



# Western Blot技术与诊断应用



客服热线：400-898-0321

E-mail: [trans@transgen.com.cn](mailto:trans@transgen.com.cn)

北京全式金生物技术有限公司  
[www.transgen.com.cn](http://www.transgen.com.cn)

背景简介

Western Blot检测流程详解

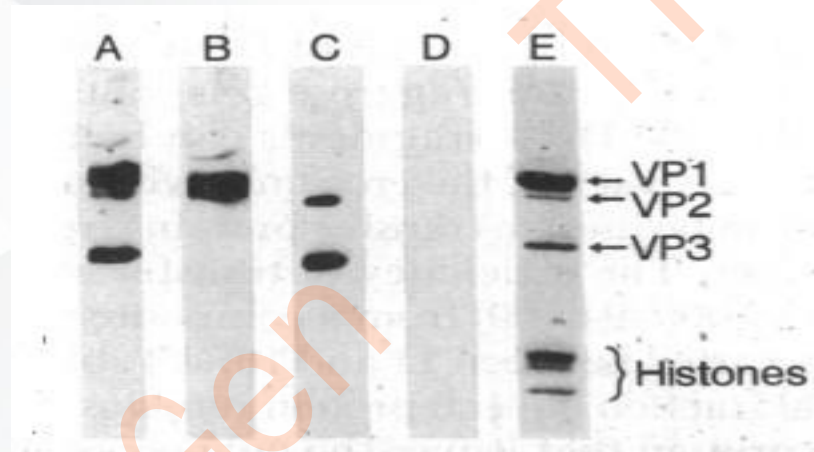
Western Blot诊断应用

Western Blot检测现状

- Western Blot 蛋白质印迹法
- 又称免疫印迹试验，它是分子生物学、生物化学和免疫遗传学中常用的一种实验方法。
- 基本原理是通过特异性抗体对凝胶电泳处理过的细胞或生物组织样品进行着色。通过分析着色的位置和着色深度获得特定蛋白质在所分析的细胞或组织中表达情况的信息。

# Western Blot起源

- Renart, J., J. Reiser, **G. R. Stark**, (1979). "Transfer of proteins from gels to diazobenzylomethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure." Proc Natl Acad Sci U S A 76(7): 3116-20.

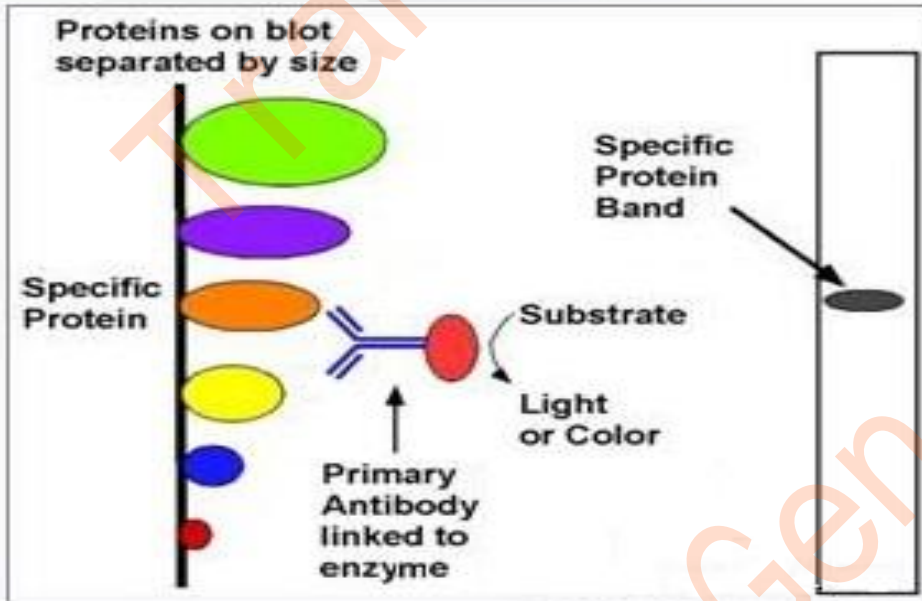


- DNA杂交技术, Southern Blot ---1975
- RNA杂交技术, Northern Blot ---1977
- **蛋白质印迹技术, Western Blot ---1979**

