

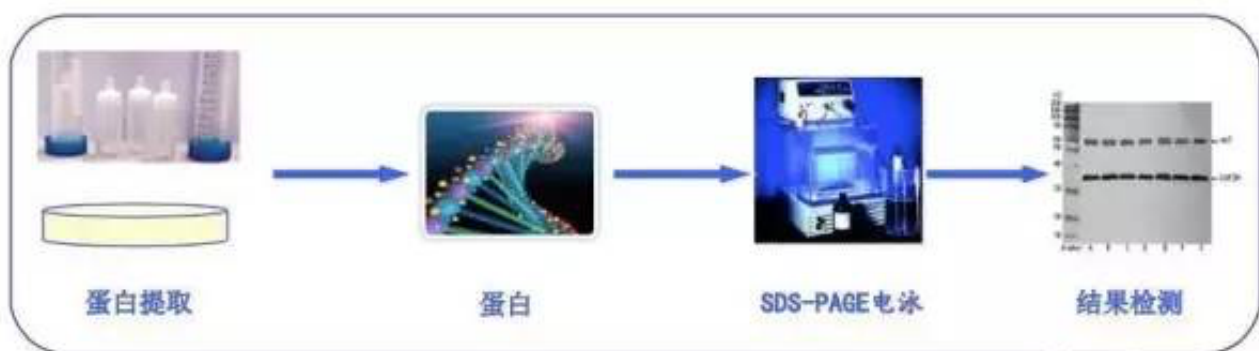
切换到桌面版

[转载]标准western blot实验方法与十年辛酸WB经验总结 ●（精心之作）

2016-4-26 11:03

阅读：5928

标准Western blot 实验方法

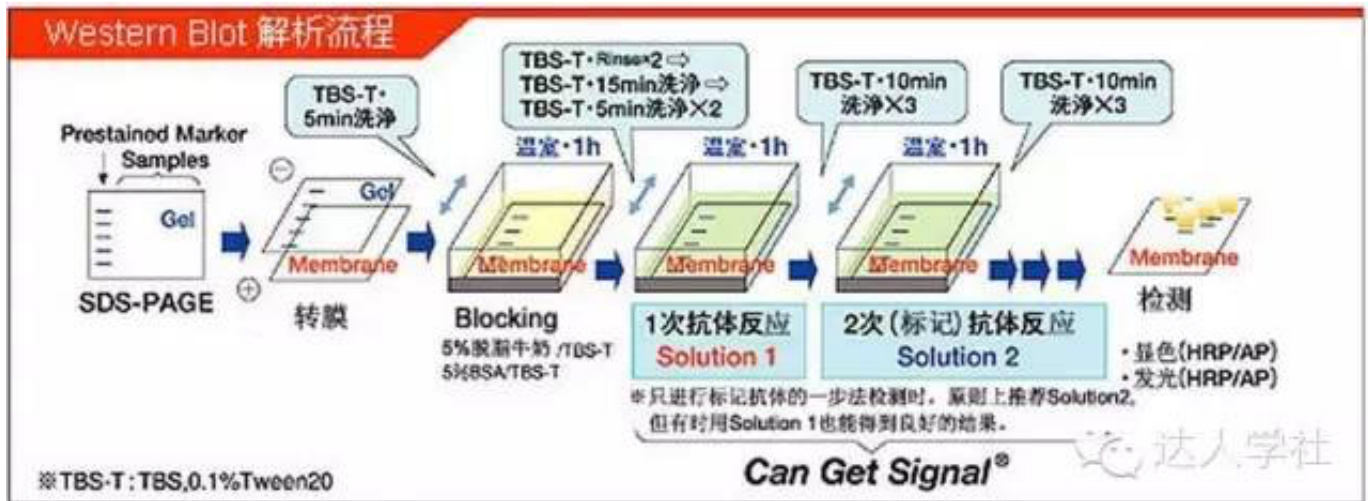


摘要： 本文主要是针对Westernblot的原理及操作进行了简单的阐述，Western印迹法是利用抗原抗体的免疫反应，先将蛋白通过SDS-PAGE电泳分离开来，然后再利用电场力的作用将胶上的蛋白转移到固相载体（NC膜）上，然后再加抗体形成抗原抗体复合物，利用发光或显色原理将结果显示到膜或底片上。同时对Westernblot在实际操作中应注意的细节问题进行了归纳以及与其它免疫技术就抗体检测方面进行了比较。

关键词： Westernblot； 免疫反应抗体； 转膜； 显色； 蛋白条带

印迹法是指将样品转移到固相载体上，而后利用相应的探测反应来检测样品的一种方法。1975年，Southern建立了将DNA转移到硝酸纤维素膜（NC）上，并利用DNA-RNA杂交检测特定的DNA片段的方法，称为Southern印迹法。而后人们用类似的方法，对RNA和蛋白质进行印迹分析，对RNA的印迹分析称为Northern印迹法，对单向电泳后的蛋白质印迹分析称为Western印迹法（Westernblot），对双向电泳后蛋白质分子的印迹分析称为Eastern印迹法。

一、Western blot的原理:



