



生物化学实验

免疫学实验技术


6.6 蛋白质免疫印迹实验

北京大学 王青松 胡晓倩

概述

- 免疫印迹 (immunoblotting) 是利用抗体与抗原特异性结合的原理，结合生物化学分离技术和免疫学检测技术，通过特异性抗体对SDS-PAGE凝胶电泳分离后的细胞或生物组织样品中的特定蛋白质进行免疫检测的技术。
- 免疫印迹由Towbin和Burnette于20世纪70年代末建立，因与Southern建立的检测核酸的Southern blotting印迹类似，也叫Western blotting，或Western blot。
- Western blot实验具有分辨率高、灵敏度高、特异性强等优点，广泛用于蛋白质的定性、表达定量及蛋白质-蛋白质相互作用等分析。

Western blot的实验原理



The diagram illustrates the three steps of Western blotting. Step 1 is represented by a cluster of colorful circles (yellow, green, blue, orange, grey) of various sizes, symbolizing protein samples. A large orange arrow points from this cluster to Step 2. Step 2 is represented by a large grey arrow pointing to Step 3. Step 3 is represented by a solid blue circle. The steps are numbered 1, 2, and 3 respectively.

1. 蛋白质样品的SDS-PAGE电泳分离

- 制备好的蛋白质样品，通过SDS-PAGE电泳进行分离。

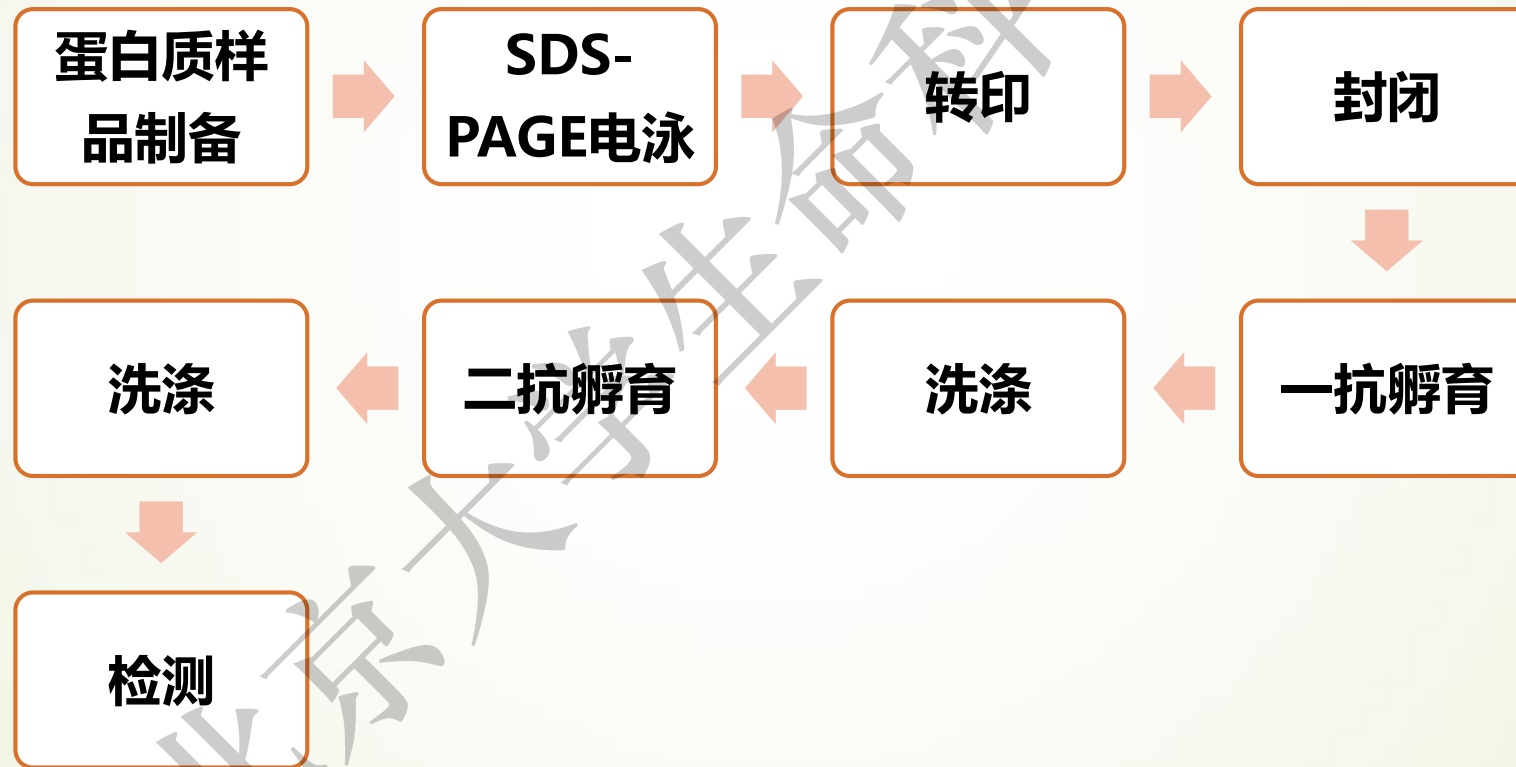
2. 蛋白质转印

- 将电泳凝胶中的蛋白质转移到固相印迹膜上。

3. 目的蛋白质的免疫学检测

- 将印迹膜上的蛋白质经过封闭、一抗和二抗孵育、显色后，检测印迹膜上的目的蛋白质条带。

Western blot的实验流程



1. 蛋白质样品的SDS-PAGE电泳分离



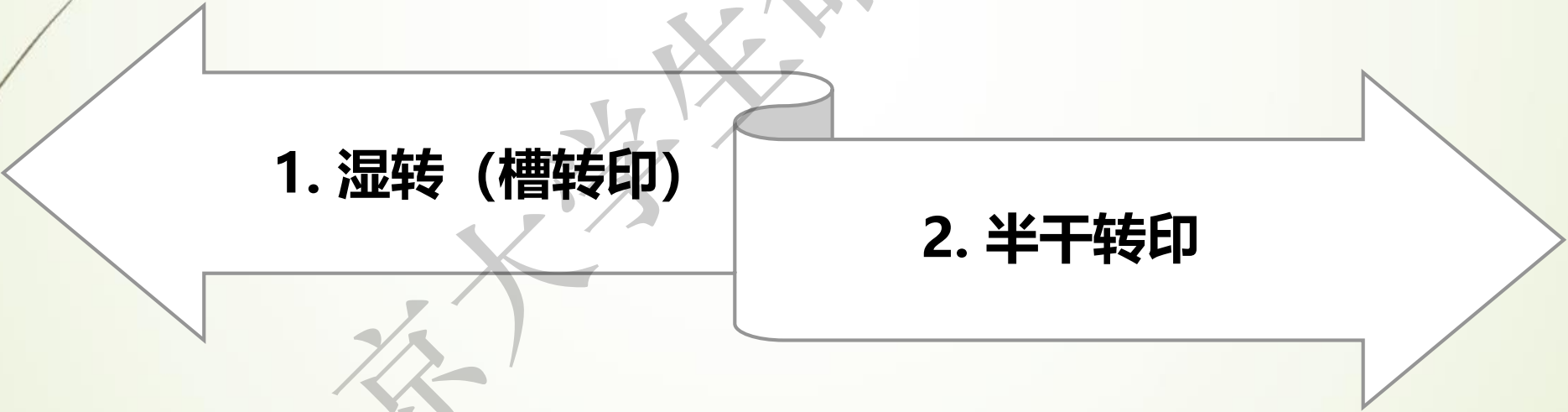
电泳样品制备

SDS-PAGE电泳

- SDS-PAGE电泳的原理，详见：5.5 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳
- SDS-PAGE电泳的样品制备及电泳的实验操作，详见：8.5~8.8 SDS-PAGE电泳1~4