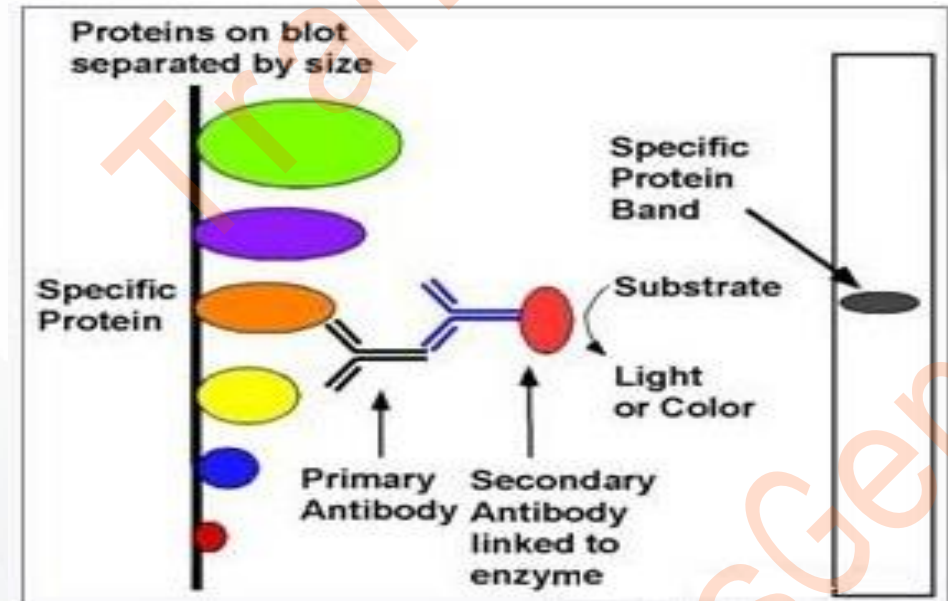
# Western Blot的应用

- 定性或半定量分析目的蛋白的特异性表达
- 蛋白-蛋白、蛋白-DNA和蛋白-RNA相互作用的后续分析
- 蛋白修饰的鉴定（磷酸化、糖基化的鉴定）

# Western Blot实验原理



• 直接法



• 间接法

背景简介

Western Blot检测流程详解

Western Blot诊断应用

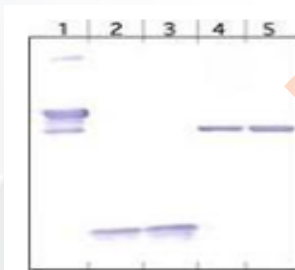
Western Blot检测现状

# Western Blot实验流程

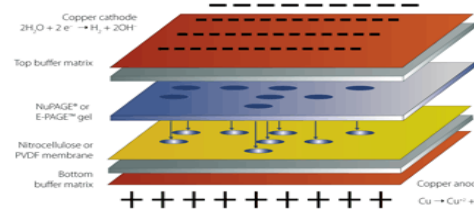
样品制备及定量



SDS-PAGE



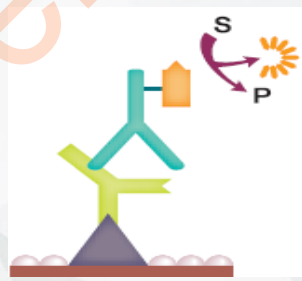
转膜



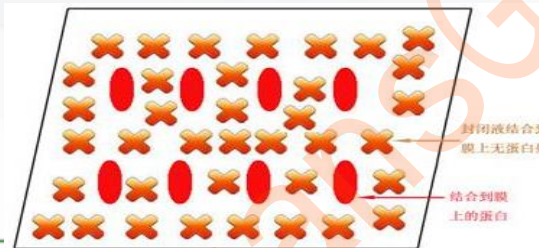
显色发光



抗体杂交



封闭





# 样品制备

## 总体原则

- 整个提取过程在低温下进行，保持蛋白处于溶解状态，防止蛋白变性、降解与修饰。
- 根据实验目的选取不同抽提液和抽提方法。
  - 有时需要去除体系中的核酸、无关蛋白等干扰成分
- 方法简便，耗时短，易于操作。
- 制备好的样品若不立即使用，需分装冻存于 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱，及防止储存过程中降解。