Western blot 的发明者一般认为是美国斯坦福大学的乔治·斯塔克 (George Stark)。在尼尔·伯奈特 (Neal Burnette) 于 1981 年所著的《分析生物化学》(Analytical Biochemistry) 中首次被称为 Western Blot。Western blot 首先是要将电泳后分离的蛋白从凝胶中转移到 NC 膜上, 通常有两种方法: 毛细管印迹法和电泳印迹法。毛细管印迹法是将凝胶放在缓冲液浸湿的滤纸上, 在凝胶上放一片 NC 膜, 再在上面放一层滤纸等吸水物质并用重物压好, 缓冲液就会通过毛细作用流过凝胶。缓冲液通过凝胶时会把蛋白质带到 NC 膜上, NC 膜可以与蛋白质通过疏水作用产生不可逆的结合。但是这种方法转移效率低, 通常只能转移凝胶中的一小部分蛋白质 (10%-20%)。而电泳印迹可以更快速有效的进行转移。

这种方法是用有孔的塑料和有机玻璃板将凝胶和NC膜夹成“三明治”形状，而后浸入两个平行电极中间的缓冲液中进行电泳，选择适当的电泳方向就可以使蛋白质在电场力的作用下离开凝胶结合到NC膜上。常用的电泳转移方法有湿转和半干转。两者的原理完全相同，只是用于固定胶/膜叠层和施加电场的机械装置不同。湿转是一种传统方法，将胶/膜叠层浸入缓冲液槽然后加电压。这是一种有效方法但比较慢，需要大体积缓冲液且只能用一种缓冲液。半干转移，用浸透缓冲液的多层滤纸代替缓冲液槽。与湿转相比，这种方法要快（15-45 分钟）。转移后的NC膜就称为一个印迹（blot），用于对蛋白质的进一步检测。印迹首先用蛋白溶液（如10%的BSA或脱脂奶粉溶液）处理以封闭NC膜上剩余的疏水结合位点，而后用所要研究的蛋白质的抗体（一抗）处理，印迹中只有待研究的蛋白质与一抗特异结合形成抗原抗体复合物，而其它的蛋白质不能与一抗结合，这样清洗除去未结合的一抗后，印迹中只有待研究的蛋白质的位置上结合着一抗。处理过的印迹进一步

用适当标记的二抗处理，二抗是指一抗的抗体，如一抗是从鼠中获得的，则二抗就是抗鼠IgG的抗体。处理后，带有标记的二抗与一抗结合形成抗体复合物可以指示一抗的位置，即是待研究的蛋白质的位置。目前有结合各种标记物的抗体特定IgG的抗体（二抗）可以直接购买，最常用的一种是酶连的二抗，印迹用酶连二抗处理后，再用适当的底物溶液处理，当酶催化底物生成有颜色的产物时，就会产生可见的区带，指示所要研究的蛋白质位置。在酶连抗体中使用的酶通常是碱性磷酸酶（AP）或辣根过氧化物酶（HRP）。碱性磷酸酶可以将无色的底物5-溴-4-氯吲哚磷酸盐（BCIP）转化为蓝色的产物；而辣根过氧化物酶可以将H₂O₂为底物，将3-氨基-9-乙基咔唑氧化成褐色产物或将4-氯萘酚氧化成蓝色产物。另一种检测辣根过氧化物酶的方法是用增强化学发光法，辣根过氧化物酶在H₂O₂存在下，氧化化学发光物质鲁米诺并发光，通过将印迹放在照相底片上感光就可以检测出辣根过氧化物酶的存在，即目标蛋白质的存在了。除了酶连二抗作为指示剂，也可

以使用其它指示剂，比如：荧光素异硫氰酸盐标记的二抗（可通过紫外灯产生荧光）；生物素结合的二抗等等。

除了使用抗体或蛋白作为检测特定蛋白的探针以外，有时也使用其它探针如放射性标记的DNA，可以检测印迹中的DNA结合蛋白。

在Western blot实验中，有另一种方法，就是直接标记一抗，再用底物显色。这种方法叫直接法，与用二抗的间接法相比有诸多不足，标记二抗可用于很多种不同特异性的一抗，避免了标记很多一抗的需要，同时因为一抗结合不止一个二抗分子，所以二抗可以增强信号。所以一般情况下都采用间接法进行检测。

