

Western Blotting 分析

上海中医药大学肝病研究所
刘成海 博士

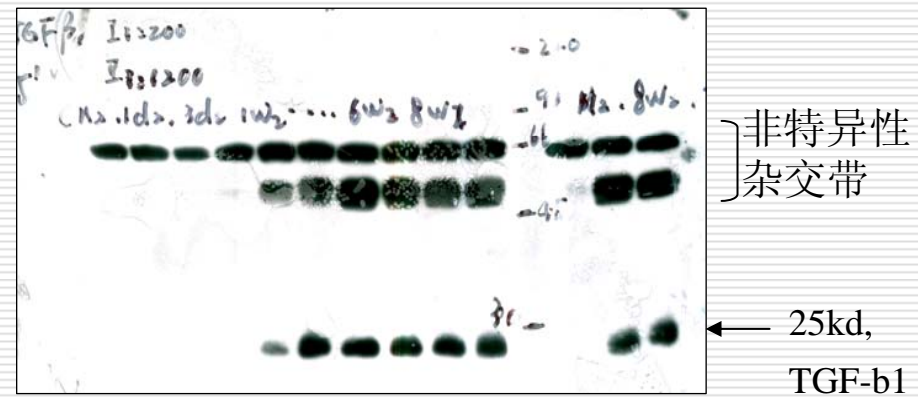
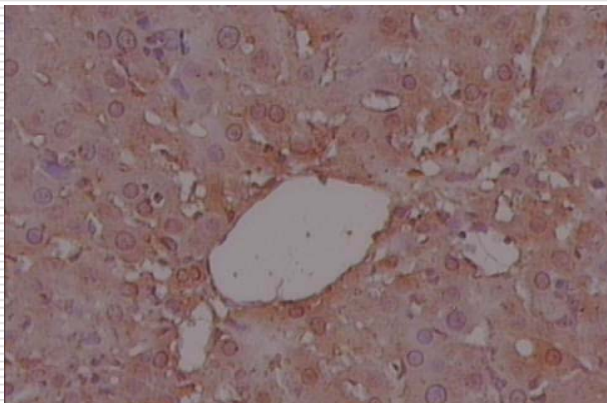
提纲

- 蛋白质印迹的意义、原理与特点
- 蛋白质样本制备与浓度检测
- 蛋白质印迹检测
 - PAGA 凝胶电泳
 - 转膜
 - 封闭
 - 抗体孵育
 - 显影、成像与分析
- 常见问题

Western Blotting的意义

- 对目的蛋白质的表达鉴定、定量分析。
- 免疫组化+图像分析不是也可以定量吗？
 - 主要在于表达部位与定性分析，受抗体特异性、标本与图像取样的抽样误差，定量误差大，不能代替生化定量分析方法。

免疫组化染色



Western Blotting的发展历史

- 基于1975年Southern的DNA印迹法，1979年由Houvert等4人小组首先将电泳分离的蛋白组分转移到固定膜上
- 尔后，Towbin进行了改进，现在所有方法包括Buffer等基本采用Towbin法。
- 近年主要在化学发光显影（ECL、SCL）、荧光显影与分析有很大发展，并出现了培养细胞原位自动的western blotting分析系统。

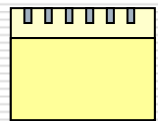
蛋白印迹（western blot）法原理

- 凝胶电泳与固相免疫相结合的一种免疫学技术，通过电泳分离蛋白质组分，将其转移到固定基质，并经抗体探测目的蛋白质的表达。
- 与其它印迹法相似，大致包括4个步骤：
 - 电泳分离-抗原物质经凝胶电泳分离；
 - 固化转移-分离组分从凝胶上转移到固相基质，如硝酸纤维素膜、PVDF等；
 - 封闭-非特异/活动性分子（BSA、奶粉等）封闭固定基质上未吸附蛋白质的区域；
 - 免疫反应-特异性抗体、多个步骤的探测已被分离的特殊抗原。

