

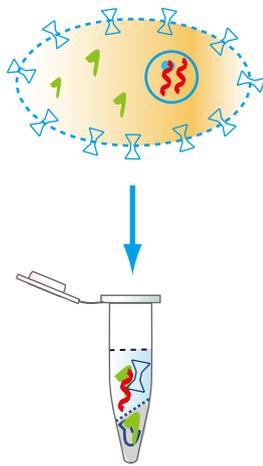
一、总蛋白提取

对目的蛋白进行比较分析时，总蛋白的提取至关重要，如蛋白提取不好会导致后续试验不理想甚至失败，如：信号极弱或无杂交信号、背景高、非特异性条带多等。实验之前需把目标蛋白的信息收集齐全，确定目标蛋白的类型、实验应用种类、样品类型和表达丰度等，选择最佳的蛋白制备方案，从而获得稳定可靠的实验数据。

1. 裂解液的选择

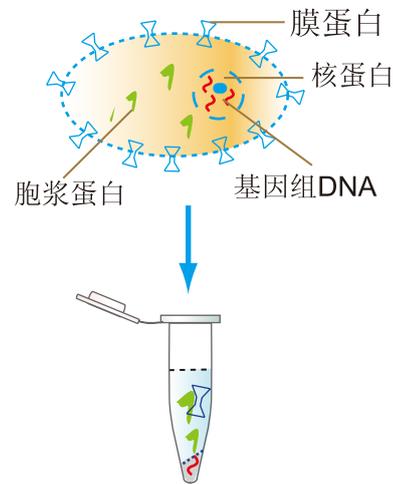
将蛋白质组分高效地从细胞或组织中分离出来，要求保持蛋白的完整性、数据的一致性与可重现性，对于任何蛋白研究技术都是关键的第一步，而蛋白裂解液是提取蛋白最重要的试剂。要根据实验类型选择合适的裂解液：（1）如果是IP试验，要求蛋白要保持天然结构，或具有一定的活性，要选择比较温和（Mild）的裂解液，如RIPA裂解液（WB/IP用）（HaiGene,货号C1901）；（2）如果是Western Blot实验，要选择裂解能力强（Harsh）的裂解液，尤其是目标蛋白为膜蛋白和核蛋白或线粒体蛋白时，因为它能完全裂解细胞核和线粒体，释放更多的蛋白。而如果使用温和的裂解液，是不能获得或只能获得极少量的核蛋白和线粒体蛋白。海基的超强RIPA裂解液（HaiGene, C2501）在传统Harsh裂解液的基础上对其组分进行改良而获得的对动物组织和细胞具有超强裂解能力的裂解液，相比温和型的裂解液能获得更多的蛋白，从而提高后续Western Blot检测的灵敏度，其优势通过下图充分体现。

温和型RIPA裂解液



1. 可很好的释放胞浆蛋白，部分释放膜蛋白和核蛋白。
2. 经普通RIPA裂解后，核蛋白与DNA还紧密结合在一起，离心后会造成核蛋白的丢失。
3. 对于膜蛋白，普通RIPA的破坏力小，不能使膜蛋白与膜充分分离，故离心后造成膜蛋白的丢失。

超强 RIPA裂解液



1. 可以很好的裂解细胞膜及细胞核，从而更完全的释放胞浆蛋白、核蛋白和膜蛋白。
2. 经超强 RIPA裂解后，核蛋白与粘稠的基因组DNA分离，离心后存在于上清中，核蛋白的捕获率高达90%。
3. 超强RIPA可最大程度的破坏细胞膜和变性蛋白，使蛋白与膜分离，防止蛋白与膜复合物在离心后沉淀，从而防止蛋白丢失。

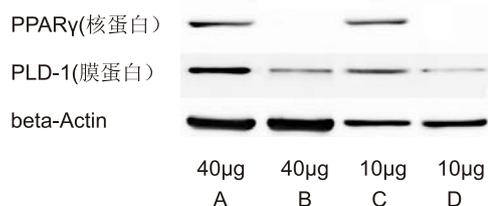


Fig1. 用温和型RIPA裂解液和超强 RIPA裂解液 (HaiGene,货号C2501) 分别提取核蛋白PPAR γ 和膜蛋白PLD-1, 上样量分别为40ug和10ug总蛋白, ECL发光液显色。A/C泳道为超强RIPA裂解液, B/D泳道为温和型RIPA裂解液。由上图表明超强裂解液能更充分的释放核蛋白和膜蛋白, 从而获得更强的信号。

大部分抗体都可识别变性条件下的抗原进行杂交反应, 也有少数抗体只能识别非变性条件下的抗原, 这类抗体在其说明书中有特别说明。因此在提取蛋白时裂解液中不能使用超强RIPA裂解液, 应选用比温和型RIPA裂解液 (HaiGene,货号C1901)。

2. 去除核酸污染的有力工具——Benzonase核酸酶

超强RIPA裂解液因其超强的裂解能力, 使得大量的基因组DNA从细胞核中释放出来, 而这些基因组不是独立存在的, 往往是与核蛋白形成复合体而存在的, 这就使得提取物十分粘稠, 呈鼻涕状, 在提取蛋白的过程中如不能很好的处理这些粘稠的基因组会造成蛋白提取效率的降低及核蛋白的丢失。采取什么方法能够稳定、高效地排除核酸对蛋白质及其下游分析的影响, 也是有经验的Western Blot操作人员获得好的蛋白研究相关数据的诀窍之一。

有人用超声波处理或DNase及RNase消化来减少或消除核酸的影响, 但是由于操作的非标准化, 往往很难评估核酸清除步骤的有效性和数据稳定性。

Benzonase 核酸酶 (HaiGene, 货号C2001) 能高效降解所有形式的DNA和RNA而没有蛋白裂解活性, 能有效降低蛋白样品粘度, 去除蛋白样品中核酸的污染, 增加蛋白产量。