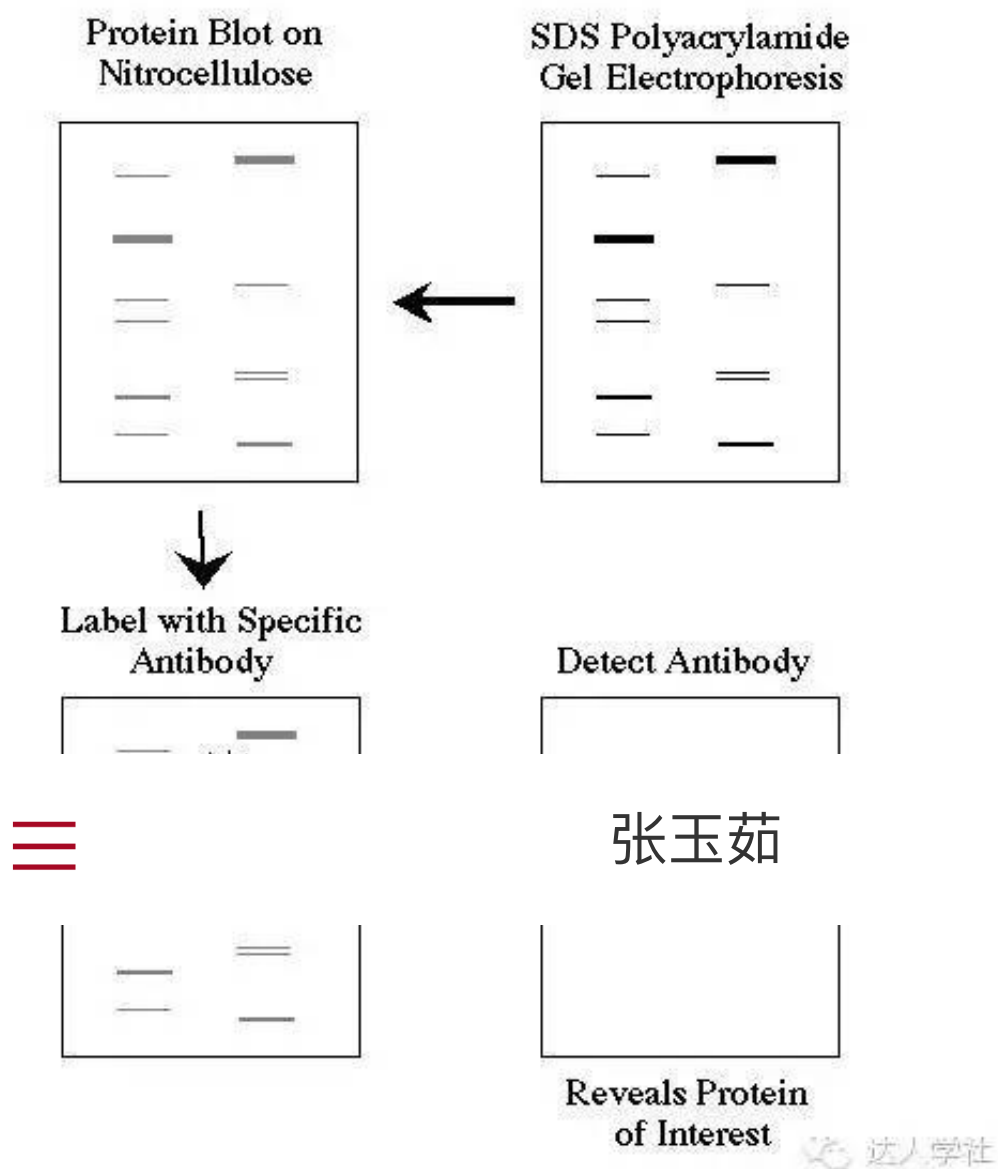
二、分类

Western Blot显色的方法主要有：放射自显影、底物化学发光ECL、底物荧光ECF、底物DAB呈色。

现常用的有底物化学发光ECL和底物DAB呈色，体同水平和实验条件的是用第一种方法，目前发表文章通

常是用底物化学发光 ECL 。只要买现成的试剂盒就行，操作也比较简单，原理如下（二抗用 HRP 标记）：反应底物为过氧化物+鲁米诺，如遇到 HRP ，即发光，可使胶片曝光，就可洗出条带。

三、Western blot的操作（间接的用二抗）



图表1 WB实验试剂配制方法

Western Blot 过程示意图



图表2 SDS-PAGE胶的配制

1、蛋白质样品（抗原）的制备：

① 细胞的处理方法：向收集到的细胞中加入_{RIPA}裂

解缓冲液（三中蛋白酶抑制在使用前加入，终浓度为 $2\mu\text{g/ml}$ ）在冰上裂解30—60min，然后再插入冰盒进行超声，超声强度以不产生泡沫为准，超声每次2-3秒，重复3-4次，再离心 12000rpm 3-5min，吸取上清备用。

组织的处理方法：按实验要求将组织从动物体内取出（样品不宜反复冻融），取少量（ $1-2\text{g}$ 左右）放入玻璃匀浆器中研磨成匀浆，然后转入EP管中进行超声，超声强度以不产生泡沫为准，超声每次5-7秒，重复5-6次，再离心 12000rpm 3-5min，吸取上清备用。

②上述两种方法得来的样品处理液还要加入 $1/4$ 体积左右的 $5\times$ 上样Buffer，然后放在沸水浴中加热3-4min使蛋白变性，方可作为样品点样。（注意：在加热组织裂解液时，肝脏和肾脏组织要特别注意其本身浓度，最好是在制作裂解液时就适当稀释，否则加热后会凝结成固态。还有些组织处理后很粘稠，有带丝状物，这是未裂解的核酸，可以适当离心后再用。）

2、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS — PAGE）

①根据要求配制好SDS-聚丙烯酰胺凝胶（一般采用10%

的SDS- PAGE)