2. 蛋白质转印

- 蛋白质转印是在SDS-PAGE电泳分离后，将凝胶中的蛋白质在电场作用下转印到固相的印迹膜上的过程。

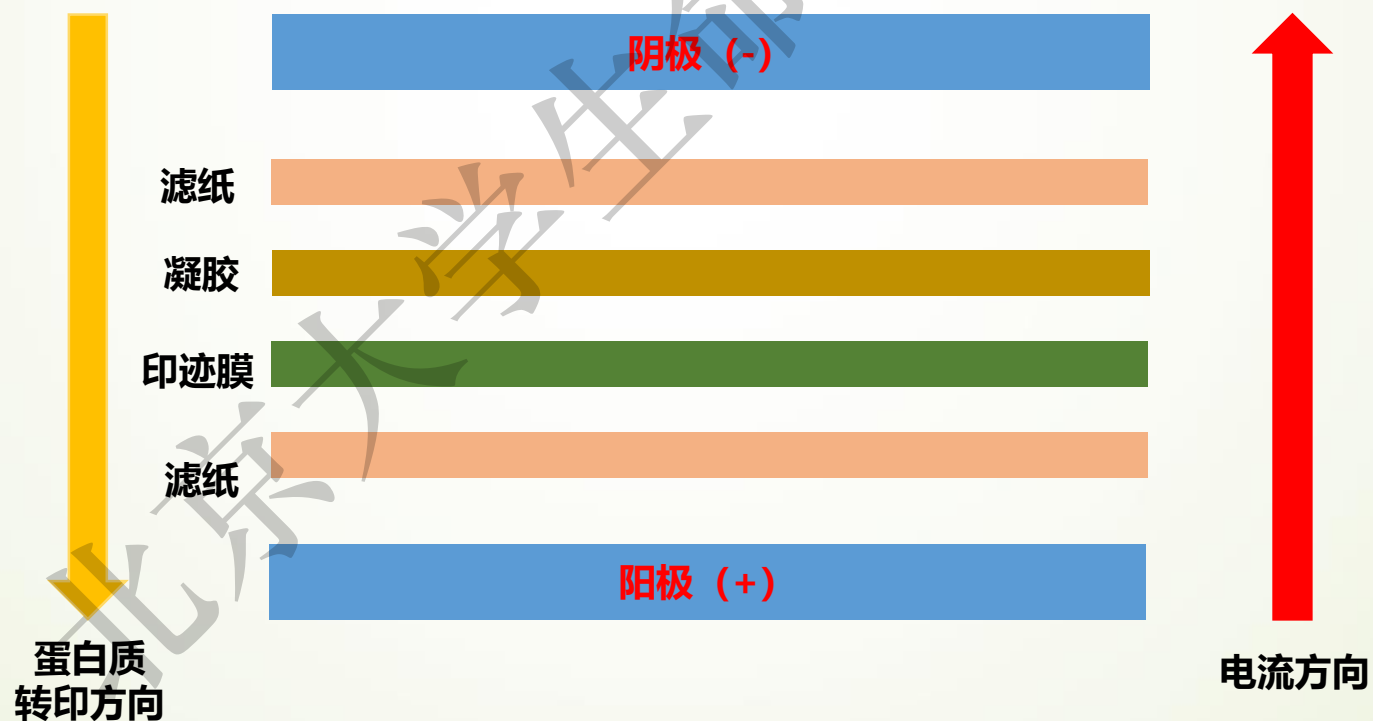


1. 湿转（槽转印）

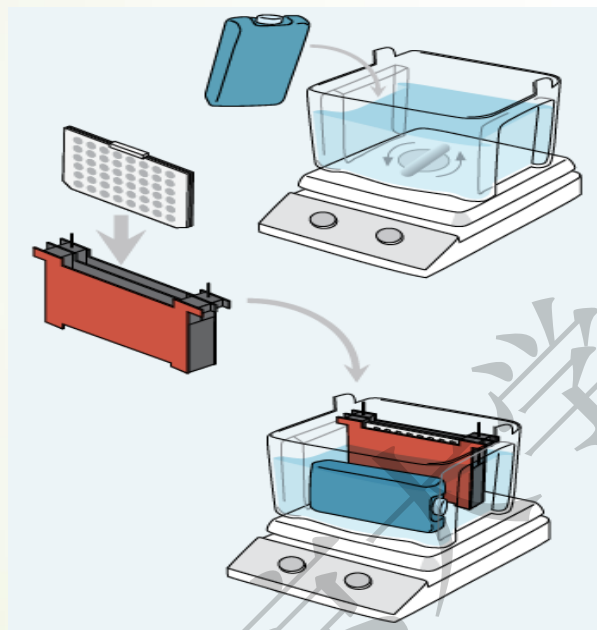
2. 半干转印

“三明治转印” 结构

- 湿转和半干转印都是基于“滤纸-凝胶-印迹膜-滤纸”的“三明治”转印结构。



湿转（槽转印）

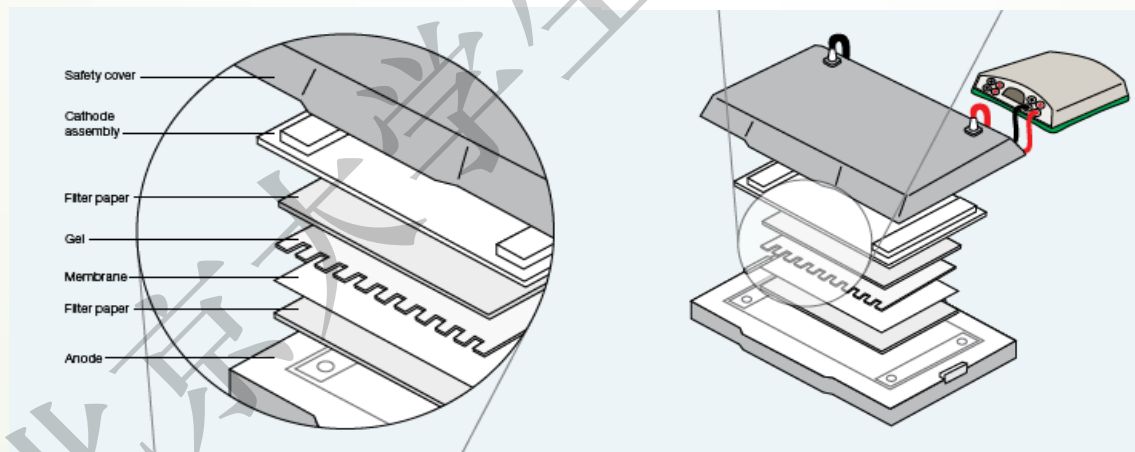


<http://www.bio-rad.com>

- 湿转，也叫槽转印，是使用凝胶转移夹将滤纸-凝胶-印迹膜-滤纸“三明治”结构固定，**横向放于两个电极之间**，浸没在装有转膜缓冲液的转印缓冲液槽中，然后加电压进行转印。
- **湿转通常会有严重的发热现象，需把转膜槽放置在冰浴中进行转印。**

半干转印

- 半干转印用浸透缓冲液的多层滤纸（或1层转印用超厚滤纸）代替缓冲液槽，将“滤纸-凝胶-印迹膜-滤纸”的“三明治”转印结构直接**垂直放置**于两个平板电极之间进行转印。因为电极板直接与滤纸接触，使凝胶中蛋白质快速高效转移至印迹膜。



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

- 蛋白质半干转印的实验操作，详见：8.10 WB的转印与封闭

转印方法比较

半干转印

适合相对分子质量较小的蛋白质
(10~100 kDa)

转印时间短 (15~60 min)

节省试剂

湿转

适合所有相对分子质量大小，特别是相
对分子质量大的蛋白质 (> 100 kDa)

