



生物化学实验

免疫学实验技术

6.7 蛋白质免疫印迹的检测方法

北京大学 王青松 胡晓倩

概述

- Western blot实验在对印迹膜进行一抗和二抗孵育后，需对印迹膜上的目的蛋白质条带进行显色与检测。检测的方法主要有3种：

1. 比色检测

- HRP-DAB显色法
- AP-BCIP/NBT显色法

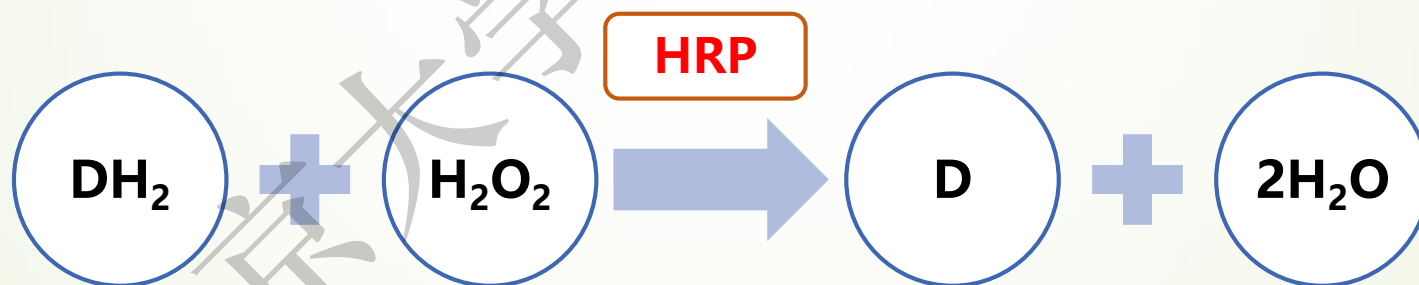
2. 化学发光检测

3. 荧光检测

- 化学发光检测与荧光检测是Western blot实验的常用检测方法。

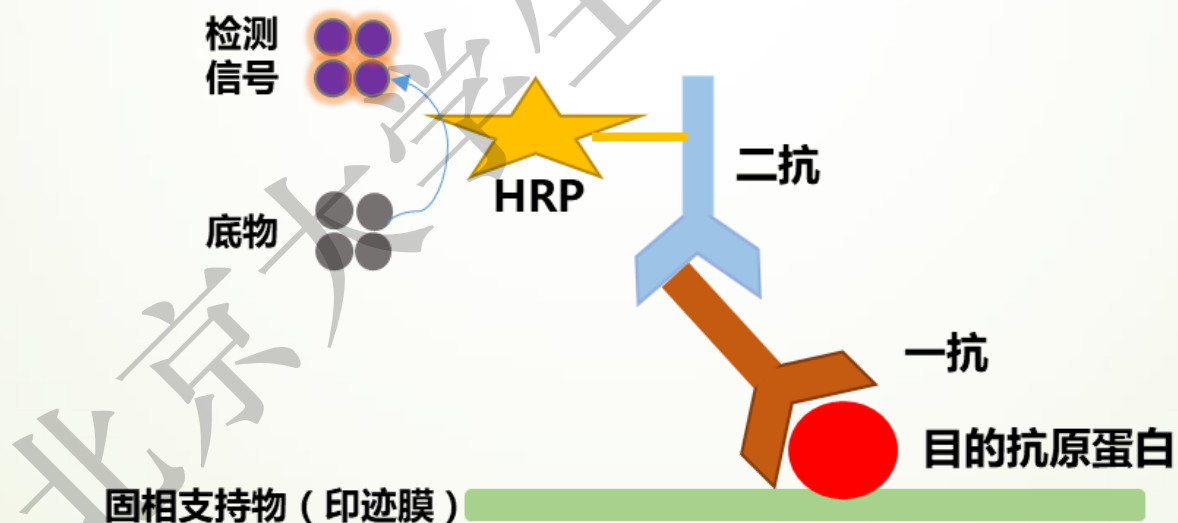
HRP-DAB显色法的原理

- 辣根过氧化物酶 (Horse radish peroxidase, 简称HRP) 是免疫酶技术中最常用的酶之一, 它可催化过氧化物的氧化反应。
- HRP的催化反应需要底物过氧化氢(H_2O_2)和供氢体(DH_2)。供氢体多为无色的还原型染料, 通过反应可生成有色的氧化型染料(D)。