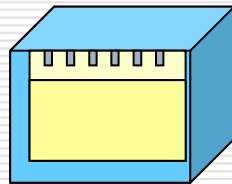
Western Blotting的基本过程



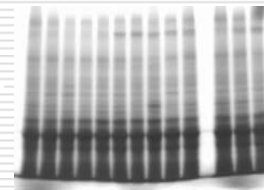
样本制备



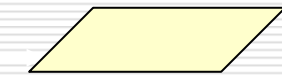
制胶
上样



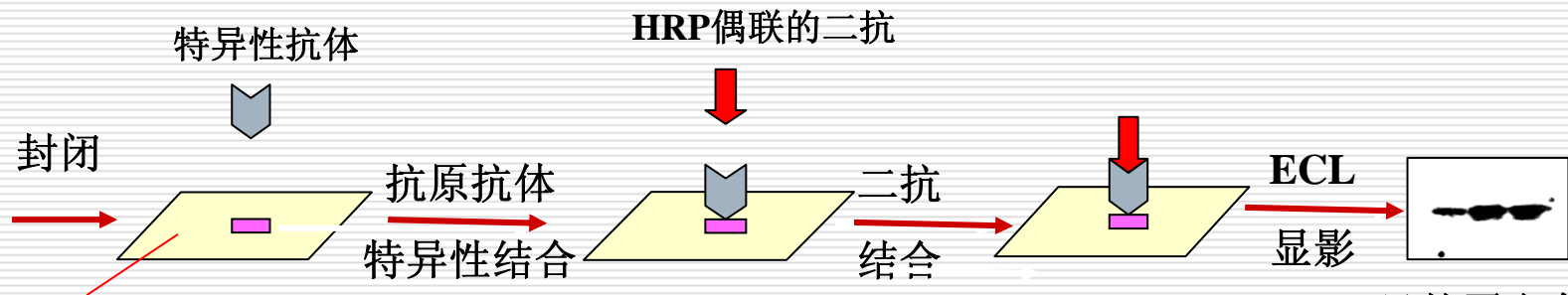
SDS-PAGE
变性电泳



不同蛋白泳动
至其相应位置

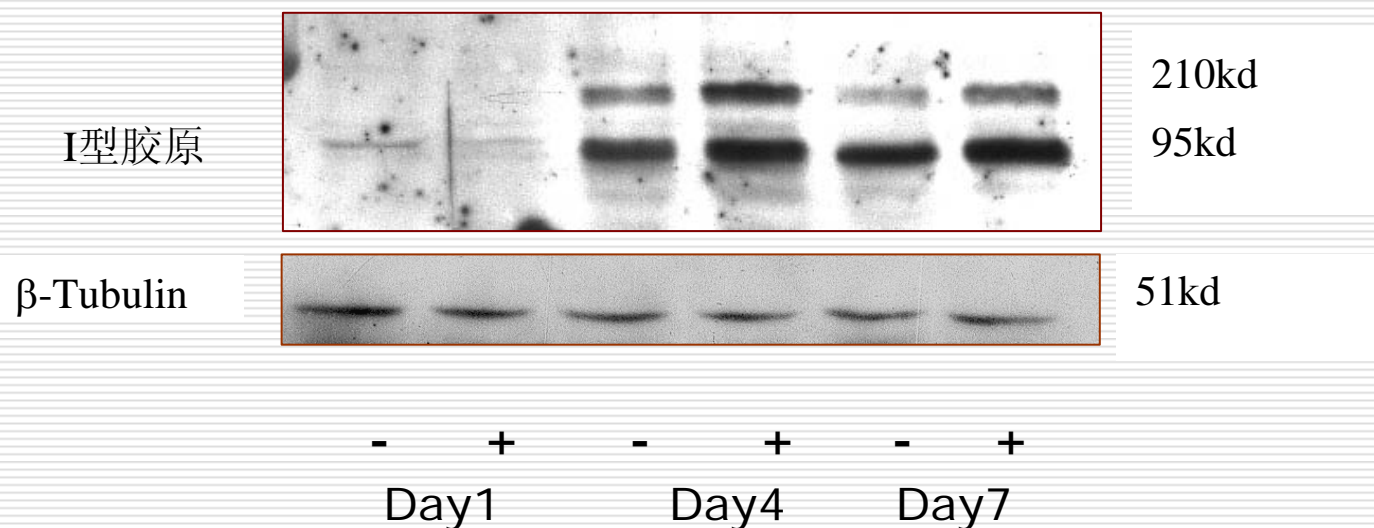


转膜，即将胶
上蛋白转至硝
酸纤维素膜



目的蛋白条带
定性（特定位置）
定量（条带的强弱）

例：免疫印迹法分析I型胶原含量



- western blot分析原代培养肝星状细胞I型胶原蛋白表达。肝星状细胞分别培养1、4、7天，给予100pmol/L TGF-β1刺激（+），提取细胞裂解液，经7.5%SDS-PAGE电泳，硝酸纤维素膜转移，I型胶原抗体western blot分析。

Western Blotting的特点与优点

- 直观：以图片形式呈现实验结果，信息量大，To see is to believe。
- 定性与定量相结合：分子量大小、抗体特异结合-定性；内参照，排除上样与转移等的差异-相对定量。
- 简化：从混杂抗原中检测特定抗原，或以多克隆抗体中代替单克隆抗体检测；容易操作。
- 可信：可连续分析固相膜上的蛋白质，反应均一，重复性好。
- 优点：（1）高敏感性，可检出最小蛋白质量达1pg；（2）抗原制备质量稳定，实验重复性好；（3）实验操作简便、快速，结果判断不受主观因素影响；（4）检测结果可保存。

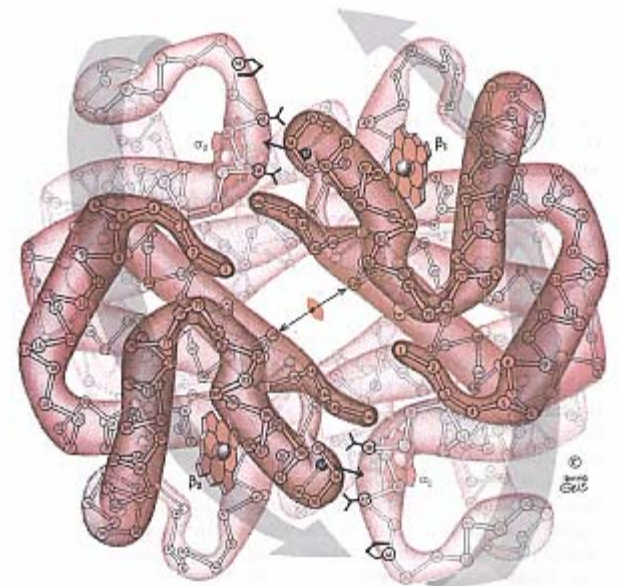
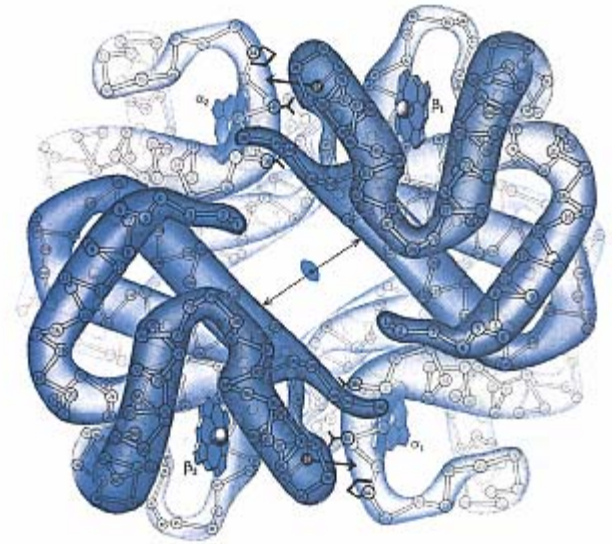
该技术被广泛地用于基础医学和临床医学的研究，生物类实验室常规与必备。

提纲

- 蛋白质印迹的意义、原理与特点
- 蛋白质样本制备与浓度检测
- 蛋白质印迹检测
 - PAGA 凝胶电泳
 - 转膜
 - 封闭
 - 抗体孵育
 - 显影、成像与分析
- 常见问题

蛋白质的一般特性

- 1-4级空间结构, 物理或化学因素（加热、pH值、去垢剂等）破坏蛋白质中的副键, 使其空间结构发生改变-变性, 一定条件复性;
- 两性电解质, 因pH值不同而带正或负电荷。



蛋白质标本留取与保存

□ 干净(clean)

- 留取时尽量避免污染物，如血液、体液、死细胞等。放尽血液、漂洗、洗涤、离心等。

□ 速冻(snap freeze)

- 尽快冻于液氮或-70°C保存

□ 勿冻融(no thawing-freeze cycle)