Benzonase核酸酶

降解所有形式的DNA和RNA
降低蛋白样品粘性
增加蛋白产量

实例展示



Fig2. 经RIPA裂解未经Benzonase核酸酶处理的样品, 大量基因组DNA释放出来, 呈鼻涕状。



Fig3. 离心后, 左管为未加Benzonase核酸酶, 有鼻涕状粘稠物质悬浮在管中, 右管为加Benzonase核酸酶, 上清为透明液体。

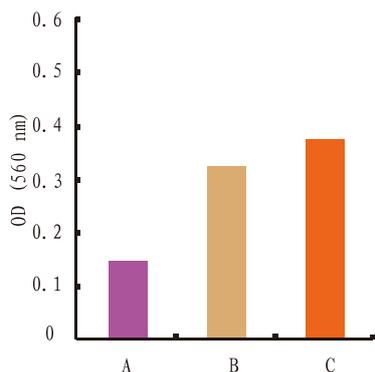


Fig4. 离心收集过夜培养的BL21 E.coli菌体，加入大肠杆菌蛋白提取液，然后分为三组A.B.C,A组不做任何处理，B组超声处理，C组加入Benzonase核酸酶,通过BCA法测定蛋白浓度。

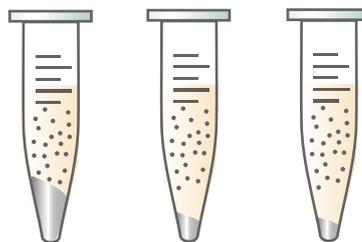


Fig5. 取40mg小鼠的肝脏组织液氮研磨后加入RIPA裂解液，然后分为三组A.B.C,A组不做任何处理，B组超声处理，C组加入2 μ l Benzonase核酸酶，离心后如图所示。

3. 蛋白酶和磷酸酶抑制剂

内源性和外源性的蛋白酶可以在细胞或组织裂解过程中迅速降解蛋白，从而大大降低蛋白的产量和活性，为了避免蛋白水解，保证下游蛋白分析和复杂蛋白研究，加入蛋白酶抑制剂可以确保蛋白免于降解。蛋白磷酸酶可以去除磷酸基团，使蛋白恢复到去磷酸化状态。因此对于信号转导研究者，必须在细胞和组织中抽提蛋白的过程中加入磷酸酶抑制剂，这对于保持蛋白的磷酸化状态非常关键。蛋白酶和磷酸酶抑制剂的选则请参考下表：

抑制剂名称	抑制种类	建议使用终浓度
Aprotinin	胰蛋白酶、糜蛋白酶、血纤维蛋白溶酶	2 μ g/ml
Leupeptin	溶酶体酶	5-10 μ g/ml
Pepstatin A	天冬氨酸蛋白酶	1 μ g/ml
PMSF	丝氨酸和半胱氨酸蛋白酶	1mM
EDTA, EGTA	金属蛋白酶	1mM/5mM
氟化钠	丝氨酸/苏氨酸磷酸化酶	5~10mM
原钒酸钠	酪氨酸磷酸化酶	1mM

4. 组织样品来源的蛋白制备

组织处理方法有液氮研磨法和电动匀浆器匀浆法，两者各有利弊。经液氮研磨的组织成粉末状，几乎不含肉眼可见块状物，因此更容易裂解，且因其操作在超低温条件下，有效防止蛋白降解，但要用到液氮，操作也相对麻烦；电动匀浆法获得的组织往往会含有大小不一的块状物，而且如匀浆时间较长会引起温度升高，从而导致蛋白发生降解，但电动匀浆法因其操作简单可适用于比较柔软的组织如肝脏、肌肉等。组织样品由于富含的细胞类型往往比较多，采集部位稍有差别就会造成待研究细胞数量级上的差别。另外，因其所含细胞的多样性和组织的特异性，相对细胞样品而言，其样品特征相对复杂。因此在制备组织来源的蛋白样品时，要尽量保持组织样品的均一性。因此，组织蛋白样品最好使用裂解能力更强的超强RIPA裂解液（HaiGene，货号：C2501），以获得更高浓度的上样蛋白。

组织样品的蛋白要求每泳道使用~40 μ g的蛋白（细胞样品~10 μ g）。组织蛋白样品提取过程中会释放大量的基因组DNA，如不去除，Western Blot杂交后会导致涂抹状背景，因此强烈建议使用Benzonase核酸酶（HaiGene，货号：C2001）消除核酸污染，它除了能改善杂交背景外，还能降低上样粘度、提高蛋白提取效率、改善电泳带形。

5. 细胞样品来源的蛋白制备

细胞相对组织而言特性简单单一，因此获取蛋白相对容易。有一点需要注意，无论是悬浮细胞还是贴壁细胞，离心收集后要用少量PBS重悬后再加入裂解液。因细胞在PBS中很容易重悬吹散均匀，使得加入裂解液后能更加充分的裂解，从而获得更多的蛋白；而不经PBS重悬直接加入裂解液，细胞容易聚团而不能充分裂解，导致蛋白提取效率降低，不同组间的蛋白提取效率会发生较大差别，从而使得总蛋白浓度存在差异，这就给接下来的组间均一化带来麻烦。

具体操作步骤

（1）组织样品

- ① 用灭菌的手术剪和手术镊将组织剪成小块，称量组织在0.1-0.2 g之间。
- ② 将组织加入加有液氮的研钵中进行研磨，研磨至粉末状后，将冷却状态下的组织粉末尽快转入1.5ml EP管中，称量组织重量，按比例加入超强RIPA裂解液（含终浓度为1mM的PMSF，使用前添加）和1~5 μ l Benzonase 核酸酶，每20mg组织加入150 μ l裂解液和1 μ l Benzonase。
- ③ 加入裂解液后，用力颠倒EP管，使组织粉末尽快分散，以免其聚集成团。然后置于漩涡仪上震荡几次，使组织尽量分散均匀。
- ④ 室温放置30min后，13000rpm离心10min，小心吸取上清即为提取的组织总蛋白。

注：如果组织量非常稀少不适用研钵研磨的，可先将组织剪成肉糜状，然后用3-4层锡箔纸包裹好，置于研钵中，放入少量液氮，快速敲击（也可着力轻捻，避免弄破锡箔纸），反复多次直到组织呈粉末状，然后按照上述步骤进行提取总蛋白。

（2）细胞样品（6孔板为例）

- ① 贴壁细胞融合度在85~95%为最佳，PBS清洗3次后，胰酶消化完毕后，加入0.5ml完全培养基终止消化，将细胞吹散，转入1.5ml EP管中。
注：如实验研究的是信号通路相关蛋白，需收集细胞培养液，8000 rpm离心5min，弃上清（含有凋亡和死亡细胞），留取底部细胞沉淀，然后加入到消化好的细胞中进入步骤（2）。
- ② 8000rpm离心5min，弃上清液，留底部细胞团块。
- ③ 加入1ml PBS，轻轻颠倒EP管几次（不用吹吸，只是洗涤细胞团块），8000rpm离心2min，弃PBS，用吸头吸取干净多余液体。