HRP-DAB显色法的原理

- 二氨基联苯胺DAB (3, 3' - diaminobenzidine) 是辣根过氧化物酶的显色底物，在过氧化氢的存在下，会形成棕色不溶性沉淀。DAB显色工作液利用二抗上偶联的辣根过氧化物酶HRP，可直接在Western blot印迹膜上进行显色反应。



HRP-DAB显色法的实验操作

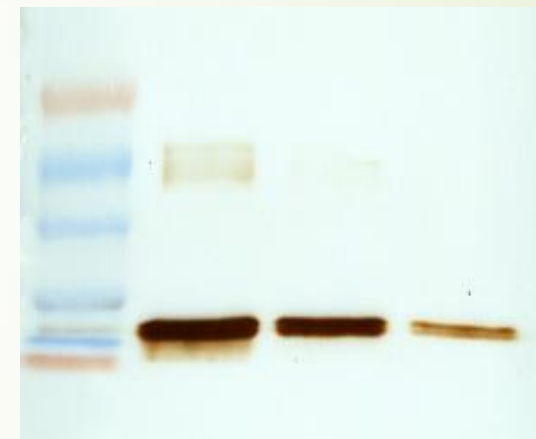
配制DAB显色
工作液

二抗孵育并最
后1次洗涤，
吸弃平皿中的
洗涤液

在印迹膜上加
入适量DAB显
色工作液

室温显色
5~15min

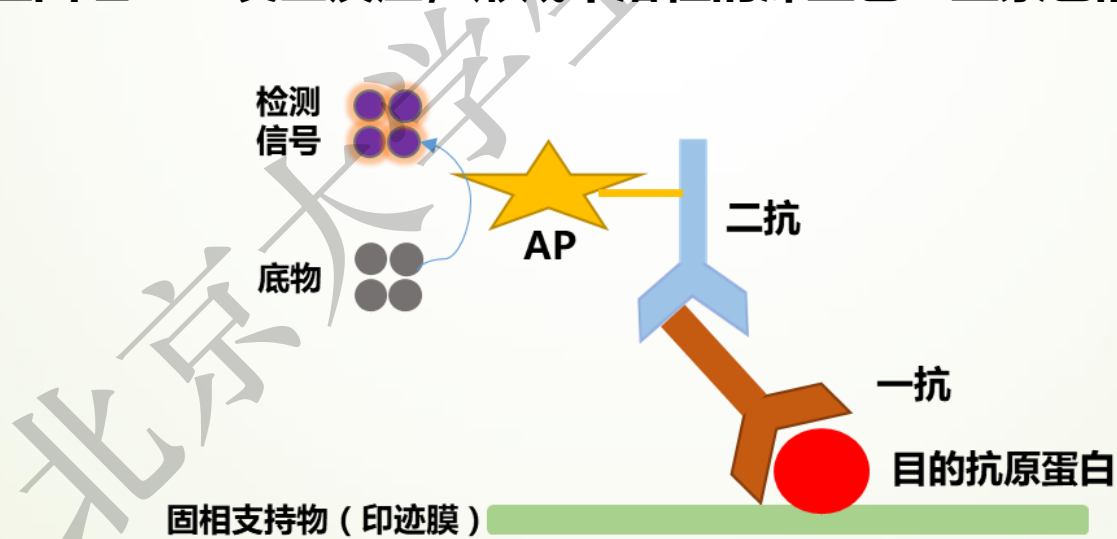
去除显色工作
液，去离子水
洗膜2次，终
止显色反应



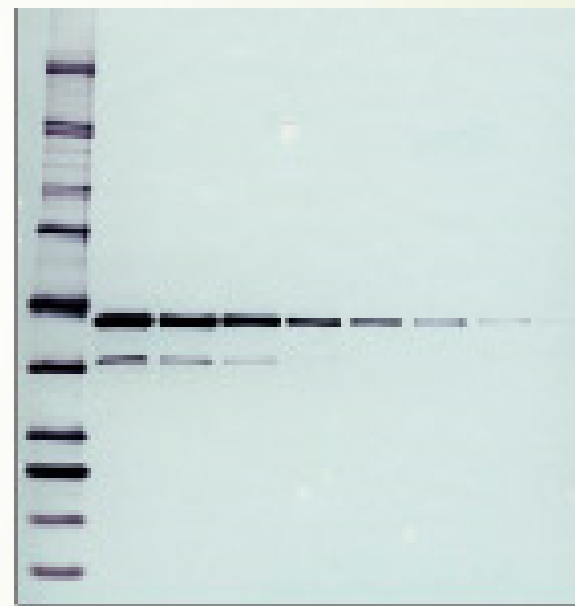