- 预先分装，勿反复冻融（防降解变性）。

标本的蛋白质抽提

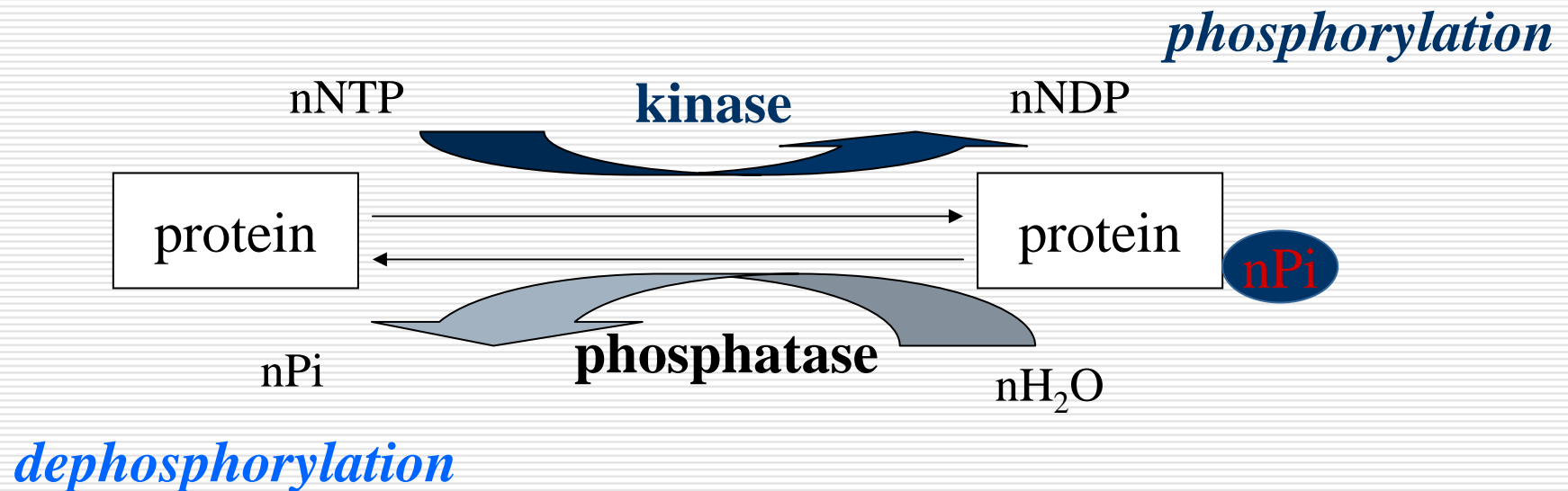
- 组织蛋白质的抽提。
 - 物理匀浆。内切匀浆，每次15秒，尽可能不出现泡沫。
 - 物理研磨。组织+液氮研磨；磁珠研磨等。
 - 冻融裂解。迅速冻融。
 - 化学裂解。Lysis buffer, SDS等去垢剂。
 - 离心分离。4°C、12000g离心15-30min取上清蛋白。
- 细胞蛋白质的抽提。
 - 预冷PBS洗2-3次细胞，加入裂解液，直接刮取细胞；
 - 冷冻后刮取去细胞，再加入裂解液。
 - 先收集细胞，再加入裂解液。
 - 4°C、12000rpm离心15-30min取上清蛋白。
- 注意
 - 防止水解：冰上操作；裂解液中加PMSF等蛋白酶抑制剂。
 - 部分组织或细胞裂解液离心后可分成三层：上层为油脂，中层为蛋白质，下层为碎片等沉淀，宜取中间层。
 - 及时分装，-80°C保存。

Protease inhibitors needed absolutely

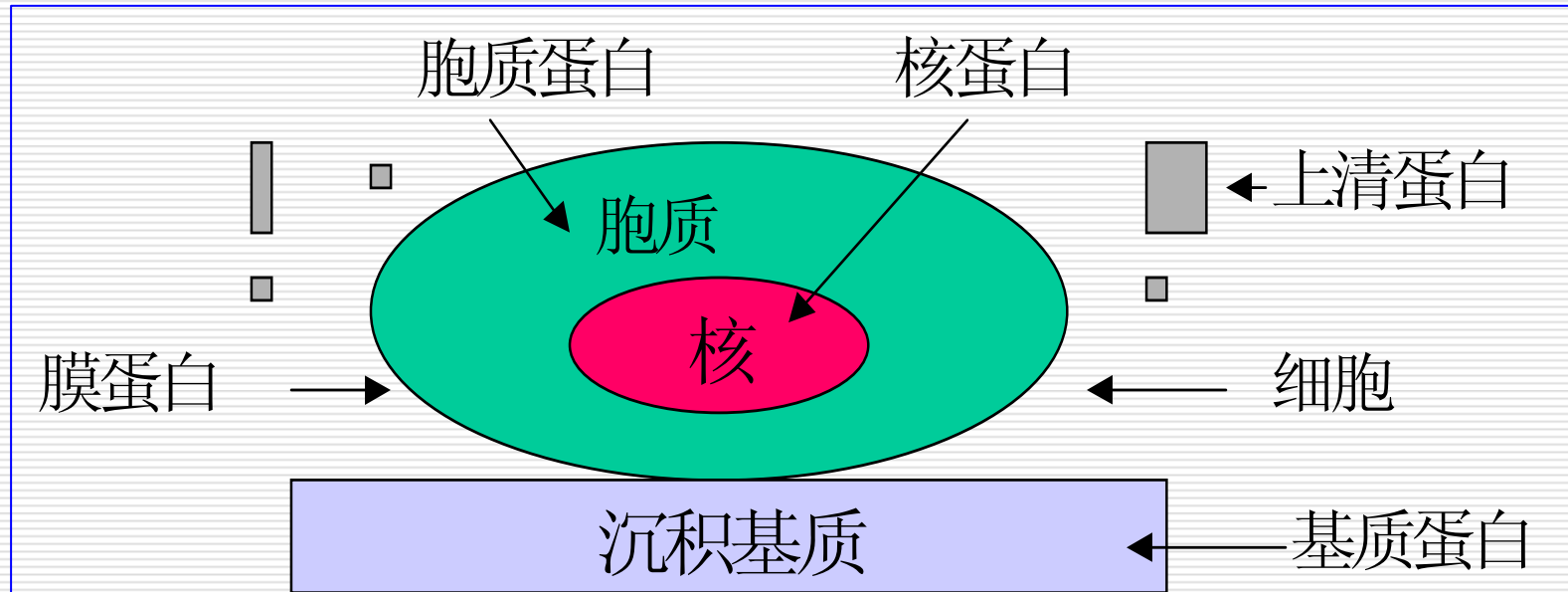
- ❑ Protease is ubiquitously existed, causing protein degradation very easily.
- ❑ To protect proteins from proteolysis, the protease inhibitors must be used during extracting and storing samples, in addition, all process must be done on ice (<4°C).
- ❑ Usual inhibitors: PMSF, aprotinin, pepstatin, and inhibitor complex commercial available from Sigma and Roche etc.
- ❑ Cocktail inhibitor: **Complete** (mixed)

Special inhibitors are needed when special state of protein is detected

- Protein reversible phosphorylation play a key role in mediating intracellular signaling and gene expression. Protein in phosphorylated state is often needed to detect. Inhibitors: Sodium pyrophosphate, $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$; Sodium orthovanadate, Na_3VO_4 ; β -glycerophosphate, $\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_4\text{PNa}_2$



注意：不同部位蛋白质抽提有其特殊性



例如，培养细胞有不同部位蛋白：贴壁细胞分泌蛋白于培养上清（可溶性上清蛋白），分泌并沉积蛋白于培养皿上（不溶性基质蛋白），细胞自身蛋白（胞膜蛋白、胞质蛋白与核蛋白等）。

样本的总蛋白浓度测定-常用方法

- 双缩脲法-肽键（-CONH-）在碱性溶液中与 Cu^{2+} 形成紫红色络合物。BCA法。碱性条件下，蛋白质将 Cu^{2+} 还原为 Cu^{+1} ，后与 bicinchoninic acid (BCA) 络合呈色。
- Lowry法-酪氨酸/色氨酸残基对酚试剂（Folin）反应。
- 染料结合法-蛋白质中-NH₃⁺基团可与染料的阴离子产生颜色反应，考马斯亮蓝G-250 (Bradford,1976)。
- 紫外分光光度法-酪氨酸/色氨酸在A280处有吸收峰。此法易受到核酸干扰(A260 与A280 均有高吸收峰)。
- 注意：去垢剂是否与试剂兼容。