转印时间长 (> 1 h或过夜)

耗费试剂及溶液

常用的印迹膜

硝酸纤维素膜 (NC
膜)

- NC膜是蛋白质免疫印迹实验最广泛使用的转移介质。

聚偏二氟乙烯膜
(PVDF膜)

- PVDF膜是蛋白质N末端测序、氨基酸分析和蛋白质免疫印迹实验的理想载体。

常用的印迹膜

NC膜

- 优点：背景低，信噪比高，使用简便，容易封闭。
- 对蛋白有很强的结合能力，典型结合量是80-100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。

PVDF膜

- 优点：与NC膜相比，PVDF膜在蛋白质截留能力，机械强度和化学相容性上性能优越。
- 结合能力：PVDF膜结合量是100-200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。

注意：PVDF膜需要100%甲醇浸润活化，再用转膜缓冲液平衡，方可转印。

转印效果观察

- 直接观察印迹膜上转印自电泳凝胶的预染蛋白质标准品条带。

预染蛋白质
marker观察

- 灵敏度低，染色可逆。蛋白带出现后，去离子水漂洗即可脱色。
- 与后续免疫检测兼容。

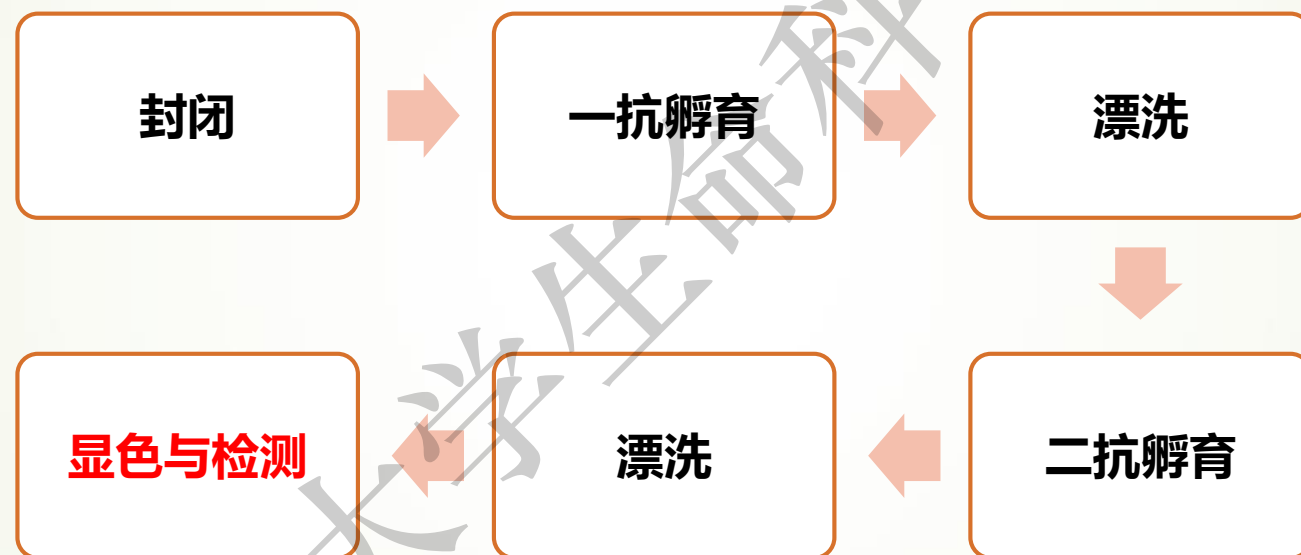
丽春红染色

- 仅用于放射性标记抗体或放射性标记A蛋白探针的Western blot印迹过程。
- 与后续免疫检测不兼容。

印度墨汁染色

实验中，通常通过观察预染蛋白质标准品条带来确定转印效果。

3. 目的蛋白质的免疫学检测



- Western blot的显色与检测，详见：6.6 蛋白质免疫印迹的检测方法
