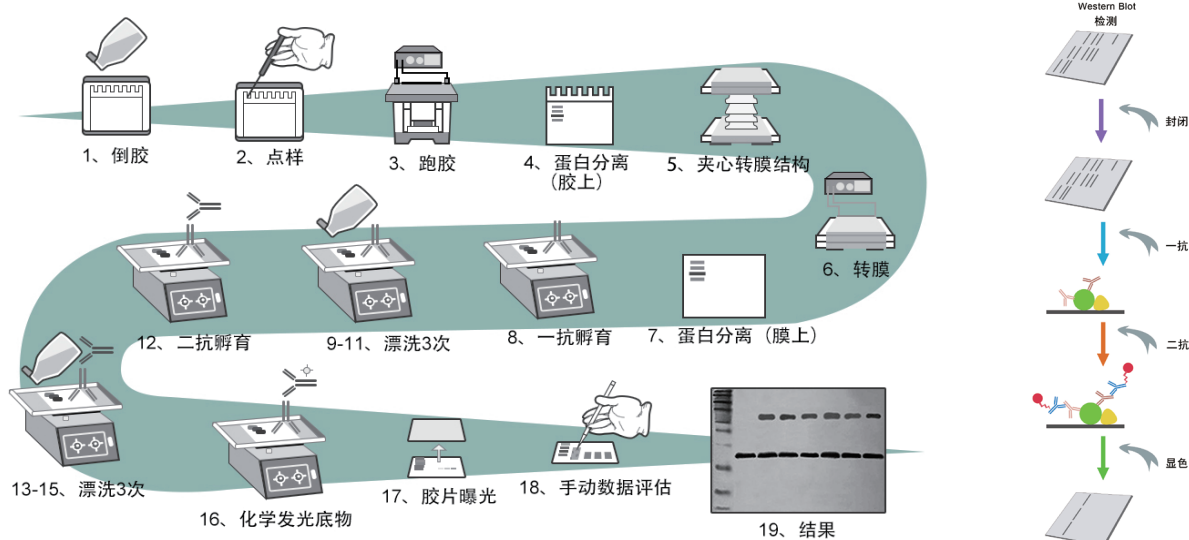




免疫印迹实验相关原理介绍

免疫印迹 (Western blot) 简介和原理 (图片展示)

免疫印迹用于鉴定能够与特异性抗体相互作用的大分子抗原 (一般为蛋白质) 并测定抗原的大小。蛋白质首先通过 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 再通过电泳转移到固相支持物上, 固相支持物包括硝酸纤维素膜, 聚偏乙烯二氟 (PVDF) 膜和阳离子尼龙膜等。首先把膜上未反应的位点封闭起来以抑制抗体的非特异性吸附, 这样固定的蛋白即可与特异性的多克隆或单克隆抗体相互作用。最后通过放射, 生色或化学发光的方法进行定位。



实验常规试剂

1. 1.0 mol/L Tris•HCl (pH6.8)
2. 1.5 mol/L Tris•HCl (pH8.8)
3. 10% SDS
4. 10% 过硫酸胺 (AP)
7. 还原型 5XSDS 上样缓冲液
8. 10X 电泳液缓冲液
9. 10X 转膜缓冲液
10. 1X 转膜缓冲液
11. 10XTBS 缓冲液
12. 1XTBST 缓冲液
13. 封闭缓冲液: 1X TBST 含 5% w/v 脱脂牛奶或者 1X TBST 含 2%-5% 的牛血清白蛋白 (BSA)。
14. 一抗 / 二抗稀释缓冲液: 常规稀释液使用的是含 5% BSA 或 5% 脱脂牛奶的 1X TBST, 见一抗 / 二抗说明书; 每种 Elabscience 抗体都有固定的最佳稀释比例。

实验具体步骤

1. 根据待测蛋白分子量大小确定凝胶 (分离胶) 浓度制胶
2. 使用适当的裂解液以及裂解方法裂解贴壁细胞、悬浮细胞或者组织样品。上样
3. 跑胶: 浓缩胶推荐用 80 伏电压, 待样品进入分离胶后, 可用 120-180 伏。
4. 跑胶完成以后, 需先将胶上无样品的多余部分切除, 滤纸和海绵需要预先润湿。



5. 分离的多肽转移至膜载体上

选择合适的膜

转膜：以 NC 膜为例

提前十分钟到半小时用转膜 Buffer 润洗 NC 膜

按照以下的结构来安装转膜体系：负极 - 海绵 - 三层滤纸 - 胶 - 膜 - 两层滤纸 - 海绵 - 负极。

6. 转膜，一般为 2 小时。

7. 转完后将膜用 $1\times$ 丽春红染液染 5 min（于脱色摇床上摇）。然后用水冲洗掉没染上的染液就可看到膜上的蛋白。将膜晾干备用。

8. 抗原检测

免疫印迹膜上非特异性蛋白质结合位点的封闭：

a. 转好的膜先用 TBST 润洗两次，每次五分钟。低速水平摇床，常温。

b. 用 5% 的脱脂牛奶（TBST 配制）常温封闭一至两小时。封闭过程应在常温下置于转速较低的水平摇床。

抗体与抗原特异性结合：一抗孵育

9-11. 用 TBST 洗膜三次，每次十分钟。

12. 常温下用二抗孵育一到两个小时。

13-15. 用 TBST 洗膜三次，每次十分钟。

16. 准备 ECL 底物，对 $8\times 5\text{cm}$ 的膜，2 毫升（1 毫升 A 加 1 毫升 B）足够。将膜浸润底物中 1 分钟，然后取出，用滤纸吸掉膜上多余的底物。

17. 用 x-ray 底片曝光，根据信号的强弱适当调整曝光时间，一般为 1 min 或 5 min，也可选择不同时间多次压片，以达最佳效果；曝光完成后，打开 X- 光片夹，取出 X- 光片，迅速浸入显影液中显影，待出现明显条带后，即刻终止显影。

免疫印迹 (Western blot) 常见问题分析指南

1. 为什么电泳的条带很粗？

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；

2. 为什么电泳电压很高而电流却很低呢？

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。