提纲

- 蛋白质印迹的意义、原理与特点
- 蛋白质抽提与浓度检测
- 蛋白质印迹检测
 - PAGE 凝胶电泳
 - 转膜
 - 封闭
 - 抗体孵育
 - 显影、成像与分析
- 常见问题

PAGE凝胶电泳

□ 电泳一带电离子在电场的移动

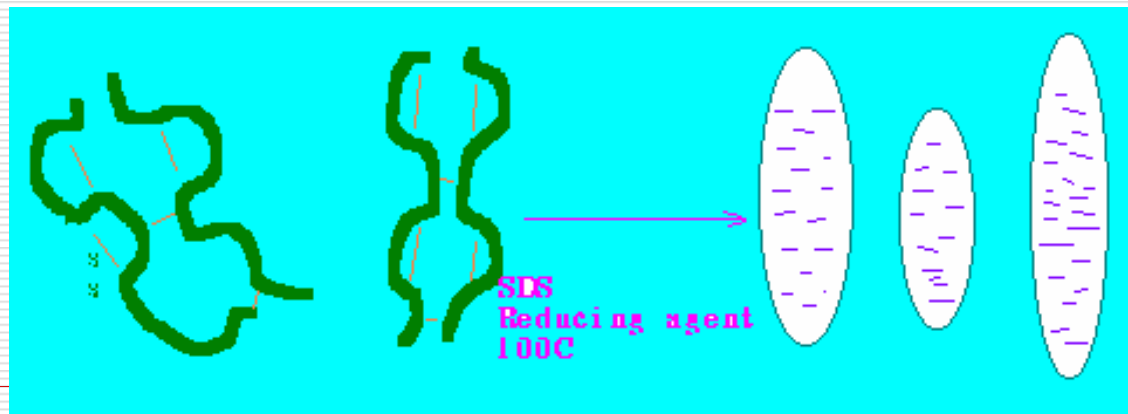
- 蛋白质样本的预处理一带电荷
- 电泳介质-凝胶
- 电泳缓冲系统-Buffer
- 电源-电流与电压

蛋白质样本电泳前处理-SDS还原变性

- 3 factors determine the protein migration in electro-field: protein molecule shape, size (mass) and charge.
- Protein aliquots are treated with loading buffer containing SDS, DDT and 2-mercaptoethanol (β -ME), and heated in 100°C for 5min. In this way, only molecule size determine protein migration during electrophoresis instead of shape and charge.

SDS还原的作用

- ❑ Reducing agents -DTT & β -ME break all the disulfide bonds; Anionic detergent - SDS break all hydrogen bonds intra/inter molecules, Causing multimeric proteins to dissociate into their subunits and form **similar rod shape** (identical diameter in rod subunit).
- ❑ SDS wrap these subunits and confer a lot negative charge into them in proportion to their length, eliminate the effects of differences in shape and charge carried by protein itself; and force all them into conformations with the **same charge/mass ratio** - Subunit chain length, which reflect mass (size), is the sole determinant of the migration of protein in SDS-PAGE electrophoresis.



PAGE凝胶

- Main reagents:
 - acrylamide($\text{CH}_2\text{CHCONH}_2$), Bisacrylamide ($\text{CH}_2\text{CHCONHCOCHCH}_2$). Monomer solution: 30.8% acrylamide & 2.7%Bis.
 - 2M/3M Tris-HCl buffer, pH6.8 for stacking gel, pH 8.8 for separating gel.
 - 10% SDS (detergent for denaturing protein).
 - Initiator: 10%ammonium persulfate (APS)
 - Accelerator: TEMED. (Initiator & accelerator are necessary for polymerization)

聚丙烯酰胺凝胶

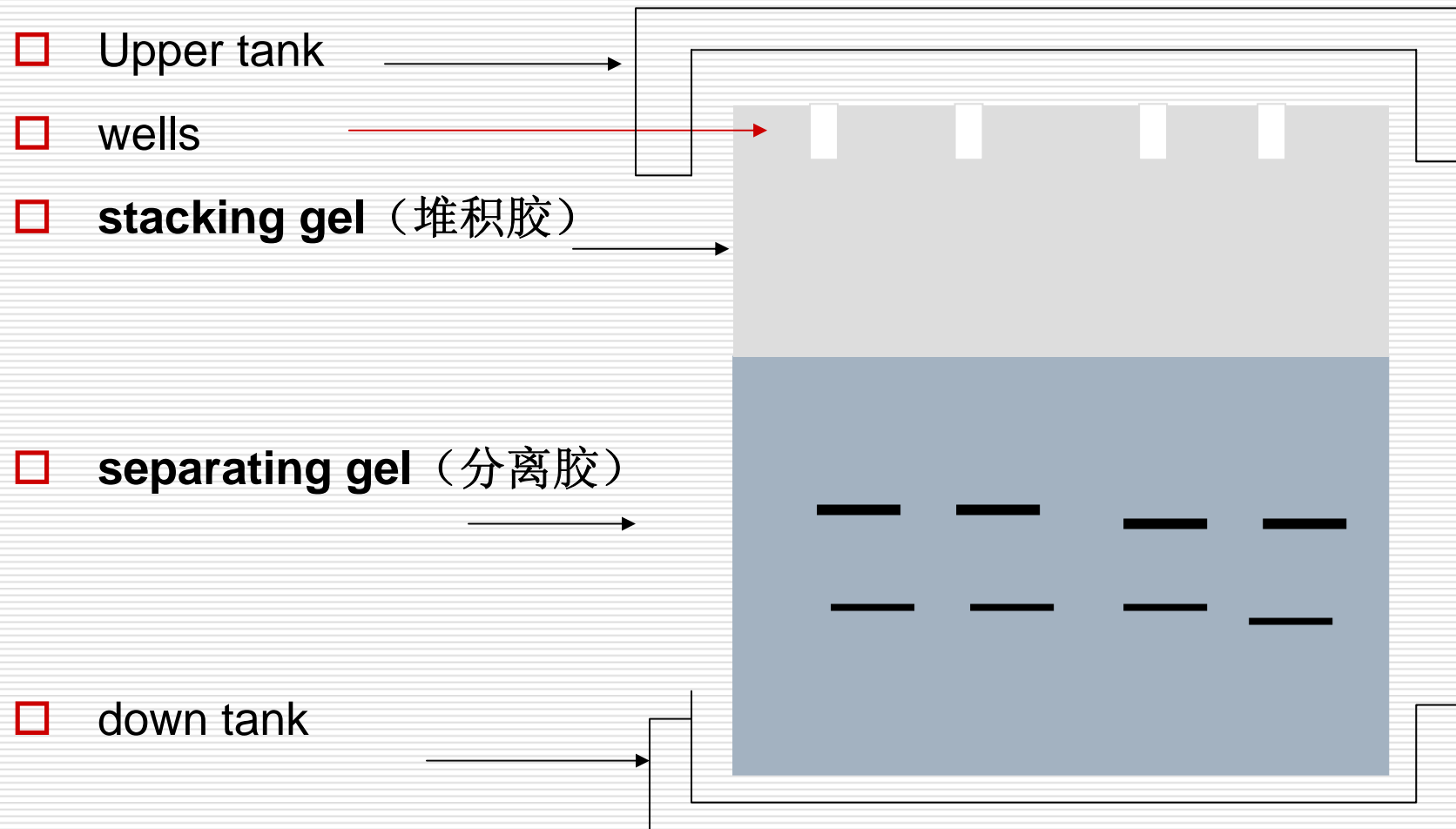
- 聚丙烯酰胺由丙烯酰胺(Acr)和交联试剂N,N'-甲叉双丙烯酰胺(Bis)在有引发剂APS和增速剂TEMED等的情况下聚合而成。这种引发-增速的催化系统是氧化-还原过程，在此产生自由基用于丙烯酰胺凝胶的聚合。
- 聚合过程与下列因素有关：引发剂、增速剂浓度，系统的pH值、温度等。
- 凝胶浓度可根据所分离蛋白分子量大小选择，从而确定丙烯酰胺、N,N'-甲叉双丙烯酰胺、APS和TEMED的量。为了得到理想的电泳结果，应该使用合理的配方使聚合过程大约在30-60分钟内完成。