# 样品制备方法简介

## • 培养细胞的裂解

弃细胞培养基



1×PBS洗涤



加入细胞裂解液



冰上裂解细胞



离心收集上清

## • 组织细胞的裂解

冰上分离目的组织



液氮研磨



加入细胞裂解液



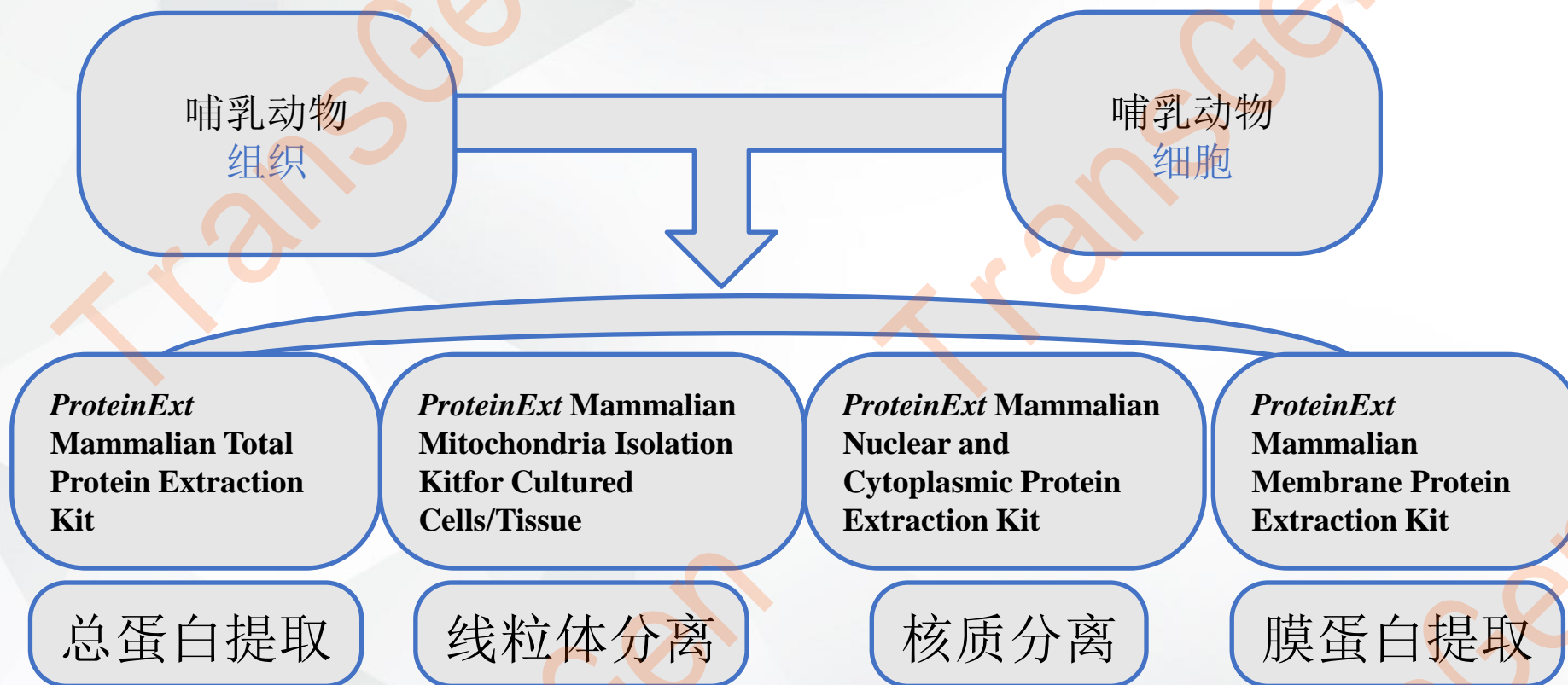
冰上裂解组织细胞



离心收集上清

# 细胞裂解液

组分	作用	举例
缓冲液	提供一定pH范围的缓冲体系，使蛋白保持稳定，增加溶解度。	Tris-HCl (pH 7.5) Hepes-KOH (pH 7.5)
盐离子	保持蛋白在适当的盐离子浓度下，避免聚集沉淀。	NaCl
螯合剂	螯合金属离子，防止蛋白提取物过于黏稠，溶解度下降。	EDTA EGTA
还原剂	防止蛋白发生氧化。	DTT $\beta$ -ME
去垢剂	溶解膜与脂膜，溶解与稳定蛋白质(特别是膜蛋白)。	阴离子型: SDS 阳离子型: 脱氧胆酸钠 非离子型: NP-40, Tween-20, TritonX-100
蛋白酶抑制剂	抑制蛋白酶活性，防止蛋白降解。	PMSF Aprotinin Leupeptin Pepstetine A
磷酸酶抑制剂	抑制磷酸酶活性，保持蛋白样品的磷酸化状态。	Sodium Fluoride Sodium Orthovanadate



简单、快速的试剂盒方式有利于最大限度保证提取蛋白样品的质量

# 蛋白定量

- 目的：保持不同处理样品间上样量一致，便于分析结果。
- 蛋白电泳上样量
  - 细胞样品一般10-20  $\mu\text{g}$
  - 组织样品一般20-40  $\mu\text{g}$

# 常用蛋白定量方法

定量方法	原理	灵敏度	干扰因素	标准曲线
Lowry法 (Folin-酚法)	在碱性条件下，蛋白质与铜作用生成复合物，后者将磷钼酸-磷钨酸还原成蓝色复合物。	较高 约5 $\mu$ g/ml	适用于脂类含量较高的样品，也能耐受相当浓度的去垢剂（如SDS）； 专一性差，干扰物质多，可受硫酸铵、Tris 缓冲液、甘氨酸、各种硫醇的干扰。	不是严格的直线
Bradford法 (考马斯亮蓝法)	在酸性条件下，考马斯亮蓝G-250和蛋白质结合产生特殊的蓝色。	高 约1~5 $\mu$ g/ml	易受强碱性缓冲液、TritonX-100、SDS等去垢剂的影响。	线性较差
BCA法	在碱性条件下，蛋白质中的肽键将Cu <sup>2+</sup> 还原成Cu <sup>+</sup> ，后者能够与BCA形成紫色化合物。	很高 0.5~20 $\mu$ g/ml	抗干扰能力强，不受较高浓度去垢剂的干扰； 易受某些还原剂（如DTT和 $\beta$ -ME）、铜离子螯合剂和高浓度缓冲液的影响。	线性关系较好



