

# WB实验操作基础

From Gene To Antibody

普健生物（武汉）科技有限公司

AtaGenix Laboratories

2023年3月





## 蛋白重组表达

XtenCHO高密度表达系统

昆虫杆状病毒表达系统

稳定细胞株构建

## 抗体定制服务

兔单克隆抗体制备

纳米抗体制备

抗体对开发

## 重组抗体表达

嵌合抗体生产

抗体片段生产

大规模重组抗体生产

## 抗体药物开发

人源化抗体

双特异性抗体

抗独特型抗体

**普健生物（武汉）科技有限公司**

始于2012，一站式抗体发现整体解决方案

3551光谷人才计划

——2013年

高新技术企业

——2017年

光谷瞪羚企业

——2018年

武汉国家生物产业基地  
抗体发现与筛选公共服务平台

——2022年



## 基本概念

01

蛋白免疫印迹（Western Blot）是将电泳分离后的细胞或组织中蛋白质从凝胶转移到固相支持物NC膜或PVDF膜上，然后用特异性抗体检测某特定抗原的一种蛋白质检测技术。

02

SDS-PAGE：十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，是以聚丙烯酰胺凝胶作为支持介质的一种电泳技术。

### 蛋白免疫印迹（Western Blot）基本步骤概览





## 样本制备-裂解液

裂解缓冲液里含有不同浓度的变性剂，盐，酶抑制剂（如磷酸酶抑制剂或蛋白酶抑制剂），此类试剂用于分离细胞，溶解蛋白，防止降解。

目的蛋白分布定位	推荐使用的裂解液
细胞	NP-40 or RIPA
细胞质（一般是可溶性蛋白）	Tris-HCl
细胞质（细胞骨架等不溶蛋白）	Tris-Triton
细胞质（磷酸化蛋白）	
细胞膜	NP-40 or RIPA
细胞核	RIPA
线粒体	RIPA





## 样本制备-蛋白酶抑制剂

指与蛋白酶分子活性中心上的一些基团结合，蛋白酶活力下降，甚至消失，但不使酶蛋白变性的物质。

蛋白酶抑制剂	作用特点
苯甲酰磺酰氟(PMSF)	抑制丝氨酸蛋白酶和巯基蛋白酶
乙二胺四乙酸 (EDTA)	作为螯合剂可逆抑制金属蛋白水解酶
胃蛋白酶抑制剂(pepstatin)	抑制酸性蛋白酶如胃蛋白酶，血管紧张肽原酶，组织蛋白酶D和凝乳酶
亮抑蛋白酶肽 (leupeptin)	可逆抑制丝氨酸、半胱氨酸蛋白酶和巯基蛋白酶，如木瓜蛋白酶，血浆酶和组织蛋白酶B
胰蛋白酶抑制剂 (aprotinin)	竞争性可逆抑制丝氨酸蛋白酶，如血浆酶，血管舒缓素，胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶
胃酶抑素A (Pepstatin A)	天冬氨酸蛋白酶可逆抑制剂
乌苯美司 (E-64, Ubenimex, NN)	可逆的氨基肽酶抑制剂，对精氨酸氨基肽酶，白三烯A4水解酶，丙氨酸氨基肽酶，亮氨酸/胱氨酸氨基肽酶有抑制作用

### 样本制备小Tip:

1. 收集细胞离心时转速需适当
2. 尽量去除核酸，多糖，脂类等干扰分子
3. 防止蛋白质在样品处理过程中的人为对蛋白修饰的改变，制备过程应在低温进行
4. 样品建议分装成合适的量，然后冷冻干燥或直接以液体状态置-80℃中保存，但要注意不要反复冻
5. 煮样时防止爆管



## 凝胶制备-下层胶制备

配制所需浓度的分离胶，最后加入TEMED后立即混匀即可灌胶，然后将纯水缓慢均匀加入到缝隙中直到灌满过程中注意不要把胶冲散。30min后分离胶凝固即可倒去胶上层水并用吸水纸将残留水吸干。

分离胶浓度（下层胶）						
试剂	6%	7%	8%	10%	12%	15%
ddH <sub>2</sub> O ml	5.3	5	4.7	4	3.3	2.3
30%丙烯酰胺（29：1）ml	2	2.3	2.6	3.3	4	5
1.5M TRIS-HCl (PH 8.8) ml	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
10%SDS u1	100	100	100	100	100	100
AP u1	100	100	100	100	100	100
TEMED ml	10u1	10u1	10u1	10u1	10u1	10u1
总体积 ml	10ml					



## 凝胶制备-上层胶制备

按照以下方法配制5%的浓缩胶，最后加入TEMED后立即混匀即可灌胶。将剩余空间灌满浓缩胶然后将梳子插入浓缩胶中，注意梳子下面不能有气泡。30-60min后分离胶凝固，取下制胶器，小心拔掉梳子，即可准备开始上样电泳。