注：10%的APS最好现配现用，如在4℃存放勿超过两周。30%的丙烯酰胺如有沉淀，最好弃掉。

连续与非连续PAGE凝胶之区别

	continuous	discontinuous
gel	Single separating	Stacking & separating
buffer	The same in the tank and gel	Different among stacking/ separating gel and tank.
feature	<ol style="list-style-type: none">1) Easier to set up2) Fewer sample precipitation3) No concentration effect & poor sample resolution.	<ol style="list-style-type: none">1) Little difficult to set up.2) Concentration of protein by stacking gel3) Very sharp band in separating gel and high resolution.

Discontinuous system-常用



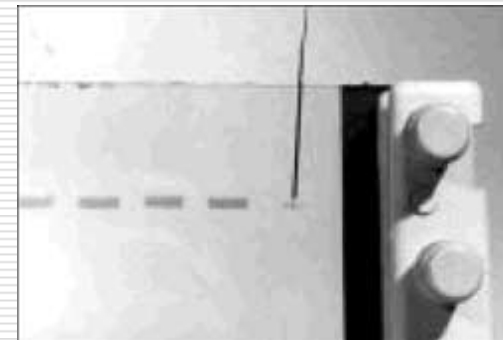
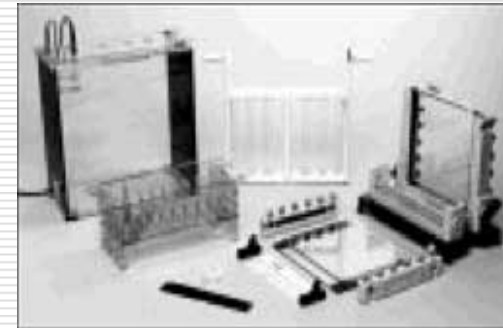
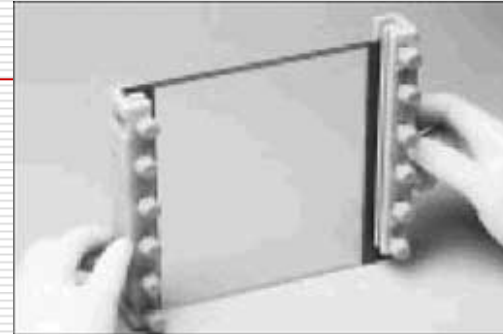
凝胶浓度选择

- Stacking gel concentration (% acylamide in all solution): usually 3.5%.
- Separating gel: % acylamide depends on protein size:

Separation size range(kd)	% acylamide in gel
36-205	5%
24-205	7.5%
14-205	10% #
14-66	12.5%
14-45	15%

凝膠灌制

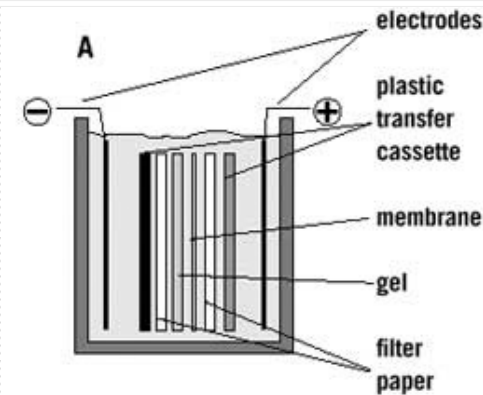
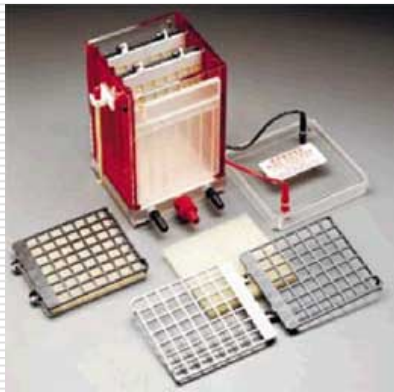
- ❑ Set up a sandwich gel casting system (vertical slab).
- ❑ Pour separating gel solution into cast plate.
- ❑ Overlay with water and stand at RT for 40-60min.
- ❑ Discard the water, pour the stacking gel, and put well comb into it immediately.



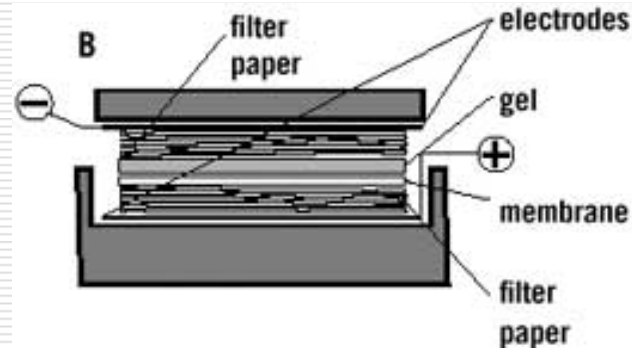
电泳

- 电泳缓冲系统-Buffer
 - 5x sample buffer (final conc. 62.5mM Tris/HCl at Ph 6.8, 10%glycerol, 2%SDS), The lysates prepared with 5x reducing buffer (depending on well volume) to 1 x,
 - Rainbow marker was used, usu. 5-8 μ L /well + sample buffer
 - And boiled for 5min and quick spin before loading.
 - **Running gel (electrophoresis):** 0.25 M Tris, 1.92 M Glycine, 1%SDS
- 电泳条件
- short daytime
 - for big gel: Max voltage, but 45mA current (constant), for 2-2.5h.
 - for mini-gel: Max voltage, but 40mA current (constant), for 1-1.5h.
- overnight time: Max current, but 40-50V voltage (constant)

转膜(使蛋白质从凝胶转至固定膜上)



□ tank systems.