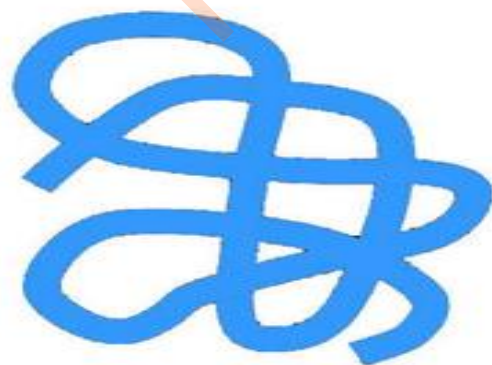
# SDS-PAGE电泳

- SDS-polyacrylamide gel electrophoresis  
SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳

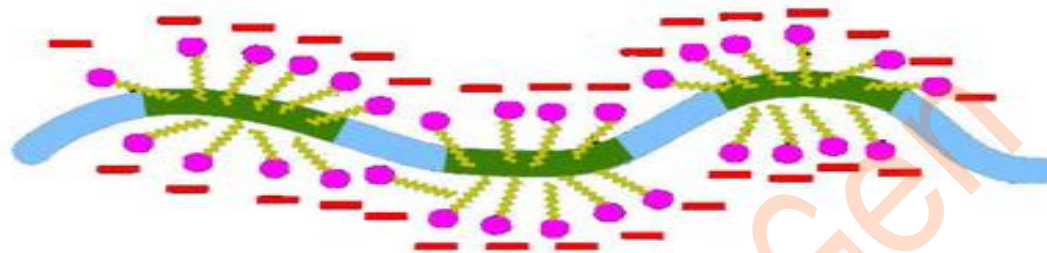


# SDS-PAGE原理

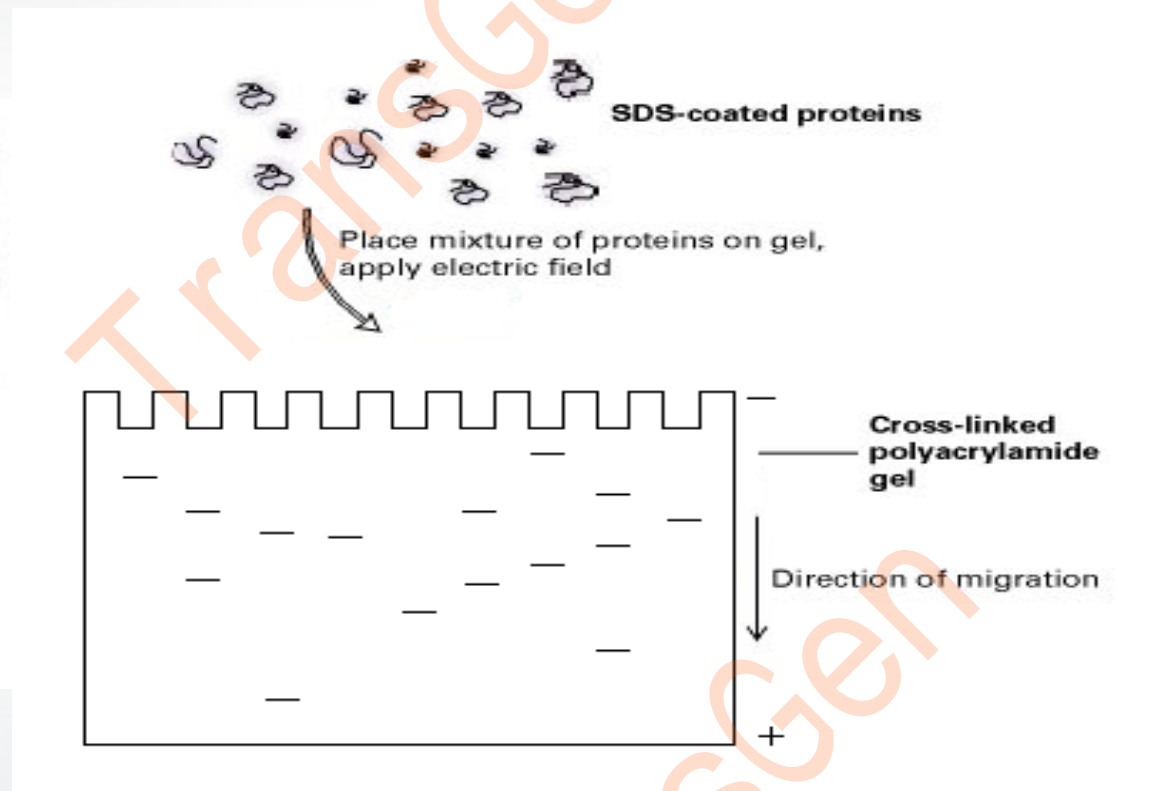
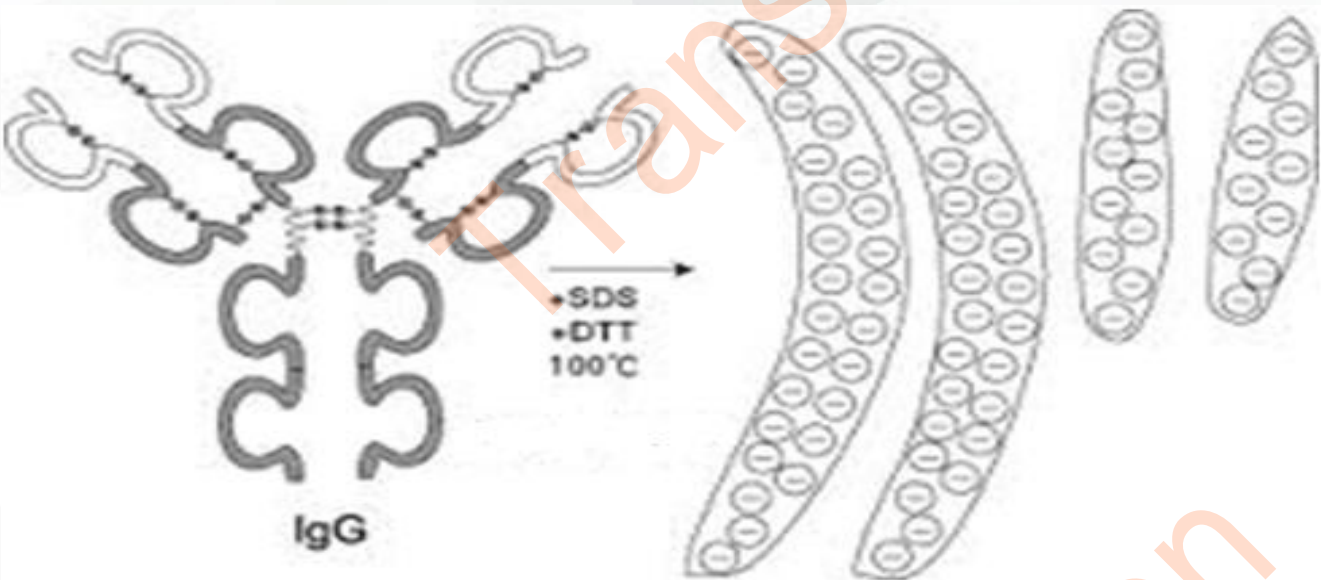
- SDS的作用