④ 加入50 μ l PBS重悬细胞，吸头吹打使细胞松散均匀，加入150 μ l超强RIPA裂解液（含终浓度为1mM的PMSF，使用前添加）和1 μ l Benzonase 核酸酶，轻弹离心管壁，室温放置30min。

⑤ 13000rpm离心10min，小心吸取上清即为提取的细胞总蛋白。

6. 蛋白浓度测定

蛋白浓度测定推荐使用BCA法蛋白浓度测定试剂盒（HaiGene，货号C3001），蛋白提取后进行浓度测定至少有两个指导作用：（1）组间蛋白样品浓度的均一化：在后续要检测比较组间蛋白表达变化时，需要调整蛋白浓度尽量一致，如获得的蛋白浓度相差较大时，需要通过稀释浓度高的样品至统一值，这样减少后续通过内参调整组间蛋白浓度的次数。（2）对后续实验结果分析具有指导意义，如杂交时如获得的信号很弱或无信号，是否是由于蛋白浓度过低造成的。另外，标准曲线每次做蛋白浓度测定时都需要做。测定浓度后，蛋白可分装冻存于-20 $^{\circ}$ C（短期）或-80 $^{\circ}$ C（长期），避免反复冻融。

具体操作步骤

（1）按照说明书用PBS将标准品BSA稀释至2000、1500、1000、750、500、250、125、25、0 μ g/ μ l（其中0 μ g/ μ l做为归零样品）。

（2）按照说明书将BCA Reagent A和B液按体积比50:1混匀（3ml~5ml），待用。

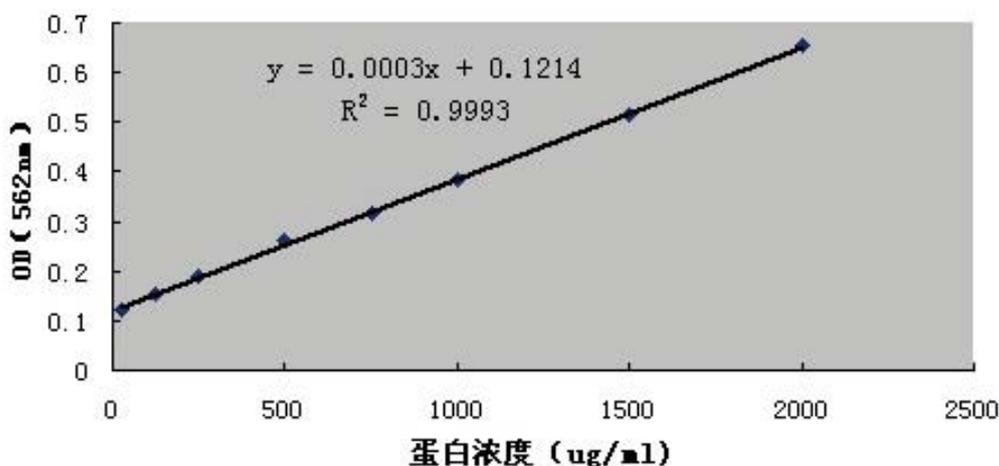
（3）每孔ELISA板中加入200 μ l AB混合液，将标准品和样品25 μ l，分别加入到混合液中，混合均匀。

（4）放置到培养箱中，37 $^{\circ}$ C孵育30 min，然后室温静置10 min。

注：孵育过程中，如颜色很快变成深紫色，需将样品用PBS稀释3-5倍后再测。

（5）562nm处检测吸光度，并绘制标准曲线，根据公式计算出样品蛋白浓度。如测出的样品OD562=0.8（即y=0.8），则对应的X值（样品蛋白浓度）=(0.8-0.1214)/0.0003=2262 μ g/ml（即2.3 μ g/ μ l）。

BSA标准工作曲线



二、电泳和转膜

1. 内参的选择

用Western Blot比较不同条件下或者不同组织中，目的蛋白表达量的相对多少，前提条件是相同的上样量，这样才有比较的基础；特别表达量不高时，上样量的差别就很可能影响最终结果的分析，选择内参可解决上述问题。进行内参的检测，可以校正蛋白质定量、上样过程中存在的实验误差，进而保证实验结果的准确性；此外使用内参可以作为阳性对照，检测蛋白转膜情况、整个Western Blot显色或者发光体系是否正常。根据样品类型和蛋白在细胞中的定位，内参选用情况如下表：

内参名称	样品类型	分子量 (KDa)	内参名称	样品类型	分子量 (KDa)
β -Actin	全细胞/胞浆	43	VDCA1/Porin	线粒体	31
GAPDH	全细胞/胞浆	~36	COXIV	线粒体	16
Tublin	全细胞/胞浆	55	Lamin B1	细胞核	66
			TBP	细胞核	38

2. 准备电泳上样

将制备好的蛋白样品进行变性，通常是按比例加入5XSDS Loading Buffer (HaiGene,货号S0137)，95-100℃加热5min。对于多通道膜蛋白，因其在高温下容易聚集，可采取70℃ 5-10min。另外，5X浓度的SDS loading buffer相对市面上2X的可降低对蛋白样品的稀释倍数，对于珍贵稀少的样品显得更加实用。

3. 电泳

按配方配制SDS-PAGE胶或根据SDS-PAGE凝胶制备试剂盒 (HaiGene, 货号S0179) 配制，根据蛋白的分子量大小选择不同浓度的分离胶。常用的电泳缓冲体系为Tris-甘氨酸，电泳选择恒压，观察指示染料的电泳位置来判断电泳的时间。

4%浓缩胶配方

组分	3ml	6ml	单位
30%丙烯酰胺	0.397	0.794	ml
1M Tris-HCl (pH6.8)	0.375	0.75	ml
水	2.215	4.43	ml
10%SDS	30	60	μ l
10%APS	40	80	μ l
TEMED	3	6	μ l

分离胶配方

组分	8% (10ml)	10% (10ml)	12% (10ml)	15% (10ml)	单位
30%丙烯酰胺	2.67	3.32	4	5	ml
1M Tris-HCl (pH8.8)	3.75	3.75	3.75	3.75	ml
水	3.48	2.83	2.15	1.15	ml
10%SDS	100	100	100	100	μl
10%APS	75	75	75	75	μl
TEMED	7	7	7	7	μl