Semi-Dry Systems

□ (note: the top face of blot, which was attached closely to gel, should be against the film)

- Little transfer buffer ; short time and higher transfer efficiency; Transfer multiple gels at same time.
- transfer condition: constant voltage 14-15V for 1h.

Transfer Buffer & Films

- Towbin buffer: 25mM Tris, 192 mM Glycine, 20% MeOH, 0.1% SDS). MeOH prevent gel swelling, improve protein binding onto membrane, but inhibit transfer esp for large size proteins; SDS improve transfer but inhibit protein binding.
- 膜
 - 硝化纤维素膜-灵敏、高分辨率；干膜易碎。
 - PVDF膜-高结合率，反复检测；需纯MeOH用前活化。
 - 尼龙膜-灵敏；背景高。少用。

Checking Transfer Efficiency

- put the membrane into Ponceau S immediately to stain the protein bands.
- [Ponceau S 100ml: Ponceau S 0.5g + 1ml Acetic acid + 99ml water]
- rinse several times the membrane with water .
- the total protein stain with ponceau S does not interfere with subsequent immunodetection.

封闭 (Blocking)

- Immerse the membrane into the 5% non-fat milk or 3% BSA in TBS/0.05-0.1% Tween and shook overnight at 4⁰C or 1h at RT.

- **Blotto A (TBS-T) 1000ml**

(Final conc)

100ml 1M Tris-HCl, pH8.0, 100mM

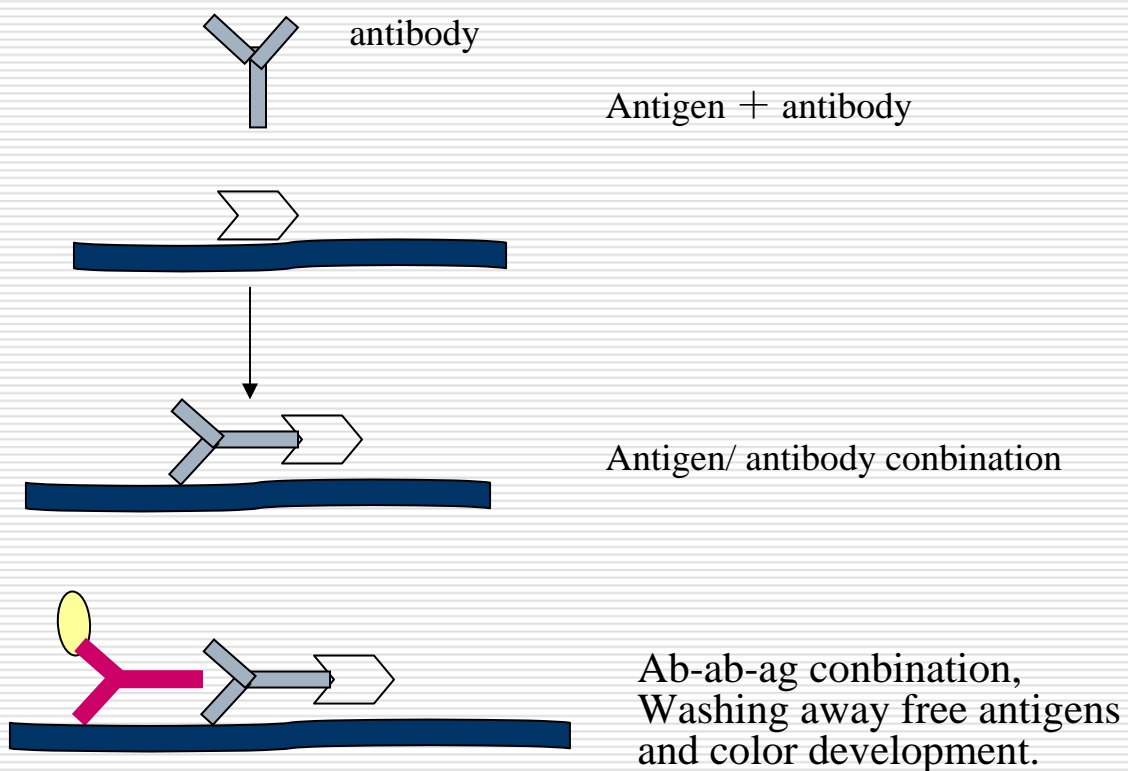
30ml 5M NaCl 150mM

0.5-1.0ml Tween-20 0.05-0.1%

Adjust the volume to 1000ml with water

抗体孵育

- 特异性抗体孵育
- 洗涤未结合的抗体
- 与偶联有HRP或AKP酶的抗抗体结合
- 底物显色曝光



Immuno-blot

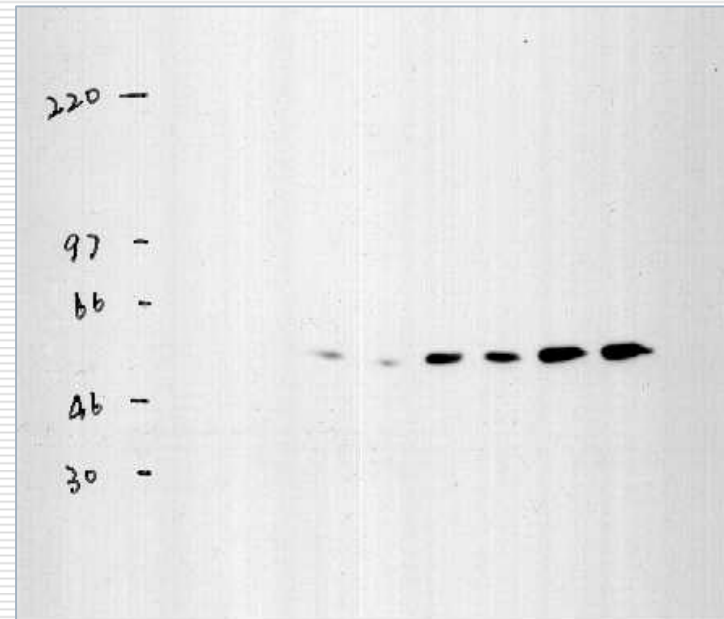
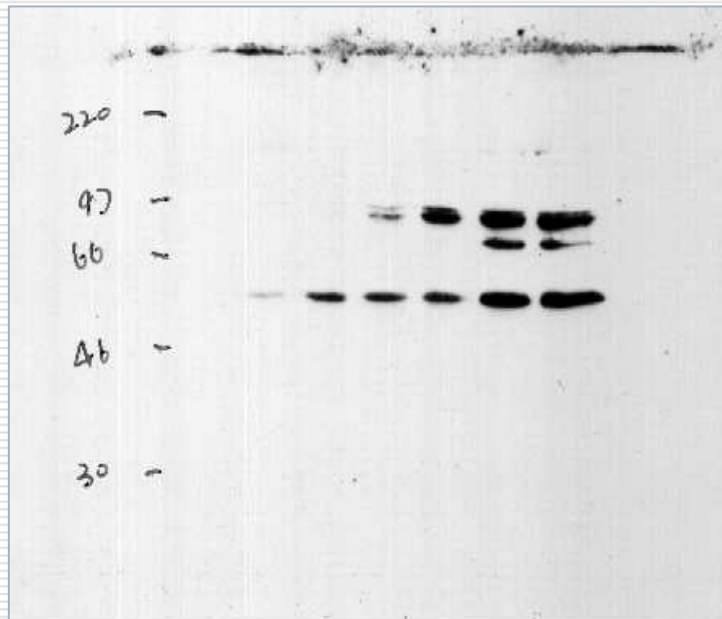
- ⇒ 1st antibody incubation
 - ⇒ Pour off the block solution
 - ⇒ Add fresh TBS-T/milk containing the first antibody (conc. 1:100- 1:20 000)
 - ⇒ Incubate at 4°C overnight. For example, 1:500 the primary antibody: 15ml TBS-T/5% milk + 30µL 1st antibody
- 2nd antibody incubation
 - ◆ Collect the 1st antibody for next use while adding 1:100 10% sodium azide storing at 4°C
 - ◆ Rinse the blot with TBS-T (w/o milk) 3 times, 5min each time.
 - ◆ Add 25ml 2nd antibody (mouse anti-rabbit IgG-HRP) in 5% non-fat in TBS-T.
 - ◆ Rinse 4 times with TBS-T, 5min each time and 15min for the last wash.