蛋白质



变形蛋白质成一线形分子并且均匀带上一层负电荷

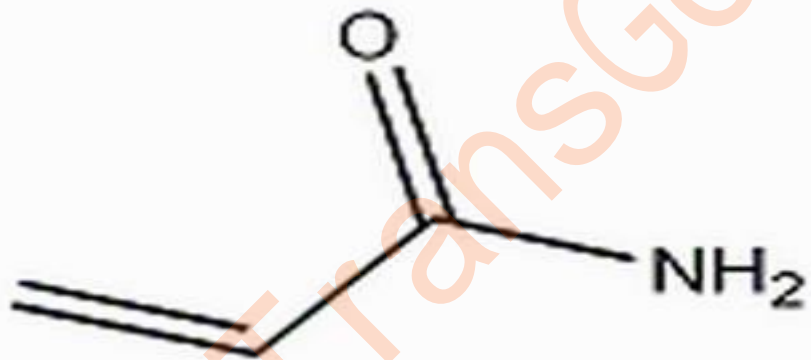


SDS-PAGE电泳使得蛋白混合物能按照各自的分子量大小分离开来。

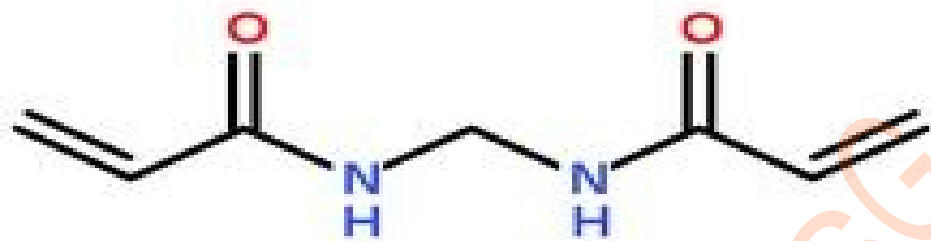
# 聚丙烯酰胺凝胶

组分	作用
丙烯酰胺	丙烯酰胺单体在自由基的引发下聚合为长链
N', N' -亚甲双丙烯酰胺	使长链交联起来形成三维网状结构的凝胶
过硫酸铵 (AP)	提供可以引发丙烯酰胺和双丙烯酰胺聚合的自由基
TEMED	通过催化过硫酸铵形成自由基而加速丙烯酰胺和双丙烯酰胺的聚合
Buffer (Tris-Glycine)	提供稳定的pH条件