注意：（1）制胶的板子一定要冲洗干净。

（2）10%APS保质期为1~2个月，容易失效，可称取粉末冻存于-20℃冰箱。

（3）上样时，不要把tip深入胶孔过深（或者采用细的尖端拉长的专用上样枪头），可能会错开胶和玻璃板，样品会泄露。

（4）未加样的孔应加SDS Loading buffer平衡，否则最外侧条带会拉宽变形。

（5）不同样品上样时，可考虑将样品体积调成一致或类似，以免不同泳道条带宽窄不一。

（6）每孔上样量不可太多，以10-20ul为佳，上样过多会导致杂交条带连在一起。

具体操作步骤

（1）按上表配制SDS-PAGE凝胶，配好的凝胶可在4℃存放一周左右。

（2）BCA浓度测定后，一般将蛋白浓度调整至1-2μg/μl之间。将5XSDS Loading Buffer按比例加入到蛋白样品中，95-100℃加热5min，室温冷却。

（3）吸取样品10μl（最多30ul）加入至凝胶孔中，浓缩胶一般采用80V，分离胶采用150V，根据目标蛋白的分子量和溴酚蓝指示线的位置确定电泳时间。

注意：① 上样时请勿用力过大，以免剥离玻璃板和凝胶而造成样品渗漏。

② 上样前检查每个胶孔是否有碎胶，如有要将其冲掉。

③ 玻璃板底部不要有气泡，以免造成电泳条带弯曲。

④ 不同样品上样量尽量调整一致，未加样的孔要加入同体积的1XSDS loading Buffer 平衡。

⑤ 电泳时，浓缩胶一般采用低电压（50-80V），分离胶采用较高电压（120-150V），这样能使样品浓缩效果好，杂交条带漂亮。

3. 转膜

转膜最常用的方法为湿转和半干转，两者各有利弊。湿转适合所有的蛋白，转膜效率最佳，但需要配制转膜液，且重复使用会影响转膜效率，操作时间长；半干转适合分子量较小的蛋白，省时、省试剂。对于分子量大的蛋白(>150KD)，湿转的效果明显好于半干转。

常用的膜有NC膜和PVDF膜，两者的区别在于：PVDF膜在转印之前需要用甲醇预处理活化膜上的正电基团，然后置于转膜液中平衡，而NC膜只需在转膜液中平衡几分钟即可；NC膜对小分子蛋白(<20KD)的截留能力更强，但干透的NC膜极容易破碎；此外，如果抗原表位需要维持其三维结构才能被抗体识别，应该优先选择NC膜。

转膜效率的监控可通过预染Marker实现，推荐使用预染发光Western Marker120(HaiGene, C0301)（对于该Marker，后续会有详解）。转膜推荐使用恒流，分子量<200KD的蛋白电流在100-200mA，1h即可完成转膜。对于大分子量蛋白>150KD和小分子量蛋白<20KD的转印，要注意以下几点：

(1) 分子量>150KD蛋白

- SDS-PAGE电泳时应选择低浓度浓缩胶，10%以下的。另外因其浓度低，胶会特别易碎，故转膜时要小心处理。
- 转膜时高分子量蛋白容易发生沉淀，从而影响转膜。解决办法：转膜液中SDS的浓度添加至0.1%，降低转膜液中甲醇的浓度至10%。
- 降低转膜液中甲醇的浓度可有效提高大分子量蛋白的转膜效率。
- 在使用NC膜时，转膜液中的甲醇是必需的；在使用PVDF膜时，转膜液中无需添加甲醇，只在转膜前活化膜时需要。

(2) 分子量<20KD蛋白

- 对于分子量很小的蛋白，可将转膜液中的SDS去除。
- 转膜液中甲醇的含量不小于20%，或适当增加甲醇的含量至25%。

具体操作步骤

(1) 提前将裁切好的NC膜、滤纸和海绵浸泡于转膜液中，浸泡2~5min即可，PVDF膜要提前用甲醇处理15s。

(2) 电泳结束，制作转膜三明治：黑色夹面（负极）在下面，依次铺上海绵pad、两层滤纸、凝胶、NC膜、两层滤纸、海绵pad，铺上膜之后，用玻璃棒推赶气泡。

(3) 放至转膜槽，加入转膜液，100mA恒流1h。

(4) 转膜完毕后，观察膜上的预染蛋白marker条带是否清晰来判断转膜是否成功。如预染Marker条带不清晰或没有条带，说明转膜效率不高或出现问题，要及时查找原因。

注意：① 裁切滤纸时，尽量和膜的大小一致，滤纸不要重复使用太长时间。

② 转膜时因电流较大，建议在低温条件下转膜，高温会局部溶胶或降低转膜效率。

③ 电泳结束取出凝胶后，可将凝胶在转膜液里放置几秒，这样可以洗去胶表面的SDS，以免影响转膜效率。

三、膜的预处理和封闭

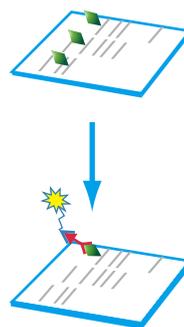
1. 膜的预处理

在Western Blot实验中往往会遇到信号弱甚至无信号的问题，除了抗体效价低外，另外一个重要原因是蛋白本身的表达丰度低。许多研究者花费了大量的时间和经费优化实验条件以求得到更好的结果，结果却往往差强人意。海基凭借十多年的实践经验研发出了Western Blot信号增强剂（HaiGene，货号M2501），它是一种膜处理液，通过恢复抗原识别位点、增强抗体对抗原的识别能力而提高检测灵敏度。应用该信号增强剂可以有效增强抗体与抗原的亲和力，提高抗体对抗原识别的特异性，提高Western Blot的检测灵敏度，从节约抗体的使用量。该信号增强剂尤其适用于低丰度蛋白的Western Blot检测，约可以提高检测灵敏度3~10倍。

- **高灵敏度：**信号强度比传统方法可提高3~10倍。
- **高特异性：**对于效价低的抗体，可提高其信噪比。
- **低背景：**背景不会因信号强度的提高而提高。
- **适用性广泛：**既适用于NC膜也适用于PVDF膜，