②将已配制好的凝胶装入电泳仪中（注意不要漏液）。

③设计加样顺序，作好实验记录，按预定顺序加样。一般裂解液我们按10-20ul/道点样，重组蛋白按1-2ug/道点样。

④把电泳装置与电源连接好，将电压调至100V电泳10-20min，待溴酚蓝迁移出积层胶位置再换用200V，30-40min后关闭电源。

⑤从电泳装置上卸下凝胶玻璃板，用水冲洗干净，准备转膜。

3. 转膜（湿转）

①将凝胶玻璃板置于盛有电泳转移缓冲液的容器中，浸泡几分钟。

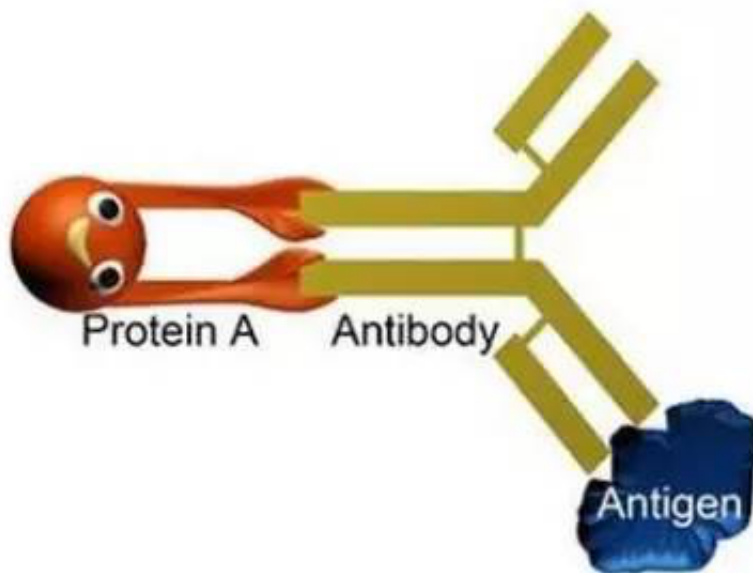
②戴上手套，准备好滤纸和NC膜（83mm×75mm），尽量避免污染滤纸和膜，将裁减好的滤纸和膜浸泡与电泳转移缓冲液中，驱除留于膜上的气泡。

③打开转移盒并放置浅盘中，用转移缓冲液将海绵垫完全浸透后将其放在转移盒壁上，海绵上再放置一张浸湿的滤纸。

④按“海绵—滤纸—凝胶—NC膜—滤纸—海绵”的顺序装置好（注意不能有气泡且装置电极槽不能放反）

⑤将冰盒装入缓冲液槽，注满 4°C 预冷的转移缓冲液。

⑥将整个装置放在冰浴中用磁力搅拌器搅拌，连接好转移电极恒流 300mA 转移 90min 。电转完毕后，将NC膜作好记号置于5%的脱脂奶粉（PBS配制）中封闭， 37°C 2小时或 4°C 过夜。



达人学社

4. 加一抗与抗原结合

①将加样槽洗涤干净，将膜用一次性手套覆盖好，按标记和实验设计切下膜条并作好记号，按顺序置于加样槽中加入相应的一抗约 1ml （PBS-T加入5%脱脂奶粉

中加入抗体，配制量根据盛放膜的器具大小而定，注意保证膜的所有部分同溶液接触。

②室温下于摇床孵育 $2h$ 或 $4^{\circ}C$ 过夜。

③弃去一抗（一般可以回收再次利用），膜条仍置于加样槽，每个槽中的膜用PBS-T在摇床洗涤洗涤 $5min$ 左右，换液，反复 $4-5$ 次。

5. 加二抗与一抗的结合

①根据实验需要和设计选择合适的酶标二抗和稀释浓度（PBS-T加入 2.5% 脱脂奶粉中加入抗体），每个加样槽中加入二抗 $1ml$ 左右室温下于摇床孵育 $1h$ ，注意保证膜的所有部分同溶液接触。

②弃去二抗，膜条仍置于加样槽，每个槽加PBS-T在摇床洗涤洗涤 $5min$ 左右，换液反复 $4-5$ 次。

6. 显色反应（重组蛋白一般用AP显色或是DAB显色，裂解液一般用发光法）

①HRP标记二抗用DAB显色，按顺序依次将DAB三种剂各取 3 滴于 $5ml$ 蒸馏水中，避光混匀，将膜加入显色液中避光显色 $5-15min$ 终止反应，对照Marker记录实验结果，将NC膜晾干扫描保存

② AKP标记二抗用AP显色，在10mlAKP缓冲液中加入66mlNBT溶液和33mlBCIP溶液混匀，室温下将膜放入显色（37℃可加速反应）5-15min。对照Marker记录实验结果，将NC膜晾干扫描保存。

③底物发光法：将两种显色底物1: 1等体积混合后将其覆盖在膜表面使其均匀，用玻璃胶片把膜包起来，马上在暗室中将x光片覆盖在膜的上面（时间根据光的亮度来衡量），显影、定影。（荧光在一段时间后会越来越弱要控制好时间）。

四、Western blot要注意的一些问题

1、为了让实验更加严谨有说服力都要设计对照实验，对照分为：阳性对照（最好有标准品（比如 β -actin，GAPDH））；阴性对照（测血时用相应小鼠未免疫血清；空白对照（不加一抗，用PBS-T代替）；无关对照（用无关抗体）