分离胶浓度（上层胶）			
试剂	浓度 5%		试剂
ddH <sub>2</sub> O mL	4	20	ddH <sub>2</sub> O mL
30%丙烯酰胺（29：1）mL	1	5	30%丙烯酰胺（29：1）mL
1M TRIS-HCl (PH 6.8)ml	1	5	1M TRIS-HCl (PH 6.8)ml
10%SDS uL	80	400	10%SDS uL
AP uL	60	300	AP uL
TEMED uL	6uL	30uL	TEMED uL
总体积 mL	6ml	30ml	总体积 mL

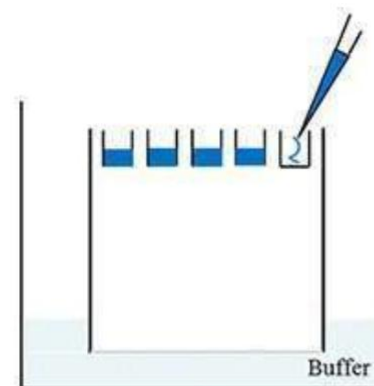
1. 保持所有装置清洁，所有试剂保持正确的PH值，AP新鲜配置
2. 凝胶混合速度需适中，太快凝胶产生气泡，太慢凝胶不均匀
5. 分离胶勿倒满，留有空隙方便插梳子



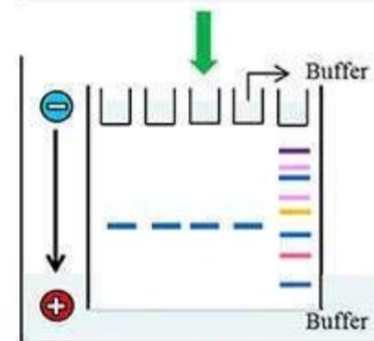
## 上样

**上样前处理：**从-20冰箱中取出需要使用的样本，置于干式加热器上加热95° C，15min，稍冷却，震荡样本，置于掌上离心机上离心5-10s。注意：蛋白Marker不可加热煮沸。

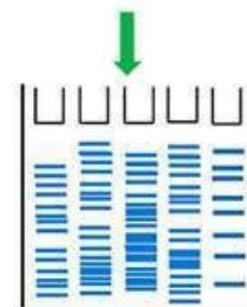
1. 20-50ug总蛋白或者100ng纯蛋白，可根据蛋白表达水平进行优化
2. 尽量保证每个泳道蛋白量、体积一致
3. 空泳道用等体积的1xloading上样



Protein samples and marker loaded in vertical SDS-PAGE system



Direction of migration of samples in vertical SDS-PAGE system



SDS-PAGE gel after Coomassie blue staining





# 电泳

- ◆ 将制胶器放入电泳槽后加入足够的电泳液后上样电泳，轻轻吹去上层电泳液泡沫以提供清晰的上样视野，将样品加入电泳孔中，电泳。浓缩胶电压90V，30min后进入分离胶用150V。电泳至溴酚蓝即将跑出即可终止电泳，进行转膜。
- ◆ 电泳时一般采用90/150V恒压电泳，一般电泳30min后进入分离胶可加压。电泳时会放热，注意夏季电泳时温度控制。
- ◆ 电泳过程中，要注意观察电流读数是否正常，蛋白Marker和溴酚蓝指示的电泳的情况，当电泳至电泳架底部时停止电泳。

\*注意添加电泳液时底部需漫过玻板底部，否则无法形成电流通路。注意电内槽电泳液液面，如存在内槽漏液，会导致无法形成电流通路，电泳停止，此时可重新架胶或者添满电泳液。

影响跑胶效果的主要因素	小TIP
电压	会使胶的分子筛效应得到充分发挥，浓缩胶80V，分离胶100V左右
胶的均匀度	胶越均匀，分离度越均匀
电泳缓冲液	对于大分子量的蛋白，建议使用Tris-乙酸胶和配套缓冲液进行电泳



### 3. 转膜

1. 配置好的转膜液提前置于冰箱中预冷。

2. 准备6张7×9cm的滤纸和一张大小适中的膜，PVDF膜在使用前要先用乙醇活化1min，后放入转膜液中浸泡（NC膜不需活化，直接浸入转膜液中）。

3. 在加有转移液的盆里放入转膜用的夹子，海绵，一支玻棒，滤纸和膜。

4. 小心剥下分离胶放在滤纸上，将PVDF膜盖于胶上，注意不要有气泡。在膜上盖三张滤纸并除去气泡。最后盖上另一个海绵垫。合上转膜夹，放入转膜槽，黑色对黑色面，白色对红色面。

5. 将转膜夹打开使黑的一面保持水平。在垫子上垫海绵、三层滤纸。

6. 转膜条件（湿转）：300mA恒流转膜，目的蛋白小于20kDa 转膜15-20min；20-60kDa转膜20-35min，大于60kDa转膜35-60min。（转膜过程中将转膜槽放在冰水中降温，转膜槽中可加冰盒降温，转膜电压小于150V时更换预冷的转膜液。）



## 转膜Tip-膜的选择

区别	NC膜	PVDF膜
灵敏度和分辨率	高	高
背景	低	低
结合能力	80~100ug/cm <sup>2</sup>	100~300ug/cm <sup>2</sup>
结合强度	低	高
材料质地	机械强度低	机械强度高
化学兼容性	低	高
是否需要活化	不需要活化	需要无水甲醇活化
适用范围	化学发光 荧光检测 常规染色	化学发光 考马斯亮蓝染色 常规染色 蛋白质检测 糖蛋白检测