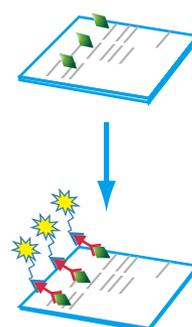
既适用于化学发光检测也适用于荧光检测。

传统Western Blot



大部分抗原处于封闭结构状态，抗体不容易识别，信号较弱

信号增强剂处理



大部分抗原处于可被抗体识别状态，信号+++

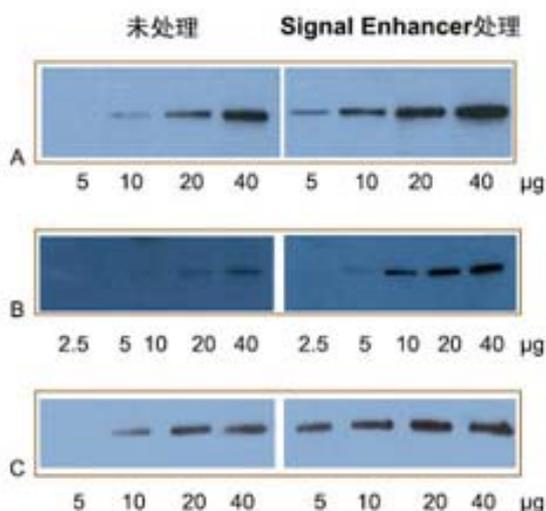


Fig6. 液氮研磨小鼠心肌和脑组织，RIPA裂解定量后分别取不同量的样品SDS-PAGE电泳，转膜后一抗二抗孵育，增强型ECL显色液曝光。左边为传统方法组，右边为经Western Blot信号增强剂处理组。

A: 心肌组织，一抗AKT单克隆抗体（CST, #9272）
B: 脑组织，一抗Calmodulin多克隆抗体(CST, #4830)
C: 脑组织，一抗ANT (N-19)多克隆抗体(Santacruz, sc-9299)

2. 封闭

在进行抗原抗体杂交之前，需要先对转印膜进行封闭，以防止免疫试剂的非特异性吸附。选择合适的封闭剂可以降低背景的同时不降低信号强度。常用的封闭剂有牛血清蛋白（BSA, 3.0%）、5%脱脂奶粉和0.5~1%酪蛋白。针对不同的样品、不同的目标蛋白和不同的抗体，封闭剂不是恒定不变的，不存在一种最理想的封闭剂能适用于所有的抗原抗体杂交反应，从而获得低背景的同时，信号达到最强。最常用的封闭剂是5%脱脂奶粉，用TBST溶解，室温1h或4℃过夜。封闭时间过长或封闭剂的浓度过高都会降低检测灵敏度，因此信号杂交弱的时候，可考虑将封闭剂的使用浓度降低1~2倍。

具体操作步骤

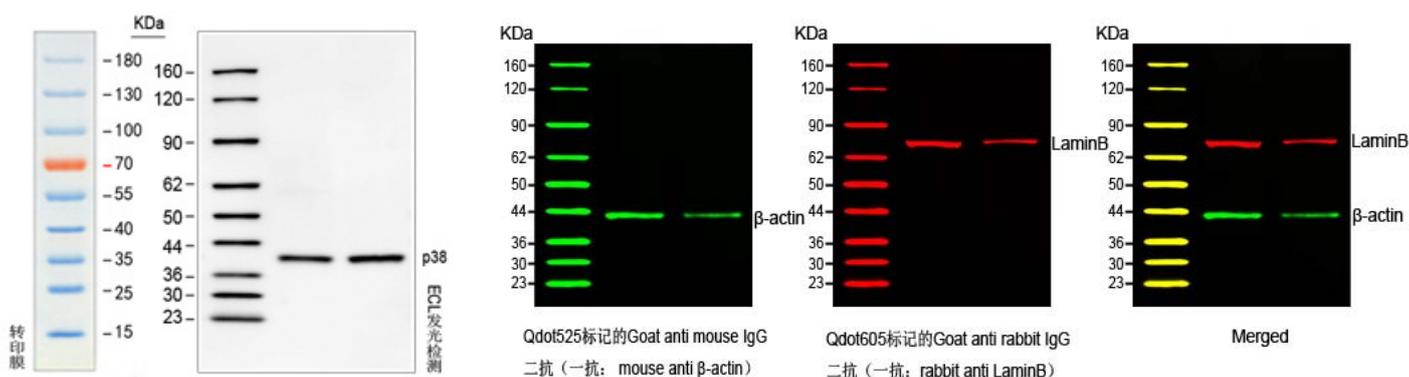
- （1）转膜结束后可直接将膜转入10ml Western Blot信号增强剂中，室温孵育20min。
- （2）孵育结束后，将膜转至TBST配制的5%脱脂奶粉中进行封闭，封闭时间室温1h或4℃过夜。
- （3）将膜置于1XTBST中室温洗涤1次，5min。

四、一抗孵育

1. Western Blot Marker的使用

预染发光Western Blot Marker 是专门为Western Blot 试验设计的分子量标准。传统的Western Blot 试验需要使用预染蛋白Marker来跟踪检测阳性抗原信号和转膜效率。但预染蛋白Marker无法在胶片上曝光，曝光信号需要根据膜上的预染蛋白Marker来判断，HaiGene自主研发的第二代预染发光Western marker综合了预染marker和发光marker的优势，既能通过预染marker检测转膜效率，又能在胶片上与目的蛋白同时曝光，这样就使得目的蛋白的判断更加方便而准确。

HaiGene的预染发光Western Marker 由9种发光蛋白和9种预染蛋白组成，其中9种发光蛋白分别为23、30、36、44、50、62、90、120和160KDa，它们均可与抗体结合，因此能与抗原在同一张胶片上曝出信号，阳性信号可以直接通过Western Marker的位置来判断；9种预染蛋白分别为15、25、35、40、40、55、70、100、130和180KDa，其中70KDa为红色，其他为蓝色，用于SDS-PAGE胶电泳时控制蛋白的电泳分离率和监测蛋白转膜效率。该预染发光Western marker可适用于荧光检测和化学发光法Western Blot检测。



2. 一抗孵育

Western Blot成功与否最关键的一步即一抗孵育，而抗体孵育成败与多种因素有关，包括：抗体本身的效价和背景强弱、封闭剂的选择和使用、一抗稀释液的选择、孵育时间和孵育温度等。就商业化抗体本身而言，不同厂家的抗体质量良莠不齐，因此在选择抗体时要注意以下几点：（1）可查阅参考文献，分析文献中抗体的使用情况，如同一应用引用次数较多，而得到的效果又较好的抗体可考虑使用；