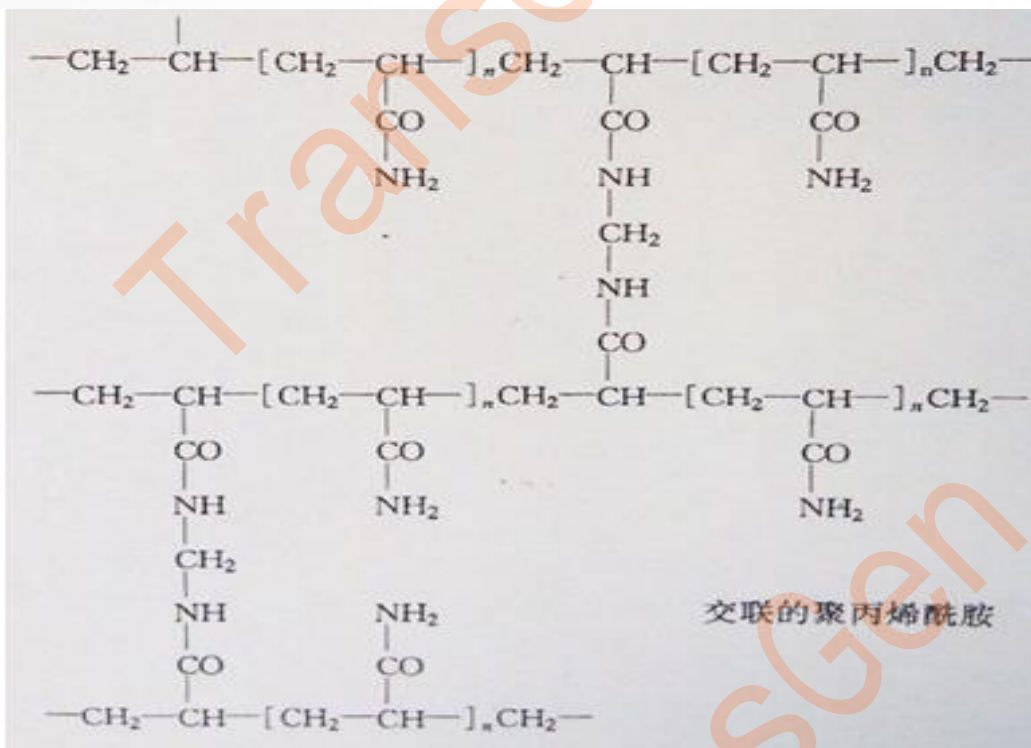
- 凝胶的多孔性取决于链的长度以及聚合反应过程交联的程度。
- 聚丙烯酰胺凝胶具有一定的机械强度和透明度，良好的电泳介质，用这种凝胶作为支持物的电泳，就称为聚丙烯酰胺凝胶电泳。



丙烯酰胺



N',N'-亚甲双丙烯酰胺



# SDS-PAGE凝胶的有效分离范围

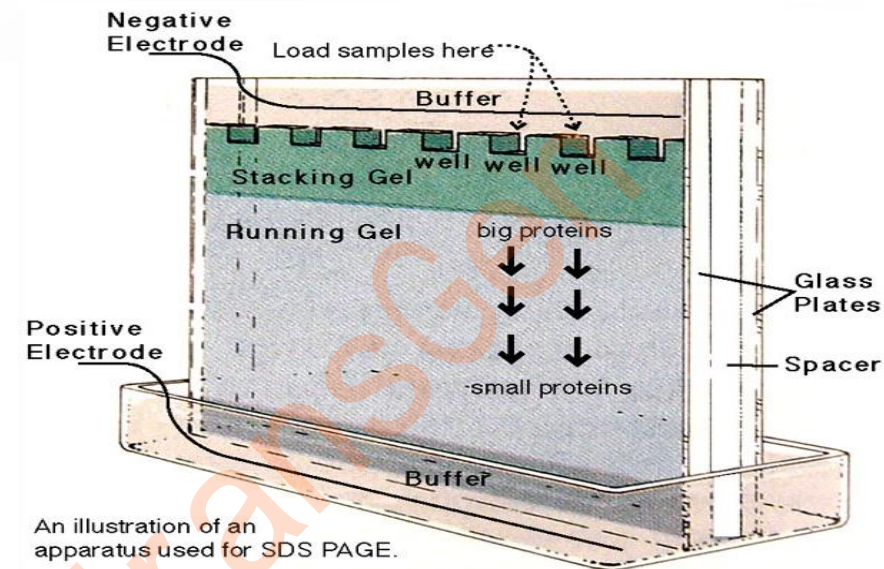
丙烯酰胺浓度 / %	线性分离范围 / kDa
15	10 ~ 43
12	12 ~ 60
10	20 ~ 80
7.5	36 ~ 94
5.0	57 ~ 212

注：丙烯酰胺:双丙烯酰胺的分子比是29:1。

# 连续电泳和不连续电泳

- PAGE根据是否具有浓缩效应，分为连续电泳和不连续电泳两类。
- 目前最常用的是不连续电泳。

	连续电泳	不连续电泳
缓冲液 pH 值	连续	不连续
凝胶浓度	连续	不连续
电位梯度	连续	不连续
迁移运动	电荷效应 分子筛效应	电荷效应 分子筛效应 <b>浓缩效应</b>
分辨率	低	<b>高</b>