抗体选择

- 单克隆抗体是指识别单一抗原表位的抗体，而多克隆抗体则可以识别多个抗原表位。抗原表位分为线性表位和空间表位，由于WB是在变性条件下进行的，抗原的空间表位被破坏，在不清楚单克隆抗体是识别空间表位还是线性表位的情况下，最好选择多克隆抗体。

	多克隆抗体	单克隆抗体	混合的单克隆抗体
信号强度	较好	视不同抗体而异	最佳
特异性	良好，但有一定的背景	最佳，但有交叉反应	最佳
优点	多数能识别变性抗原	特异性好，抗体来源不受限制	信号强，特异性好，抗体来源不受限制
缺点	不易重复，有时背景较深，抗体需滴定	多数不能识别变性抗原	容易获得

Western blot of Smad2



A. Poly-antibody against P-smad2. B. Monoclonal antibody against T-smad2

内参照选择

- 不同条件下或者不同组织中目的蛋白表达量的多少前提是等量的蛋白上量，才有比较的基础。特别是表达量不高时，上样量的差别就很可能影响结果的分析，所以需要内参。内参对哺乳动物来说，一般是看家基因编码表达的蛋白，它们在各组织细胞中的表达相对恒定。
- 选择内参照方法：
 - 1. 如果样品蛋白量有限，可以分别检测样品的目的蛋白量和内参量，将各样品目的蛋白量分别除以其内参照含量，得到的数值即为内参照校正后的各样品中的目的蛋白相对含量，再用此数值进行样品间的比较。
 - 2. 如果样品量充分，可以先检测内参照直至各样品内参照量一致后再检测目的蛋白。这样虽麻烦，但可以保证结果更有说服力。

Membrane Strip and Reuse

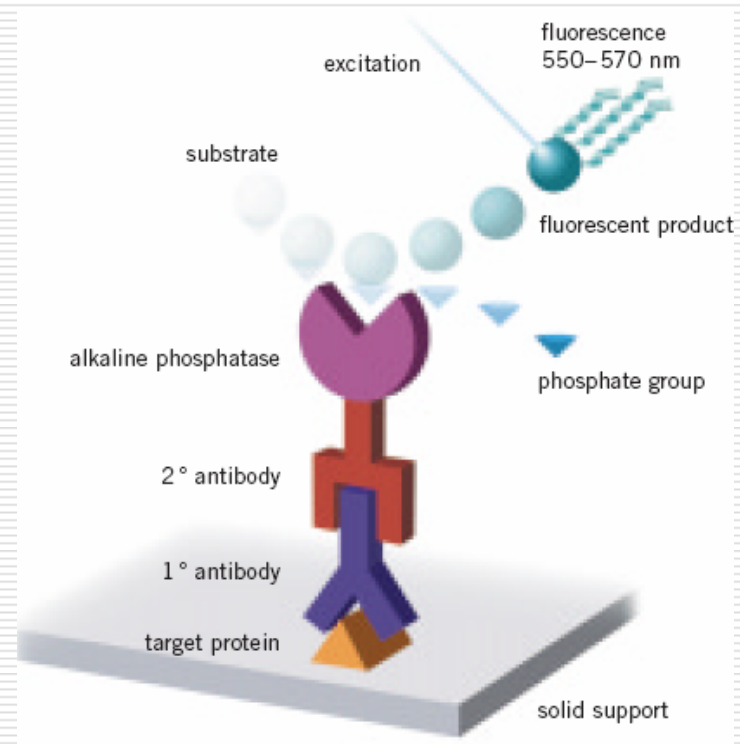
- Note: never let the blot dry out.
- tender stripping buffer 500ml (1x)
 - 458.5ml dd.water
 - 10%SDS (Final 0.2%)
 - 31.25ml 1M Tris/HCl (Ph6.8)
 - 0.7 ml β -mercapto ethanol/ 100ml stripping solution was added just before use.
- The blot was put into the stripping solution and incubated at 55⁰C for 1-5min. Tehn washed and blocked as the above.

Color Development-化学发光 (ECL/SCL)

- Mix the chemical luminescent substrate solution
- 5ml luminol/enhance
- 5ml stable peroxide solution
- Pierce Co./No 34080, supersignal substrate.
www.piercenet.com
- Immerse the blot into the above mixed solution and shake evenly for 5-10min.
 - Pour off the excessive liquid, place the blot between the pages of plastic paper protector.
 - Expose the ECL-film against the blot in the dark room for 15sec-2h, and develop the film.

"The Odyssey: The New Approach to Western Analysis"