2、一抗、二抗的浓度一般要参照抗体说明书选择最适当的比例，一抗二抗的选择直接影响实验结果以及背景的深浅。

- 3、实验设计时所采用的抗原批次要一样，尽可能的避免人为的带来个体差异。特别在做裂解液时更要注意所采用的操作条件，尽可能的排除可变因素给实验带来不确定性。
- 4、凝胶的质量直接影响以后的实验结果，要特别注意几点：凝胶要均一没有气泡；积层胶与分离胶界面要水平；APS和TEMED的量不能过多，太多会导致胶易脆裂；拔梳子时要快，尽量保证点样孔平整。
- 5、电泳、转膜时特别要注意正负极，电压电流都不能过高；转膜时“三明治”的叠放次序不错，同时要防止产生气泡；尽量让电转温度保持在10度以下，冰浴为宜。
- 6、封闭时一般在室温下2h就够了，但是要注意如果是生物素标记的二抗就不宜用牛奶，因为牛奶中含有生物素，用BSA效果更好。
- 7、加一抗二抗要严格保证反应时间，洗膜要注意尽可能地将一抗二抗洗净，有利于降低背景；还要注意一抗二抗的匹配。
- 8、在显色发光时要特别注意二抗所对应的显色方

法，特别是在发光时要注意发光时间和显影时间的控制，以看得清楚目的条带为标准。

总而言之，做Western blot实验熟练掌握原理和操作是前提，关键是统筹整个实验流程，合理安排，注意细节，这样才能保证实验的高效性和准确性。

参考文献：

- [1]黄培堂等译. 分子克隆实验指南（第三版）（中译版）. 第十八章蛋白质相互作用研究技术. 北京：科学出版社, 2002年9月出版
- [2]汪家政. 蛋白质技术手册. 第五章变性条件下的凝胶电泳. 北京：科学出版社， 2000.
- [3]郭晓军. 蛋白质电泳实验技术. 第四章常规聚丙烯酰胺凝胶电泳. 北京：科学出版社， 1999.

附录：十年辛酸WB实验经验总结

道尽科研路上的辛酸和快乐，曾经经历过的人才会读懂



1. 抗体的选择

对于国内的大多数实验室来讲，做western blot实验选择抗体是个头疼的问题。原因很简单，买进口抗体捉襟见肘，买国产抗体得需要大无畏的勇气，对于我所在的兰州地区的实验者而言，感触尤深。在这五年的western blot实验历程里，我先后用过进口抗体，进

口抗体国内分装包装，国产抗体，质量良莠不齐。进口抗体一般不会出现闪失：abcam品种全，质量过硬，但价高（3400元/100微升），而且说是100微升，但至多能吸出来90微升；Sigma的价最贵；比较有性价比的是CST的抗体，现在好像是2200元/100微升，我前后用过二十几种，1:1000的稀释比下，还没有失过手，100微升通常能完成所有的免疫组化和western blot实验，还有一个优点是通常量比100微升多出来10微升，唯一的不足是CST的品种实在不多。Santa的多克隆抗体质量可以，但是选用Santa的单抗还是有风险，估计这也是业界共识了吧。

进口抗体国内分装包装我也用过不少，呵呵，毕竟是穷人（420元/100微升），大概好抗体的比例约为50%，如果能做出来，也存在一个问题，就是抗体大多只能用一次。我曾经把Santa的原装抗体和分装抗体做过比对（抗体品种，货号等完全一致），在都能做出来的前提下，原装抗体能重复使用的次数要多出许多。具体原因我已经揣测了好几年，不敢说出来，我一直在想是不是冬天西瓜切成牙和整个卖，

也会有所不同。揣测归揣测，假如只为了发论文毕业走人，可以考虑选用进口分装的多克隆抗体。国产抗体比较知名的就几家，但质量确实不敢恭维。western blot能做出来的确实不多，而且杂带多，背景不干净。我们周边的实验室大多买国产抗体做免疫组化，怎么说呢，应付硕士论文够了。我也帮别人自制过抗体，再用抗原亲和纯化。效价非常不错，夸张的时候 $1:10000$ 都能做出条带，唯一的麻烦是兔子太骚（骚臭），不知道这是不是“兔女郎”名号的来由。如果读书非常悠闲，老板又特别想拥有手工作坊的情况下，可以自己伺候折腾兔子来玩玩，刚开始的时候还是蛮有成就感的。只是单凭抗原表达和制备多抗，是不是可以写成论文毕业，估计因校而异了。

2. Western Blot 设备

目前最好的垂直槽和转移槽还是Biorad（伯乐），尤其是MINI3好用，MINI4可以一次跑四块胶，但通常用不上，由此造成垂直缓冲液的浪费，而且MINI4用绿色塑

料夹住玻璃板来组成内槽，容易漏液，塑料夹应该是有疲劳寿命的，估计日子一长，弹性就会改变，所以如果你们实验室刚买了MINI4，赶紧用，遭殃的肯定是某一级的师弟师妹们。

Biorad的一套系统得两万多，西部能玩得起伯乐的还真不多。好在咱中国人聪明，上海天能的外观和构造和伯乐的MINI3几乎一模一样，而且可以通用，不带电泳仪是5千多一套，挺好用的。唯一的不足是塑料寿命不如伯乐，胶架容易断裂。不过仔细算算，三套天能也就是一套伯乐的价格，值了。北京六一的垂直槽很转移槽很好用，但垂直槽配胶不方便，玻板太厚，散热不好，但能用，六一的电泳仪（电源）还是很好用的。