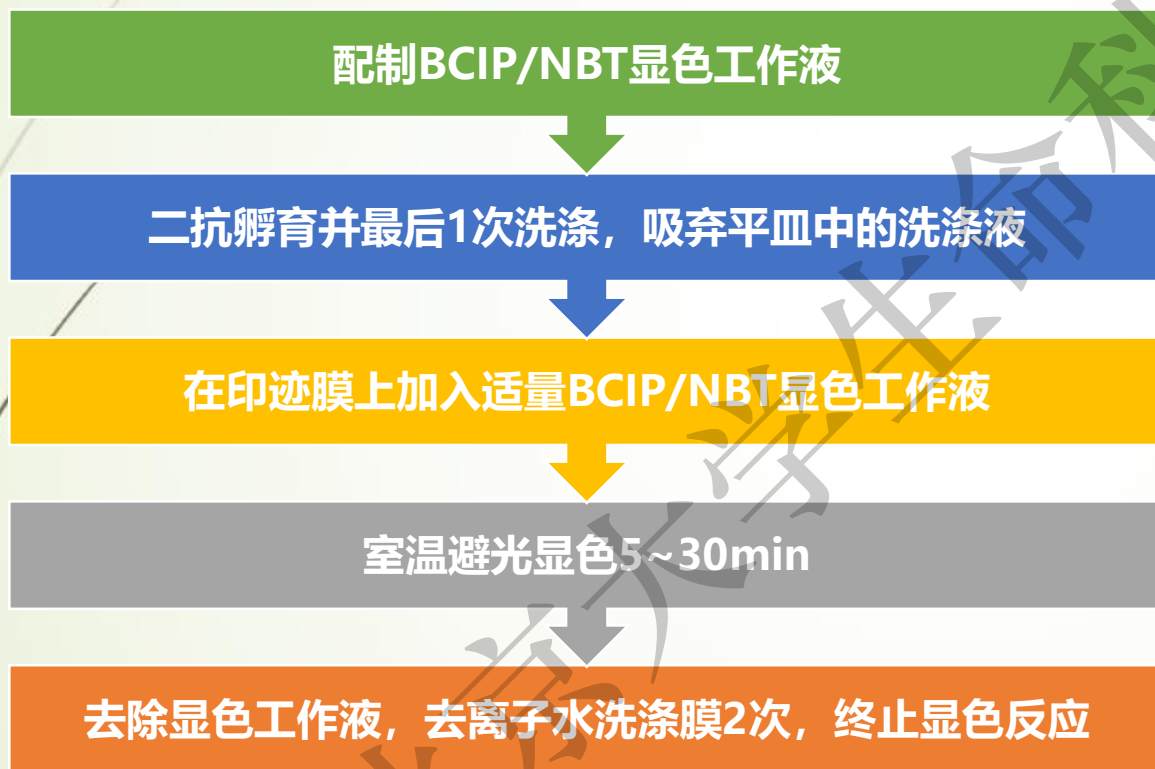
注：DAB显色试剂有毒，操作时戴手套，避免直接接触人体或吸入体内。

AP-BCIP/NBT法的原理

- 碱性磷酸酶 (Alkaline phosphatase, AP) 是免疫酶标记技术中常用的酶，广泛用于二抗等的标记。BCIP/NBT是碱性磷酸酶的常用底物。
- BCIP/NBT显色工作液利用二抗上偶联的AP，可直接在Western blot印迹膜上进行显色反应。在AP的催化下，5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸BCIP会水解产生强反应性的产物，该产物会和氮蓝四唑NBT发生反应，形成不溶性的深蓝色至蓝紫色的NBT-formazan。