# 膜选择的依据

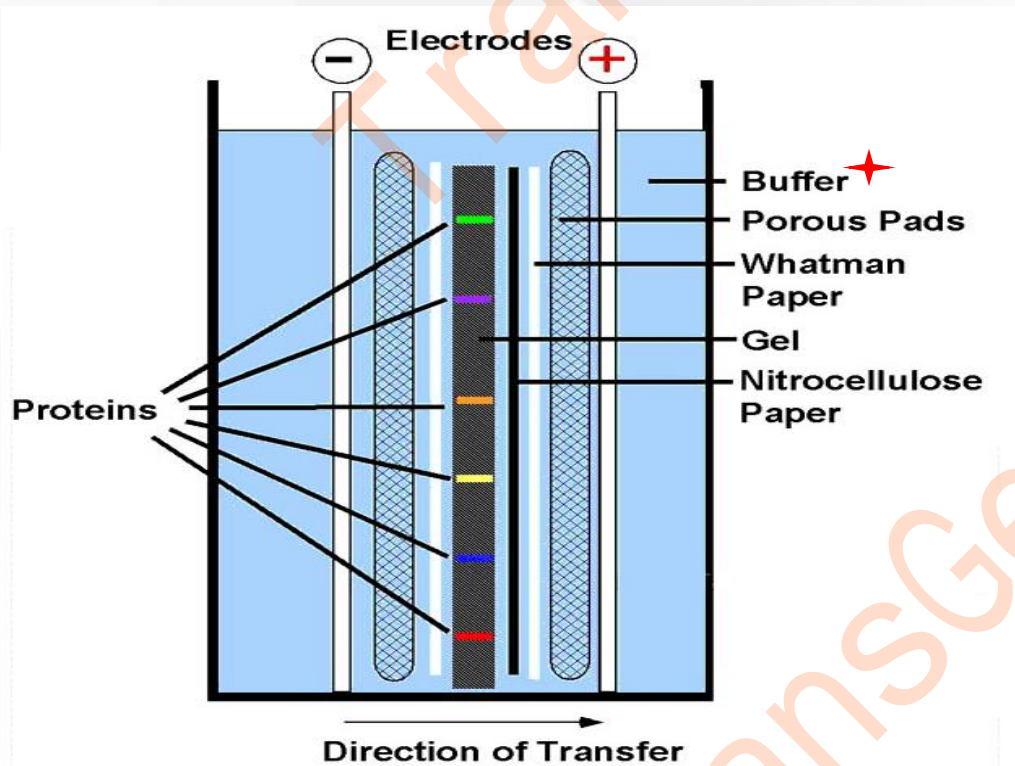
- 膜与目的蛋白分子的结合能力（单位面积的膜能结合蛋白的载量）
- 膜的孔径（可拦截蛋白的大小）
  - 分子量大于20 kDa—— 0.45  $\mu\text{m}$
  - 分子量小于20 kDa—— 0.2  $\mu\text{m}$
  - 分子量小于7 kDa—— 0.1  $\mu\text{m}$
- 是否适合用于所选的显色方法，信噪比高
- 根据不同的实验目的来选择

# 两种主要膜的对比

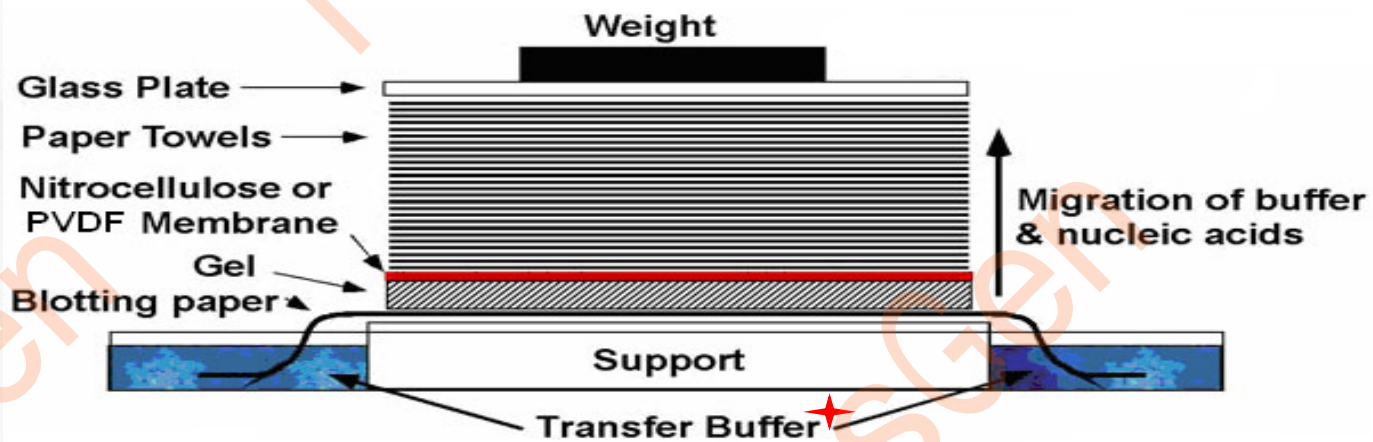
	NC膜	PVDF膜
灵敏度和分辨率	高	高
背景	低	低
结合能力	80 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	100 ~ 300 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$
结合强度	低	高
材料质地	纯的NC膜比较脆	机械强度高
化学兼容性	低	高
是否需要活化	不需要	需要无水甲醇活化
适用范围	化学发光 荧光检测 常规染色	化学发光 常规染色 考马斯亮蓝染色 蛋白质测序 糖蛋白检测 二次免疫检测