3. Western Blot实验条件

Western Blot实验条件我基本是按ABCAM公司经典教材做的，按以下的网址下载下来就可以了（<http://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/WB-beginner.pdf>）。具体的试剂配方我是按宝生物试剂册的附录部分配制。丙烯酰胺和甲叉我是从北

京华美买的德国biomol原装货，配出来的胶可以提在手里玩，弹性非常好，价格比sigma的便宜许多，1公斤好像是480多人民币，够实验室用好长时间，现在我们实验室做双向电泳都用biomol的胶，很好用。Marker我现在用fermentas的SM1811,2微升就很清晰了，兰州的代理是上海生工。

要强调的是垂直电泳缓冲液千万不能回收用，具体原因你只需上网查查SDS-PAGE的原理就知道了。转移电泳缓冲液可以回收再用两次。

转膜我通常是快转两百200毫安/2小时，慢转80毫安/12小时。快转是一定得做冰水浴，就是把槽子泡在冰水混合液里。

封闭我通常用BD的脱脂奶粉，不归，260元500克，也是从北京华美买的。

ECL我用pierce的，500毫升1650元，比国产的还便宜好用。

胶片是柯达的，以前用过乐凯的，不如柯达。

我很少用丽春红或考马斯染膜或染胶，总觉得是脱裤子放屁的事。

4. Western Blot 实验关键

Western Blot操作步骤多，每一步的失误都会造成全盘失败，综合而言，抗体仍然是决定成败的关键，如果抗体很滥，就是神仙也没招。其中内参抗体很重要，因为内参抗体的选择关系到全盘实验的考评。Actin，Tubulin，GAPDH我都用过，Actin，Tubulin的缺点是有时候会出现复带，比较稳定的还是GAPDH。如果用心看看cell，nature，science上的文章，大多用GAPDH做内参。进口的，国内分装的，国产的，我都用过。进口的最强的1:10000都能做出条带（Upstate，现在被Minipore招安了），国内分装的也好用，但就是不好回收重复使用，国产的一般只能用一次。我要特别强调的是，实验室里最贵的抗体实际上是内参抗体，因为只要Western Blot开工，每次都得用内参抗体，而一般目的蛋白的抗体也就用几次，重复三次就了事。但内参抗体是不折不扣的耗材，严格意义上讲，每跑一次胶，就得杂一次内参，使用频率最高决定了内参是最花钱的抗体。我也自己制备过内参抗体，但好像因为种属同源性太高，背景总是不干净。进口的好，太贵；国产的只能使用一次，年终算账，不比进口的便宜

。我自己的体会是多抗制备并不是技术含量极高的事，为什么国内企业高的早不了，低的造不好呢？现在我用的是杭州贤至的 GAPDH 兔多抗，200 微升 420 元钱，我在蛋白上样量 12 微升/孔的情况下，按 1:2000 稀释比，条带非常清晰，没有杂带，是我目前用过的最好的国产抗体，我估计按 1:4000 照样能做出来，因为按 1:2000 稀释做，在暗室里点上 ECL 后肉眼清楚地看到荧光条带。抗体我在不加叠氮化钠的情况下 4 度过夜杂交，可回收重复使用 5 到 6 次。最早我是 2008 年在丁香通上看到了杭州贤至（当时名叫杭州松华）发布的广告，我就怂恿实验室主管买了 2 支，很好用，现在实验室都没有用完；2009 年我的一个朋友做 western，我推荐他又买了 1 支，做出来的效果确实好，2009 年底我到了新的实验室，western 的全套我在新实验室重新建立，啥都采购齐了，可就是买不到杭州松华的内参抗体，我上网再也找不到这个公司的网页了，没办法，只好一直蹭朋友的内参抗体用。我有个陋习，就是实验中用顺了用稳定了试剂轻易不愿意更换品牌。还好，今年 7 月份我终于找到了当

年的通讯记录，一联系才知道他们改名叫杭州贤至生物科技有限公司了，呵呵，改了个名，害我找了大半年。第三次买到的GAPDH内参抗体，还是好用，1:2000，条带清晰，回收重复用，照样work，截止目前，我的新导师对我采购的一堆试剂还没有不满意的，嘿嘿！草根出生，我也照样有我穷人的劳斯莱斯。

5.关于奶粉，膜的选择和显影定影

奶粉看似简单，其实很重要，如果要凑合，可以到超市买光明的脱脂奶粉。奶粉质量不好，会最终导致显影要么漆黑一片，要么啥都没。fluka的很好，可惜因为疯牛病的原因，现在海关禁止进口美国牛制品。我现在用的bd的，很好很稳定，如果回收使用，500可以用很长时间。细菌达到一定极限后，会导致tbst里的奶粉变质，表现为发绿发臭，一种肉眼可察觉的淡淡的绿，一种鼻子凑过去能嗅出的臭，这时候就得扔了。