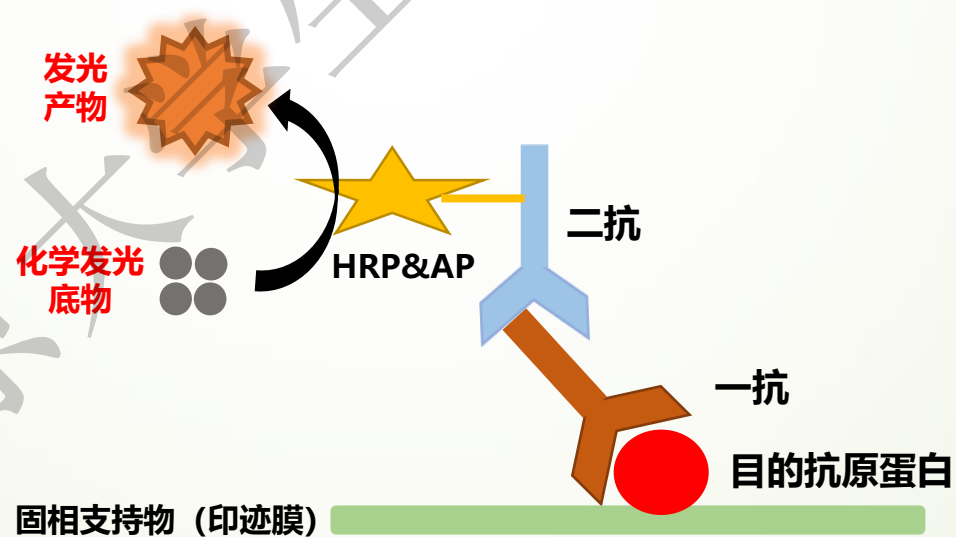
AP-BCIP/NBT显色法的实验操作



<http://www.bio-rad.com/>

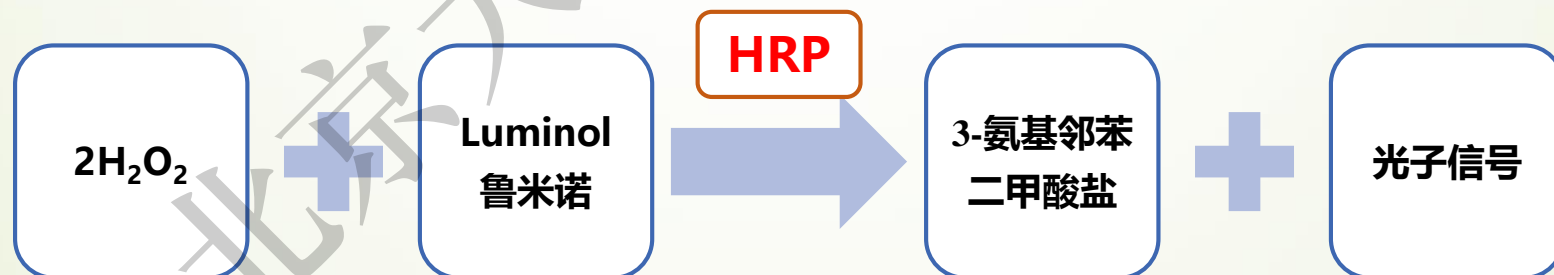
3. 化学发光检测

- 化学发光检测是在HRP或AP的酶催化作用下，底物发生化学反应产生发光产物，然后用X光片压片曝光或化学发光成像系统检测发光产物的信号。
- 化学发光检测灵敏度高，是生物学科实验室最为广泛使用的经典Western blot检测方法。



HRP-ECL发光法的原理

- ECL增强化学发光法 (enhanced chemiluminescence, 简称ECL) , 包括: HRP-ECL发光法和AP-ECL发光法。
- HRP-ECL发光法检测是基于氧化还原反应发光的原理, 鲁米诺 (luminol) 作为发光底物的主要成分, 在碱性条件下, 在二抗上标记的辣根过氧化物酶HRP催化下, 被 H_2O_2 氧化生成3-氨基邻苯二甲酸的激发态中间体, 当其回到基态时发出光子, 最大发射波长为425 nm, 光子信号可通过X光片压片曝光或化学发光成像系统捕获。