（2）在查阅厂家抗体说明书时，在厂家给出的实例中看是否有内源性蛋白的杂交示意图，而不是重组表达的抗原或IP富集抗原后的杂交结果；（3）看杂交结果是否是整张膜标记的示意图，而不是只在目的分子量附近的截图；（4）阳性对照是否是全长蛋白而不是制备抗体时高表达的多肽或蛋白。封闭剂使用浓度过高或孵育时间过长时会导致杂交信号很弱，这就要调整封闭剂的使用浓度或孵育时间，常用的为5%BSA和5%脱脂奶粉，如出现上述情况可适当调节浓度至1%BSA和3%脱脂奶，孵育时间室温1h或4℃过夜。关于一抗稀释液，有直接使用封闭液稀释的，也有商业化稀释液，推荐使用海基的Western一抗稀释液（HaiGene,货号M3001），经多次实验反复验证，稳定性好，背景低，对杂交信号无明显降低；用封闭液稀释的务必降低其浓度，如脱脂奶可降至1%，孵育时间为室温1-3h或4℃过夜。接下来，我们以实例的方式来讨论一抗孵育中经常出现的问题。

（1）无背景无信号或信号很弱（即“白板”）

排除样品本身和ECL检测的因素（检测部分有详述），主要原因可能是抗体本身效价不高，或者抗体稀释液中封闭剂浓度过高，竞争结合时封闭剂蛋白完胜特异性的一抗，导致信号很弱或无信号。

解决办法：①增加抗体用量，②降低一抗稀释液中封闭剂的浓度，③信号增强剂处理，④选择效价高的抗体。

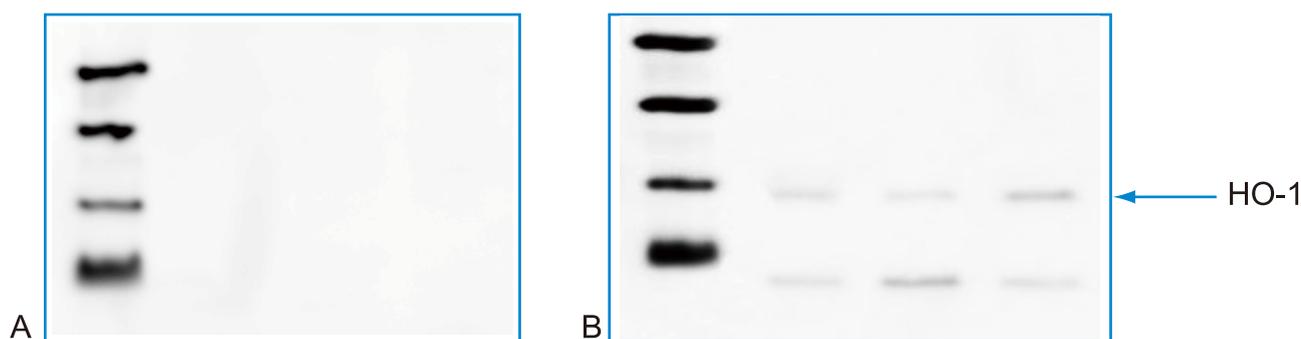


Fig8. 小鼠睾丸组织，经超强RIPA裂解后，电泳转膜后进行Western Blot。一抗：HO-1兔多克隆抗体（博士德，货号BA0605），4℃过夜孵育，二抗：羊抗兔IgG[HRP]，1:10000，室温孵育1小时，超敏ECL发光液（HaiGene，M2301）显色。

A: 封闭液为5%脱脂奶粉，一抗1:400，一抗稀释液为3%脱脂奶粉。

B: 封闭液为5%脱脂奶粉，封闭前用Western信号增强剂（HaiGene，货号M2501）处理15min，一抗1:100，一抗稀释液为Western一抗稀释液（HaiGene，货号M3001）。

(2) 背景很深，没有目的条带或目的带很弱

排除二抗、ECL发光液和胶片曝光等因素，最主要的原因为一抗消价不高，而抗体稀释液中封闭蛋白的拮抗作用又没有完全发挥，此时无法有效识别抗原的一抗会粘附转印膜的任何位置，显影后整张膜全黑。
解决办法：①更换封闭液；②更换一抗稀释液；③信号增强剂处理，④选择效价高的抗体。

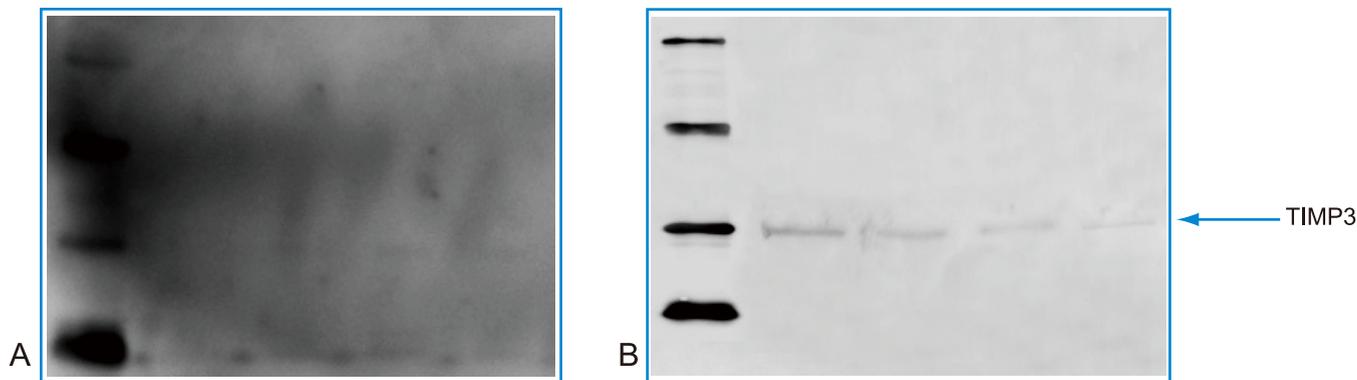


Fig9. 小鼠心脏组织，经超强RIPA裂解后，进行Western Blot。一抗：TIMP3兔多克隆抗体（Santacruz，货号sc-30075），4℃过夜孵育，二抗：羊抗兔IgG[HRP]，1:10000，室温孵育1小时，超敏ECL发光液（HaiGene，M2301）显色。