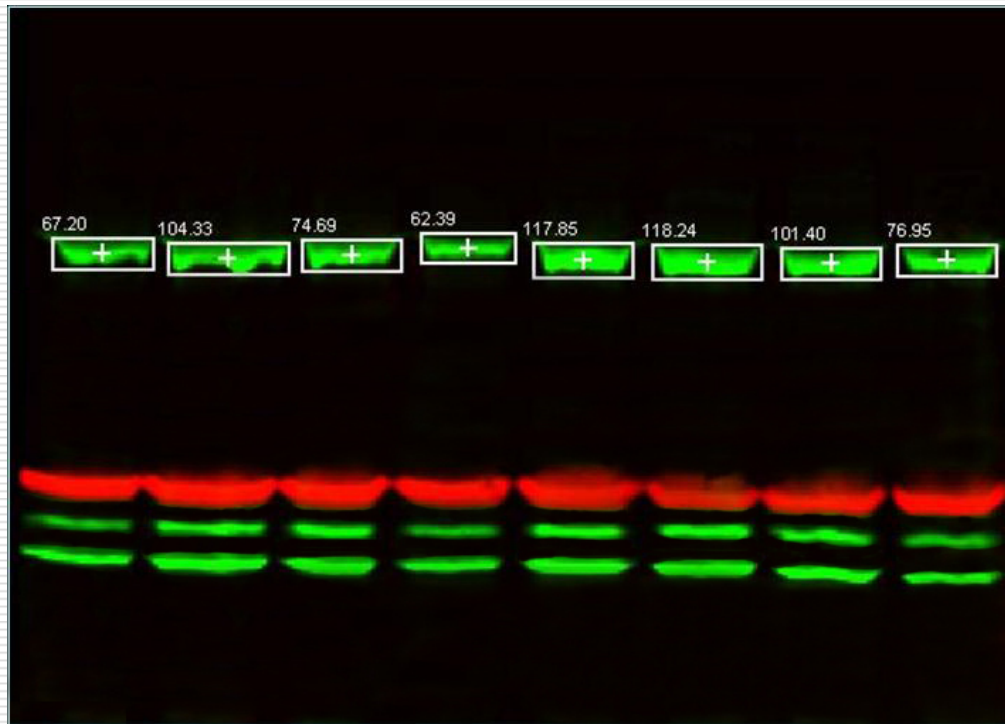
Western检测技术的革命性创新



"The Odyssey really speeds up our application, so we get faster results. I haven't used ECL ever since the Odyssey arrived."

- Stanimir Ivanov, Brown University

Odyssey-双色检测



Mps1 蛋白激酶的检测 (green, IRDye800) , 管蛋白 tubulin (red, Alexa 680) 用作参
校正上样量, 可以进行准确的量化评估- Dr. Harold Fisk, University of Colorado

No stripping and re-probing

* Two-color detection requires primary antibodies from different hosts

提纲

- 蛋白质印迹的意义、原理与特点
- 蛋白质抽提与浓度检测
- 蛋白质印迹检测
 - PAGA 凝胶电泳
 - 转膜
 - 封闭
 - 抗体孵育
 - 显影、成像与分析
- 常见问题

常见问题及解决方法

Q: 没有注明做WB的一抗能否可以用来做WB?

A: 有的抗体是识别线性表位的,有的是识别构象型表位的。识别构象型表位的抗体不能用于WB,因为在WB中抗体识别的是完全变性的蛋白质抗原,而蛋白质抗原的构象型表位变性时被破坏。

Q: “微笑”（两边翘起中间凹下）形带原因?

A: 主要是由于凝胶的中间部分凝固不均匀所致,多出现于较厚的凝胶中。
处理办法: 待其充分凝固再作后续实验。



Q: “皱眉”（两边向下中间鼓起）形带原因?

A: 主要出现在蛋白质垂直电泳槽中,一般是两板之间的底部间隙气泡未排除干净。
处理办法: 可在两板间加入适量缓冲液,以排除气泡。



Q: 为什么带出现拖尾现象?

A: 主要是样品融解效果不佳或分离胶浓度过大引起的。

处理办法: 加样前离心; 选择适当的样品缓冲液, 加适量样品促溶剂; 电泳缓冲液时间过长, 重新配制; 降低凝胶浓度。

常见问题及解决方法

Q: 为什么带出现纹理现象?

A: 主要是样品不溶性颗粒引起的。

处理办法: 加样前离心; 加适量样品促溶剂。

Q: 什么是“鬼带”, 如何处理?

A: “鬼带”就是在跑大分子构象复杂的蛋白质分子时, 常会出现在泳道顶端 (有时在浓缩胶中) 的一些大分子未知条带或加样孔底部有沉淀, 主要由于还原剂在加热的过程中被氧化而失去活性, 致使原来被解离的蛋白质分子重新折叠结合和亚基重新缔合, 聚合成大分子, 其分子量要比目标条带大, 有时不能进入分离胶。但它却于目标条带有相同的免疫学活性, 在WB反应中可见其能与目标条带对应的抗体作用。

处理办法: 在加热煮沸后, 再添加适量的DTT或Beta巯基乙醇, 以补充不足的还原剂; 或可加适量EDTA来阻止还原剂的氧化。

常见问题及解决方法

- Q: 为什么溴酚蓝不能起到指示作用?
- A: 实验中常遇到溴酚蓝已跑出板底, 但蛋白质却还未跑下来的现象。主要与缓冲液和分离胶的浓度有关。
处理办法: 更换正确pH值的Buffer; 降低分离胶的浓度。
- Q: 为什么电泳的条带很粗?
- A: 电泳中条带很粗是常见的事, 主要是未浓缩好的原因。
处理办法: 适当增加浓缩胶的长度; 保证浓缩胶贮液的pH正确(6.7); 适当降低电压;
- Q: 为什么电泳电压很高而电流却很低呢?
- A: 这种现象一般初学者易出现。比如电压50v以上, 可电流却在5mA以下。主要是由于电泳槽没有正确装配, 电流未形成通路。包括: a.内外槽装反; b.外槽液过少; c.电泳槽底部的绝缘体未去掉(比如倒胶用的橡胶皮)。
处理办法: 电泳槽正确装配即可。

常见问题及解决方法

- Q: 为什么细胞提取液中没有目标蛋白?
- A: 原因有很多, 1) 细胞中不表达这种蛋白质, 换一种细胞; 2) 细胞中的蛋白质被降解掉了, 必需加入PMSF, 抑制蛋白酶活性; 3) 抗体不能识别目标蛋白, 多阅读说明, 看是否有问题。
- Q: 细胞提取液有的有沉淀, 有的很清亮, 为什么呢?
- A: 1) 有沉淀可能是因为蛋白没有变性完全, 可以适当提高SDS 浓度, 同时将样品煮沸时间延长。2) 也不排除抗原浓度过高, 这时再加入适量sample buffer即可。
- Q: 目标带是空白, 周围有背景, 是为什么?
- A: 一抗浓度较高, 二抗上HRP 催化活力太强, 同时显色底物处于一个临界点, 反应时间不长, 将周围底物催化完, 形成了空白。将一抗和二抗浓度降低, 或更换新底物。
- Q: 胶片是一片空白, 是怎么回事?
- A: 如果能够排除下面的几个问题那么问题多半出现在一抗和抗原制备上。1 二抗的HRP 活性太强, 将底物消耗光; 2 ECL底物中H₂O₂, 不稳定, 失活; 3 ECL底物没覆盖到相应位置; 4 二抗失活。

常见问题及解决方法

Q：抗原分子量是资料上的两倍，是怎么回事？

A：抗原形成了二聚体。增多巯基乙醇量，煮沸变性时间延长，可以打开二聚体。

Q：半干转是否要求膜，滤纸，胶同样大小？因为胶大小不一定规则，膜和滤纸会大一点，那样会不会短路？什么是短路？如何控制和发现短路呢？

A：一般参照膜 \geq 滤纸 $>$ 胶，就行，转移前和转移过程中看看电压就行，正常的半干是慢慢变高的，最后结束时一般是开始的1.5-3倍都是正常的。一般Buffer和滤纸选的对就不会短路。

Q：目的带很弱，怎么加强？

A：可以加大抗原上样量。这是最主要的。同时也可以将一抗稀释比例降低。

Q：胶片背景很脏，有什么解决方法？

A：减少抗原上样量，降低一抗浓度，改变一抗孵育时间，牛奶浓度提高。