nc膜，pvd膜我都用过，现在我已经固定下来用密理博的0.45微米的pvd膜。pvd膜的好处是蛋白载量大，韧

性好。唯一的麻烦是事先得用甲醇泡几分钟，目的好像是为了增强膜的正电荷。甲醇泡完后，得在转移缓冲液里泡一两分钟。国内用 nc 膜的人多一些，主要是因为 nc 膜有分装的小片，忽悠老板买一张膜就100元钱，老板肯定乐意，若是说膜得花上千元，老板就有可能长时间的思考，然后过些日子再答复你。所以大多数人会采取前一种方式，当然得告诉老板好几次，膜就100元钱。我第一次用到 pvdF 膜是和好几个实验室合资买了一卷，我出了475元，类似于打的拼车的方式。现在 pvdF 膜国内大概是1600元到1700元一卷，33厘米*375厘米，够好几个人用好长时间了，膜假货不多，至少我没有见过。我们几个拼车的穷弟兄拿着尺子分赃的时候才发现本地供货商给我们送的货少了80厘米，嘿嘿，穷鬼撵着杀叫鬼，我们花钱容易吗！所以交涉，再交涉，直到他把我们的血汗膜返还才罢休。现在我基本是从北京的欣津科和华美买，大概1700元一卷，完完整整。

0.45微米的 pvdF 膜我用5%的脱脂奶粉（溶于 tBST 中）室温封闭1小时，0.22微米的用8%的脱脂奶粉。 bsa 我很少用

，主要是bsa会出现封闭不均匀的情况。我也很少用0.22微米的膜，原因是背景不干净，再者无论是封闭时间还是洗膜时间都得延长。标准教程上推荐20kd以下的分子用0.22微米的膜，我杂过最小的分子是cleaved-caspase3,12ka，按我在一楼的转膜条件，在0.45微米的膜上清清楚楚。我在上海的师弟他们转7ka的分子也用0.45微米的，没出过事。废话一句，我师弟的实验室可是国家重点，那个富呀，让我闭上眼想想吧，那可是屎壳郎掉到了化粪池的感觉。

一抗我一般4度摇床过夜，洗膜3次，每次5分钟。要注意的是，如果一抗里添加了叠氮化钠，务必洗膜5次，每次10分钟，因为叠氮化钠会灭活二抗偶联的辣根过氧化物酶（hrp）活性。二抗我用的是中杉金桥分装的，120元一支，通常1:5000，室温1小时，然后洗膜三次，每次5分钟。

奶粉，一抗，二抗，我都回收，从开始到现在，一直如此。因为我不敢忘记自己贼的出身。我的一抗是国外的一位老师送给实验室的，刚开始的半年我啥都做不出来，以至于导师在平安夜领我到教堂祈

涛。上海的师弟知道后，每次裁膜的时候给我一小片一小片日积月累了一些，二抗只拿到了 10^6 微升，我怕实验室的人发现，一直是熬夜做western。可最终还是因为我自己嘴不牢靠，导致东窗事发，师弟险些被开除，事情败露的那天，师弟在长途电话的那边哭，我在这边哭，写着写着，我的眼泪又一次的盈眶而出，说不出的辛酸与悲凉，师弟说他承担一切责任，让我装作不知道，那天晚上，我给他的导师写了一封长信，只求能保住师弟。老天保佑，他导师让师弟写检查认错。那以后，我再也没有让师弟为我偷过东西，我不能再为自己的理想让朋友付出代价。虽然现在实验室的老板比较大方，我依然坚持着回收试剂的习惯，我始终不能忘记自己western blot的开始。

一般 8.3×4.3 厘米的膜，大概要 400^6 微升的 125 I混合液。加 125 I我一般就在灯光下，或者白天把窗帘拉上。加好 125 I，覆上保鲜膜后，我才端着暗盒进暗室，暗室里我的暗室红灯始终开着，没有那么可怕。在暗室里，我一般是剪4张同样尺寸的胶片，叠在一起，压在

膜上方，暗盒一扣，就干别的事情去了。5个小时或过夜，我再把胶片显影，显影我起初很注意技巧，但现在基本上是在显影液里放10分钟，捞出来放到水盘里涮一涮，然后在定影液里放十分钟。我一般总能找到一张理想的胶片，因为胶片叠加到一起后，层层屏蔽，从而逐渐递减荧光强度，我试过多次，即便是荧光强度最强的内参，也至多能达到最上面的第四层胶片。所以显定影后，肯定有曝光过度的胶片，但也肯定有趋势，背景，强度恰到好处的一张，嘿嘿，傻瓜做法。

傻瓜做法看似呆笨，实则不然。我在很长的一段时间里，都是读秒，或三分钟，或15分钟，或半小时，或1小时取出胶片显影，眼睛紧紧盯着，一看到条带就捞出来定影。如果不理想，再压胶片，再等，再取再投再捞，活脱脱是个“猴埋儿”。西北人传说小猴夭折了，母猴把小猴埋到土里面，一会又挖出来，再埋进去，又挖出来…反复无止。显定影时如果采取猴埋儿式的技巧，是最费胶片，最费时间，最费心力的做法。所以我是傻瓜就用傻瓜的办法

o

我用过好几个品牌的国产^{ecl}，和进口的^{ecl}也做过对照。国产的一半是^{a液b液}总共^{50毫升180元}钱，单价^{3.6元/毫升}，一般肉眼可见的荧光强度可持续¹个小时，^{pierce}和^{milipore}的可以持续³小时。^{milipore}的麻烦之处在于由^{a液b液c液}三组成分组成，费枪头，费脑子。现在我固定使用^{pierce}的^{super ecl}，^{1650元500毫升}，折算下来是^{3.3元/毫升}。上海吉泰是代理。好像分子克隆上写出了^{ecl}的配方，技术含量并不高，