A: 封闭液为5%BSA,一抗1:400,一抗稀释液为5%BSA。

B: 封闭液为5%脱脂奶粉，封闭前用Western信号增强剂（HaiGene，货号M2501）处理15min，一抗1:200，一抗稀释液应用海基Western一抗稀释液(HaiGene, 货号: M3001)。

(3) 背景很深，目的信号强，且有杂带。

排除二抗、ECL发光液和胶片曝光等因素，最主要原因是一抗的浓度使用过高，孵育时间过长。
解决办法：①降低一抗使用比例；②减少一抗孵育时间；③更换一抗稀释液

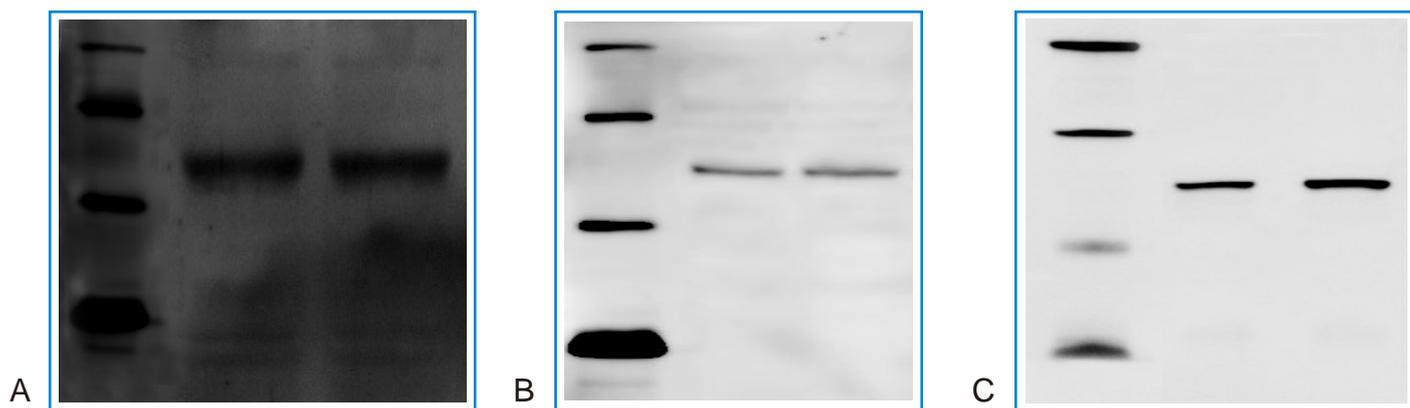


Fig10. 小鼠心脏组织，经超强RIPA裂解后，进行Western Blot。一抗：PPAR γ 兔多克隆抗体（abcam，货号ab27649），4℃过夜孵育，二抗：羊抗兔IgG[HRP]，1:10000，室温孵育1小时，超敏ECL发光液（HaiGene，M2301）显色。

A: 封闭液为5%BSA,一抗1:500,一抗稀释液为海基Western一抗稀释液(HaiGene, 货号: M3001)。

B: 封闭液为5%脱脂奶粉，一抗1:1000，一抗稀释液应用1%脱脂奶粉。

C: 封闭液为5%脱脂奶粉，一抗1:1000，一抗稀释液为海基Western一抗稀释液(HaiGene, 货号: M3001)。

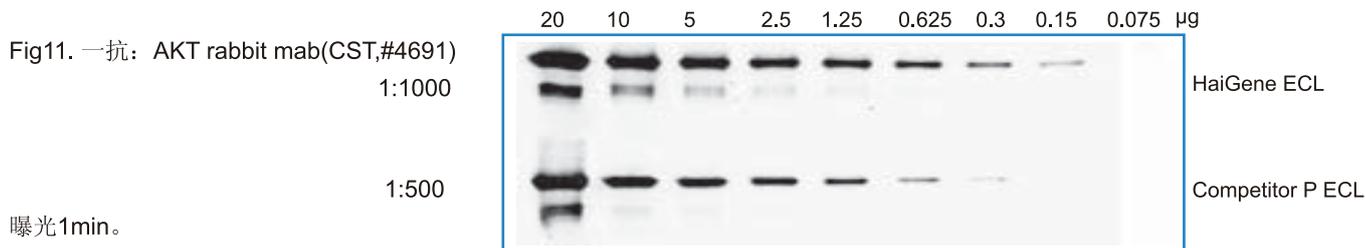
五、二抗孵育

标记有HRP的二抗与抗原抗体复合物结合，通常室温孵育30min~1h。二抗选择时要注意一抗的来源种属，稀释比例通常为1:10000以上。二抗浓度过高，会引起杂交背景加深，非特异性条带出现等问题。二抗孵育液可使用商业化的Western二抗稀释液（HaiGene,货号M3101），自己配制也可，如含1%脱脂奶粉的TBST，但务必不要加入叠氮钠，因其破坏HRP而使二抗不能发挥作用。在Western Blot实验中强烈推荐使用预染发光Western Marker120，一个重要的原因就是它可以检测二抗孵育的过程中有没有异常，如果二抗有问题，此Marker的发光条带是不发光的（预染条带可正常观察）。如发光Marker条带没有显示，即可说明二抗出了问题，因此优化条件的过程中，就无需再做其它浪费时间的摸索了。

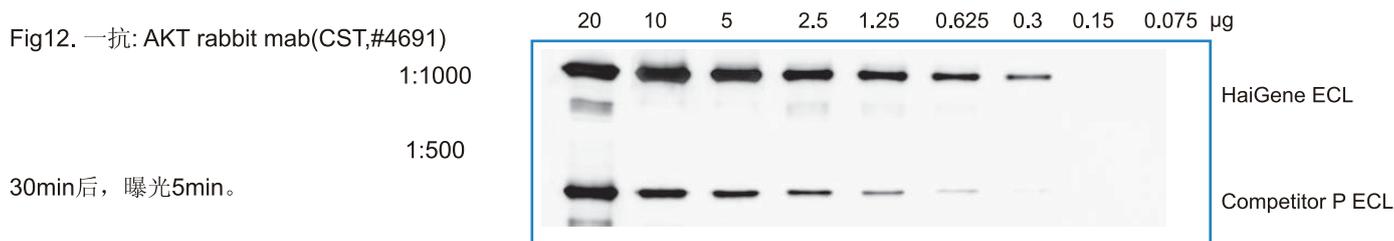
六、信号检测

Western Blot结果的好坏与否与ECL发光液的选择有着密切关系，好的ECL发光液不仅可曝光得到漂亮的目的条带，还可节省昂贵的抗体，且不发生淬灭现象，发光持续时间长。海基超敏ECL发光液（HaiGene, 货号M2301）用于Western、Northern和Southern blot分子杂交的化学发光检测，比传统化学显色法灵敏度高，可达pg水平，发光持续时间长，信号30min内不会发生明显降低。