HRP-ECL发光法的实验操作

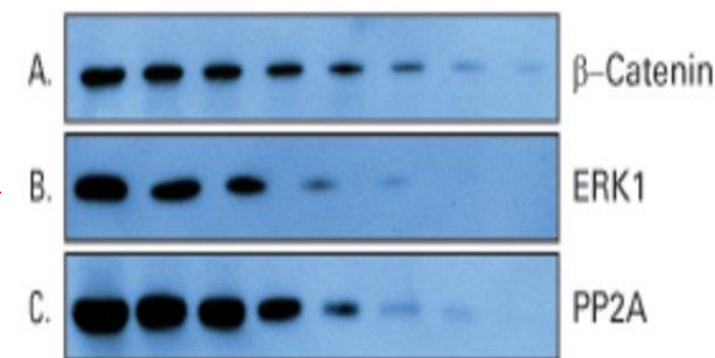
配制ECL显色工作液（发光液A：B=1：1）

二抗孵育并最后1次洗涤，吸弃平皿中的洗涤液

印迹膜放于保鲜膜上，加入适量ECL显色工作液

反应1~2 min

暗室压片曝光检测/化学发光成像仪检测



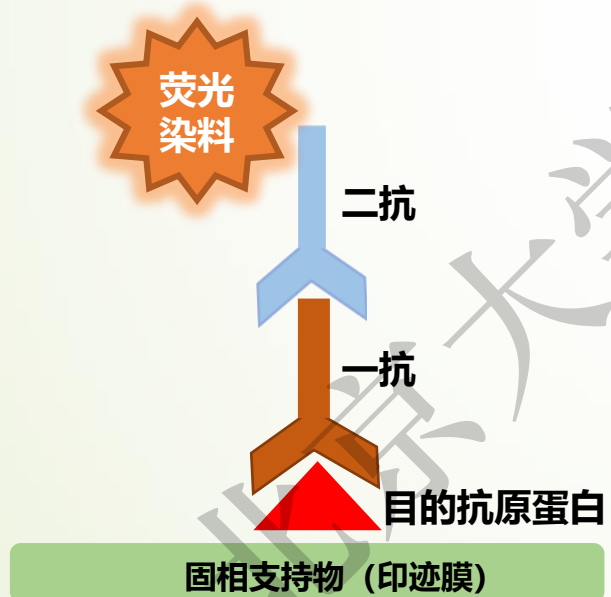
<https://www.thermofisher.com>

3. 荧光检测

- 荧光检测主要利用**二抗上结合的荧光染料**被特定波长的光源激发，产生的荧光信号被检测收集，用于检测蛋白质的表达水平及蛋白质翻译后修饰水平的分析。
- 荧光检测分为：
 - 可见荧光检测：自发荧光问题，灵敏度低；
 - **近红外荧光检测：背景低、灵敏度高、可双色成像，已成为蛋白质Western blot的主流检测方法之一。**

近红外荧光检测

- 近红外荧光检测主要利用标记红外荧光染料（如：IRDye荧光染料）的二抗，二抗孵育后不需要显色反应，可使用红外荧光成像系统直接检测目的蛋白质条带的信号。



◆ 优点:

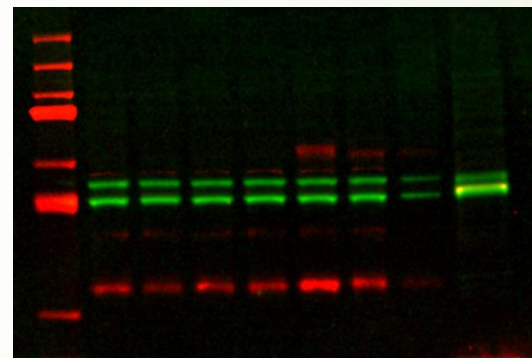
- 近红外荧光背景更低，荧光信号稳定，可实现准确定量；
- 双色成像，可在同一印迹膜上检测2个目的蛋白质；
- 直接检测印迹膜上的信号，无需加酶底物，不需要暗室曝光，操作简便；
- 线性范围宽。

近红外荧光检测的实验操作

使用不同荧光基团标记的二抗进行孵育

二抗孵育并最后1次洗涤，吸弃洗涤液

将印迹膜放入近红外荧光成像系统检测信号



<https://www.licor.com>