胶片我用过医院放射科的，乐凯的，柯达的，柯达现在小胶片（小暗盒尺寸）好像是^{130元/50张}，乐凯的是其价格的一半。乐凯的缺点在于胶片容易出现划痕，有莫名奇妙的背景，虽然瑕不掩瑜，但还是让人不爽，再就是感光不如柯达的灵敏。这些我都比对过。如果细心地把二者胶片厚度比比，也可看出差距。我就此请教过甘肃的乐凯总代理，他说根源出在牛身上。

显影液定影液我一直用乐凯的，便宜，量又足，谁用谁说好。进口的从未染指，连想都没想过，呵呵，

我内心里还是极其渴望支持国货的，爱之深，恨之切啊！

6. 总结

从2005年第一次见到抗体到现在，我已经做western blot实验整整五年了。五年里，太多的磨难，太多的惊喜，太多的感触，太多的代价。现在我做博士后，我指导的学生也能一次就上手，虽然他们也会出错，但我很少责备他们，因为我知道自己的路途也并不顺利，如果过度的责难他们，会让他们失去信心，而且更严重的是会导致他们遮遮掩掩，我从来不怕实验做不出来结果，就怕查不出失败的原因。

我喜欢western blot技术，甚至偏爱或痴迷。最夸张的时候是一天连跑带转了八张膜，实验最不顺利的那两个月我天天就睡在实验室里，有时候三天三夜不睡觉。我不知道自己借了多少钱从丁香园的二手资源版淘过别人用剩的抗体，至今我穿的最贵的裤子也就80元钱，但花1000元买抗体我从来没有觉得破费。好在我的家人和朋友们理解我，支持我，让我能逐

步实现自己的愿望。五年里，从器具，试剂，仪器，甚至如何用滤纸，我都形成了自己独有的体系和诀窍，我的一切东东都有品牌，这些品牌组合起来就是穷人的劳斯莱斯。

回想过去，内心仍然会浸没到悲凉与辛酸中。最难受的时候是做p21抗体，整整半年，从甲骨文淘了五个品牌的抗体，都做不出来。最后逼着导师买cst的抗体，还是不出，那时候正好是2008年雪灾，抗体在公路上走了半个月，我收到抗体是大年初二，兴奋地上样，转膜，还是没有，当时我感觉自己就好像浸没在冰窖里。宿舍里暖气不好，第二天我起床时，房子里的洗脸水都已结冰，和我的心绪一模一样。好在上海吉泰是一级代理，让我投诉，cst美国总部发回来他们的蛋白阳性对照品，再试，p21出来了，技术支持是个印度人，一眼就看出来我没有用超声波裂解。我们实验室没有这个东东，我怎么就想不到问题就出在这呢！从投诉到解决问题又是两个月。因为western，造成我博士延期一年半，害得师弟差点被开除，这也是我主动和导师关系疏远的开始

。

但我还是痴迷western，在我心里，western blot技术本身就是穷人的劳斯莱斯。跑一次胶，我一次可以在两张膜上裁切出13种分子，我想不出还有哪项技术能一次实现如此之多的指标。Western 稳定，直观，看着胶片上那粗细浓淡变化的条带，就好像自己置身细胞内部，看着那些分子组合跳舞。我内心里一直非常感激当年馈赠抗体的那位老师，是他让我踏上了信号转导的道路，也是因为western，我一度和他几乎决裂。在做western之前，我看文献几乎只看review，因为我看不懂实验性论文的图片，也正是做western，我才开始真正的踏上科研道路。我逐渐能看懂IP,CO-IP,EMSA,CHIP，我有了更多的梦想与愿望。五年中，我最得意的是陪着western blot的发明人乔治斯塔克(George R. Stark)院士去敦煌玩。老头年过70，动过心脏手术不久，仍然坚持赤脚爬上陡峭的鸣沙山。我们登顶歇气时，老头一声不吭地又从山顶一步步走下去，从半山腰挖什么东西，等他再上来，我们才看清楚，他手里拿着两个游客随地扔弃的矿泉水瓶子。老头一直把那两个

国货拎到了山下的垃圾箱里。这是老头给我最深刻的记忆，境当谋高远，一个人的精神境界决定了他专业道路的高远。

从western实验我总结出，实验上根本省不下来钱，一个环节的烂货就会导致全盘失败。对于实验设计而言，也是如此，一个步骤的bug会导致整个实验立题和评估的逻辑混乱。如果要追求性价比，也就是如何发挥穷人的劳斯莱斯的最大收益，那从一开始就要按秋后算账的原则选择试剂，要算总账；如果要让实验顺顺利利，那就得注意每一个环节，步步为营，细节决定成败。

转载本文请联系原作者获取授权，同时请注明本文来自张玉茹科学网博客。

链接地址：<http://wap.sciencenet.cn/blog-713614-972858.html>

分享到：

0

分享

收藏

上一篇

下一篇

当前推荐数：0

推荐到博客首页

网友评论

0 条评论

该博文允许注册用户评论 请[点击登录](#)

↑ 上拉加载更多