 膜需要用甲醇先激活，NC 膜不需要。分子量小于 20kDa 的选孔径 0.2um 的，大于 20kDa 的选 0.45um。

| 项目 | NC 膜 | PVDF 膜 |
|---|---|---|
| 灵敏度 | 高 | 高 |
| 背景 | 低 | 相对 NC 膜会有荧光背景（背景高可将封闭液浓度提高） |
| 蛋白结合能力 | 相对较弱 80-110ug/cm$^2$ | 蛋白结合能力比 NC 膜强 6 倍 125-200ug/cm$^2$ |
| 材质质地 | 干的 NC 膜比较脆（半干转温度较高 NC 膜容易干，转膜结束后需要尽快放到封闭液中） | 机械强度高 |
| 操作程序 | 缓冲液浸润，无需甲醇激活 | 提前用甲醇激活 |
| 检测方式 | ECL 检测 | 可用 ECL 检测及考马斯亮蓝染色 |
| 适用范围 | ＞ 20kd，0.45μm<br>＜ 20kd，0.2μm | |

1. 等待电泳的期间,我们可以准备下一步需要的转膜液和膜。10×转膜液与甲醇和水的配置比例为 1:2:7。

【注意】：加的顺序是水-转膜液-甲醇，甲醇跟水不要直接接触,避免大量产热；

2. 电泳结束后，把胶拆出来。
3. 在组装三明治时，要注意蛋白的流动方向是从负极到正极,可以先将板夹的负极,一般也就是黑色的那一面放在底层,然后依次放上海绵、滤纸和胶，膜可以提前根据胶的大小,进行剪裁并做好标记
4. PVDF 膜在使用前需要激活，用甲醇浸泡 30 到 60 秒（NC 膜不用激活）
5. 将完成激活的膜覆盖到胶上（注意有些膜要区分正反面），夹取膜时注意要夹到边角，尽量减少镊子和膜的接触，用滚刷赶走气泡确认胶与膜之间无气泡后，可以依次放上滤纸和海绵，扣紧板夹，三明治结构组装完成，装入转印盒。




6. 湿转要倒入转膜液，将转印盒至于冰浴环境中，湿转最稳妥，半干转节省时间（半干转无需额外加入转膜液，一般不需要冰浴）安装时要注意正负极连接，黑色是负极
7. 一般可以按照恒压 70/100V，恒流 200-250mA，1min 1kD，这个条件可以适用于大多数分子量的蛋白(具体参考说明书电流对应时间转膜）

【注意】：通过预染色 Marker 和丽春红染色验证转膜效率，**荧光显色法禁用丽春红 S 染色**（易产生高背景荧光）。

## 第四步:封闭和抗体孵育

封闭膜上非特异性结合位点，通过一抗/二抗特异性结合靶蛋白。

### 通用所需材料

| 所需材料 | 货号 | 产品名称 |
|---|---|---|
| 封闭液 | abs9915 | Western Blot 快速封闭液 |
| | abs9175 | 脱脂奶粉 |
| | abs952 | TBST(10×) |
| | abs9157 | 牛血清白蛋白 |
| 一抗 | 国产抗体王国——“全”，30000+抗体 12000+靶标 | |
| 二抗 | abs20040 | Goat anti-Rabbit IgG-HRP Antibody（470+文献） |
| | abs20039 | Goat anti-Mouse IgG-HRP Antibody（170+文献） |
| 抗体稀释液 | abs954 | WB 专用一抗二抗稀释液 |

### 核心封闭液选择

- **BSA**：成分单一、无磷 / 无生物素、背景干净，适用于磷酸化蛋白、生物素-链霉亲和素系统、AP 检测、定量 WB，无绝对禁忌（部分抗体背景略高）。

- **牛奶：**成本极低、封闭力强、易配制，适用于常规总蛋白、高丰度靶标、HRP 检测（非生物素）、不适用于磷酸化 / 糖蛋白、生物素系统、AP 二抗。
- **商品化稀释液：**使用方便、标准化、批间稳定、含抗体稳定剂，一般情况下兼容性较高。

**封闭**

1. 完成转膜后，将膜移入到平皿或者其他适合的容器中（可以不洗涤膜）。
2. 根据膜的大小，加入适量体积的 Western Blot 快速封闭液，需完全浸没覆盖膜，对于 7.5x 8cm 的膜推荐使用量 5-10ml。
3. 置于水平摇床上，室温条件下振荡孵育 10min。
4. 取出封闭完成的膜，用洗涤液（TBST/PBST）冲洗蛋白膜 2-3 次，即可用于后续抗体孵育。

**抗体孵育步骤（一抗 + 二抗）**

5. 按照供应商的推荐比例稀释一抗并孵育膜，4℃过夜/ 室温 1h，TBST 洗涤 3 次 ×5 min；
6. 按照供应商的推荐比例稀释二抗，覆盖膜后室温轻柔振摇孵育 1 小时；
7. TBST 再次洗涤膜 3 次，每次 5min。

## 第五步：信号检测

根据实验选择**荧光显色法**或**化学发光法**，化学发光法支持 CCD 成像（推荐）和 X 射线胶片成像（无 CCD 时用）。

**通用所需材料**

| 所需材料 | 货号 | 产品名称 |
|---|---|---|
| ECL 封闭液 | abs920 | ECL 化学发光检测试剂盒 |
| | abs9434 | 超敏型 ECL 化学发光检测试剂盒 |
| | abs9435 | 极敏型 ECL 化学发光检测试剂盒 |

**（以 X 光胶片为例）**

1、根据膜的大小，按每 10cm$^2$ 膜混合 0.5ml 溶液 A 和 0.5ml 溶液 B 混匀，配制成发光检测工作液。

2、用平头镊子将膜取出，膜的下缘轻轻接触吸水纸，以去除膜上多余的液体。膜的蛋白面朝上，置于洁净保鲜膜（某些市售保鲜膜包裹印迹膜时可能会淬灭荧光，应选择高质量保鲜膜）上。用吸管将配制的发光检测液转移到蛋白膜上，使其均匀覆盖，室温孵育 2min。

3、用平头镊夹持蛋白膜，膜的下缘轻轻接触吸水纸，以去除膜上多余的液体。膜的蛋白面朝上，包裹于洁净保鲜膜内。轻轻赶出其间的气泡，固定在 X 片暗盒内。

4、在暗室中取一张 X 片置于包裹的膜上，合上暗盒，曝光 30 秒至 1 分钟。立即显影定影，根据其曝光强度，缩短或延长下一张 X 片的曝光时间。