## 孵育一抗&二抗

01

将转好的膜于室温下脱色摇床上用5%的脱脂牛奶(TBST配制), 封闭30-60min。

02

用封闭液稀释一抗(TBST配制的5%脱脂牛奶), 4℃孵育过夜(亦可常温孵育1.5h)。

03

用TBST在室温下脱色摇床上洗三次, 每次3-5min。

04

将二抗用TBST稀释, 1:5000, 室温下孵育45min, 用TBST在室温下脱色摇床上洗三次, 每次3-5min。



## 曝光

01

将ECL A液和ECL B液两种试剂在离心管中等体积混合，现配现用。

02

完成免疫反应的PVDF/NC膜用卷纸吸去多余液体，将PVDF/NC膜的蛋白面朝上放在曝光板上，均匀加入混合好的ECL工作液于膜上。将曝光板放入化学发光成像系统，曝光，根据条带深浅，调整曝光度，保存图片。



## 常见问题及注意事项

**配胶：**配胶是WB成功的基础，凝胶不均匀常导致结果出现异常条带。凝胶温度过高，会导致出现笑脸形状条带。

配胶试剂方面注意以下：

APS需要新鲜配制，否则可能导致胶凝不良；

配制好的Tris pH8.8和pH6.8溶液，注意环境温度对于其pH的影响，温度变化时可用pH计调整至正常pH，否则影响胶梯度。

30%丙烯酰胺配制时在通风橱中操作，杂质需要在搅拌均匀后用真空泵配合滤膜抽滤，抽滤完成后分装，4度保存。

温度高时凝胶速度快，温度低时凝胶速度慢，为保证凝胶稳定均匀，可在环境温度高时减少APS和TEMED的用量，温度低时酌情增加用量。

**上样：**上样前，样本需95度煮15min，震荡离心后使用。点样前，拔出梳子时注意勿拔断梳孔，保持梳孔竖直，如有残胶注意吸出梳孔中残胶。上样速度要快，上样完成后立即电泳，防止样本扩散。



## 常见问题及注意事项

### 转膜:

a. 转膜可分为湿转、半干转和干转，一般采用湿转。半干转和干转需借助专用试剂和仪器进行。转膜时，注意如用PVDF膜，需提前用甲醇活化后在置于转膜液中浸泡待用。制作转膜的三明治结构时，注意赶走滤纸，胶，膜，滤纸结构中的气泡，防止转膜出现空泡。

b. 转膜过程采用恒流300mA。转膜过程中会释放出大量的热，因此降温是提高转膜效率的核心。转膜槽内部加冰盒降温。

c. 转膜槽外用冰水浴降温。转膜液提前置于冰箱中预冷，注意勿结冰。如发现转膜电压较低时，可更换预冷的转膜液继续转膜。

### 免疫反应及曝光:

a. 封闭结束后，加入封闭液稀释的一抗孵育，可室温孵育1.5h或者4度孵育过夜。一般认为一抗4度过夜抗体结合特异性更好。

b. 二抗孵育时注意跟一抗种属对应，否则曝光无信号，因此曝光无信号时，需首先考虑二抗种属是否正确。



## 常见问题及注意事项

曝光结果出现条带异常的原因有：

01

出现笑脸或反笑脸：凝胶温度高，凝胶不均匀或电泳温度高，可减少APS和TEMED用量，控制凝胶和电泳时温度。

02

出现拖尾条带：样本中有不溶颗粒，可重新制样。

03

条带扭曲变形，可能是样本中盐浓度过高，可重新制样，或凝胶不均匀，胶中油杂质，可重新制胶。

04

膜上有黑点，封闭不全或牛奶未充分溶解。

05

膜上反白：局部HRP浓度过高信号过强，可降低上样量或降低一抗二抗稀释比。



## 常见问题及注意事项

曝光结果出现无信号的主要原因有：

01

二抗种属错误，  
需更换一抗对应  
种属的二抗。

02

一抗或二抗稀释比  
过低，调整一抗稀  
释比，增加孵育时  
间。

03

ECL失效，更换  
新鲜配制的ECL。

04

膜被污染，  
需重新实验。

05

蛋白丰度低，  
增加上样量。

06

转膜失败或转膜效  
率不高，可用丽春  
红染液染膜，观察  
膜上是否有蛋白条  
带。



## 常见问题及注意事项

曝光结果出现背景高的原因及解决方法：

01

抗体浓度过高，可调整抗体稀释比。

02

洗膜不充分，增加洗膜次数。

03

封闭不全，增加封闭时间或更换封闭剂。

04

曝光时间过长，减少曝光时间或提高主带信号强度。

05

室温孵育改为4度过夜孵育一抗。



# 谢谢观看！

网址：[www.atagenix.cn](http://www.atagenix.cn)

邮箱：[Sales@atagenix.com](mailto:Sales@atagenix.com)

武汉市东湖新技术开发区神墩四路666号C栋