1. 灵敏度高，信噪比高，节省抗体



2. 发光持续时间长，30min后信号无明显降低。



ECL在使用过程中，如操作不当会出现不显影、背景深、荧光信号快速淬灭、ECL失效等问题。这就要求实验者要操作过程中注意以下细节问题：（1）加ECL之前务必把膜用TBST漂洗干净，并把膜上多余的液体尽量弃除掉；（2）放置膜的表面务必干净，不要有任何化学试剂残留；（3）加ECL发光液之后要让其反应1~2min，如检测信号强的可缩短时间，再移至新保鲜膜之前务必把多余的ECL弃除干净；（4）传统暗室压片请注意在膜上覆盖保鲜膜时尽量一次覆盖好，切勿重复覆盖，保鲜膜务必干净。

传统暗室压片需要注意，在压片过程中可以保持微弱的红光，压片时间根据信号强弱来定，对于信号极弱的要压的时间久一些；压片之后要放入显影液和定影液进行显影定影。现在很多实验室有化学发光成像系统，如LAS-4000，很方便的即可将杂交信号成像，相比暗室压片操作简单，无需显影定影，成像时间、成像次数都可自动设定，对于较弱的信号，捕捉能力更强。

具体操作步骤

- (1) 将膜置于按比例加好一抗的Western一抗稀释液中（或5%脱脂奶粉），4℃孵育过夜（或室温2-3h）。
- (2) 将膜置于1XTBST中室温洗涤3次，每次5min。
- (3) 将膜转入按比例加好二抗的Western二抗稀释液中（或1%脱脂奶粉），室温1h。
- (4) 将膜置于1XTBST中室温洗涤3次，每次5min。
- (5) 取等量 ECL Reagent A和B混合均匀，将混合液加至膜上，尽量覆盖整个膜，室温放置1-2min，用镊子夹住膜的一角将其倾斜于吸水纸上，将ECL液体尽量移除干净。
- (6) 暗室压片或化学发光成像系统成像：
 - ① 暗室压片：膜上有发光marker条带，在暗室中肉眼可见发光marker条带，将胶片快速取出置于膜上方，不要再移动胶片，防止重影。取出胶片时动作也要快，防止重影。胶片的压取时间，要根据目的蛋白信号强弱来判断。如信号肉眼可见，压片时间可稍短些。如肉眼看不到信号的，可连压多张胶片，压片时间递增，对于信号极弱的可最长压30min-1h，不必担心ECL发光液，海基超强ECL发光液最长可发光1h。
 - ② 化学发光成像系统成像：将弃掉ECL的膜置于干净的保鲜膜表面上，放入成像系统中即可成像，可自动选择成像的时间和次数。

七. Stripping

Western 一抗二抗去除液通常用于转印膜的再利用。在Western Blot中完成了一抗二抗结合和后续的化学发光检测后，有时还需要检测 Actin、Tubulin 等内参蛋白或检测其它蛋白进行比较。海基 Western 一抗二抗去除液（HaiGene,货号：M2401）可变性已经与抗原结合的一抗和二抗，使其失活，从而将同一张膜再用于其它抗体的杂交。与其它类型的一抗二抗去除液相比，该试剂不破坏抗原，处理过程中膜上抗原几乎零丢失，因此在重复利用膜检测其他蛋白时灵敏度更高，同一张膜可stripping 3次左右。但如果同一张膜反复多次Stripping，也会导致检测信号变弱。

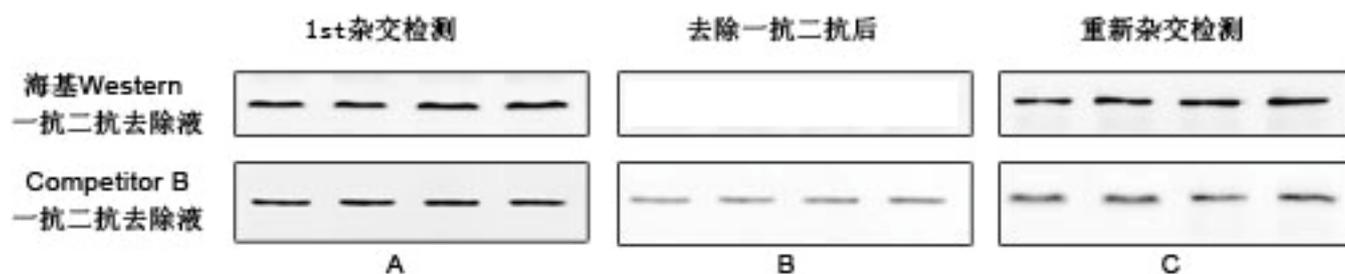


Fig13. Hela细胞裂解物SDS-PAGE电泳、转膜，5%脱脂奶粉封闭，一抗兔抗TGF- β 多克隆抗体（Boster，BA0290）1:200室温孵育2h，二抗孵育30min后，海基超敏ECL发光液（HaiGene，货号M2301）检测信号，A列为检测结果；然后分别用海基Western一抗二抗去除液和Competitor B公司的一抗二抗去除液进行stripping 15min，TBST洗三次后，5%脱脂奶粉封闭，然后加二抗进行孵育，ECL检测信号，B列为检测结果；再分别stripping 15min后，依次进行封闭-一抗孵育-二抗孵育-ECL检测，C列为检测结果。

由上图说明，海基Western一抗二抗去除液（HaiGene,货号：M2401）去除抗体较B公司效果更好，去除更彻底，杂交后信后无明显降低。

具体操作步骤

- (1) 将杂交完毕的膜置入1XTBST中，室温漂洗3次，每次5min。
- (2) 加入适量Western一抗二抗去除液（至少可覆盖膜表面），室温孵育15min。
- (3) 孵育结束后，弃去Western一抗二抗去除液，置于1XTBST中，室温漂洗4次，每次5min。
- (4) 然后进行封闭等后续操作，直至完成Western Blot。