- Western blot印迹膜的显色操作，8.12 WB的DAB显色

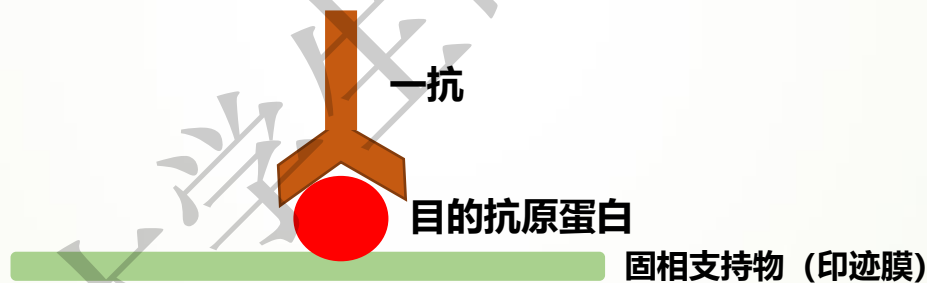
封闭

- 封闭的目的：避免第一抗体（简称一抗）与膜发生非特异性结合，使非特异性背景提高，需对印迹膜上的潜在结合位点进行封闭处理。
- 封闭液：含5%脱脂奶粉或牛血清白蛋白BSA的PBST或TBST溶液。
- 封闭液中Tween-20的作用：减少非特异性吸附，不影响抗体与抗原的结合。

封闭的实验操作详见：8.10 WB的转印与封闭

一抗孵育

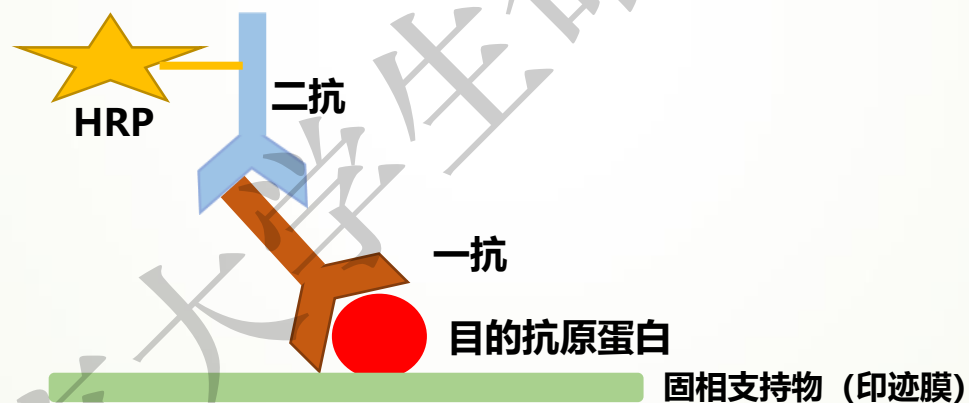
- 一抗孵育的作用：使一抗稀释液中的一抗与印迹膜上的目的抗原蛋白质特异结合。



- 一抗孵育的实验操作详见：8.11 WB的一抗和二抗孵育
- 一抗稀释液的配制详见：6.8 PBST及抗体稀释液的配制

二抗孵育

- 二抗孵育的作用：使二抗稀释液中辣根过氧化物酶HRP标记的二抗与印迹膜上已经结合目的抗原蛋白的一抗特异结合。



- 二抗孵育的实验操作详见：8.11 WB的一抗和二抗孵育
- 二抗稀释液的配制详见：6.8 PBST及抗体稀释液的配制

印迹膜的重复利用

- Western blot实验在一抗二抗结合和化学发光检测后，有时还需要检测 tubulin、actin等内参蛋白的表达，或检测比较其它目的蛋白质。
- **方法：**使用Western一抗二抗去除液stripping buffer，去除印迹膜上已结合的一抗和二抗，然后重新利用使用过的印迹膜检测其它蛋白质。
- **优点：**与重新进行SDS-PAGE电泳及转印相比，省时省力，可以消除重新上样而带来的误差。