# 转膜的方法

## • 湿法



## • 半干法



# 转膜注意事项

- 根据蛋白分子量选择转膜方法

一般的蛋白，两种方法都可以得到满意的效果；

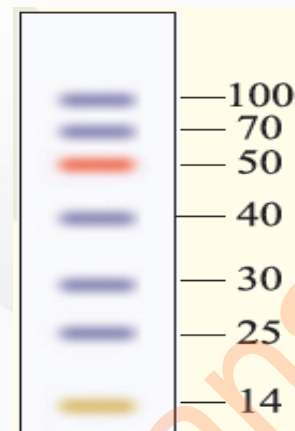
小分子量蛋白，用半干法转膜效果好；

大分子量蛋白（如100 kDa以上），建议用湿法转膜。

- 转膜效果的判断

观察预染Marker是否全部转到膜上；

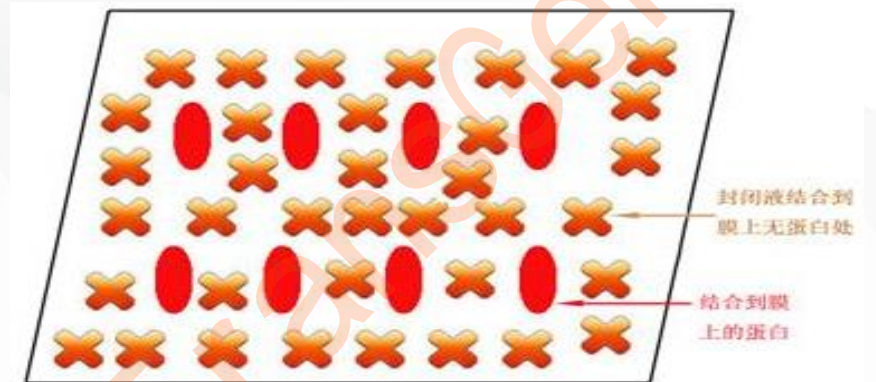
丽春红S（Ponceau S）染色 ——可逆。





# 封闭

- 目的：将膜上未结合蛋白的区域（也就是潜在的抗体非特异性结合位点）封闭，以避免产生非特异性背景。
- 封闭剂：5%脱脂奶粉或BSA
- 特殊情况不能选择脱脂奶粉：
  - 不能与生物素化或伴刀豆蛋白标记的抗体一起使用；
  - 不能用于磷酸化抗体对蛋白磷酸化的检测；
  - 不能用于碱性磷酸酶（AP）显色方法。



- 室温或者 **37°C** 缓慢摇荡 **1~2 h**，特殊情况也可 **4°C** 过夜。根据结果情况调整封闭试剂的浓度和类型。比如有时 BSA 比脱脂奶粉更有利于降低非特异性背景，而有些抗体则在脱脂奶粉封闭的情况下才能得到清晰的背景。
- 如果采用碱性磷酸酶检测系统，封闭剂最好用6%酪蛋白+1%聚乙烯吡咯烷酮+10 mmol/L EDTA磷酸缓冲盐加热65 °C 1小时确保碱性磷酸酶失活（可以加0.05%叠氮化钠，新鲜最好）。
- 经济的脱脂奶配方和AP兼容得不太好，如果选用AP作为显色方法，封闭时就要选择Tris缓冲体系，不要用PBS，因为PBS干扰AP。



# 抗体种类

- 一抗：第一抗体，能和非抗体性抗原特异性结合的蛋白，包括单克隆抗体和多克隆抗体。
- 二抗：第二抗体，能和抗体结合，即抗体的抗体，其主要作用是检测抗体的存在，放大一抗的信号。
- 一般二抗都会偶联可以检测的标记（如荧光、放射性、化学发光或显色基团），用来检测一抗。
- 如果一抗本身偶联有这些标记，则不需要二抗，即所谓的直接WB。

# 一抗的选择

## • 单克隆抗体 & 多克隆抗体

抗体类别	单克隆抗体	多克隆抗体
抗原类别	多肽 / 蛋白	多肽 / 蛋白
特异性	高	较低
批次间是否一致	完全一致	不能保证
最适应用范围	WB / IP / ELISA / IF / ICC / IHC / FCM	WB / IP / ELISA

## • 关于一抗的宿主物种

- 产生一抗的物种尽量不要与待检样品的物种一样，以免二抗与待检样品中的内源性免疫球蛋白产生交叉反应。例如：尽量不要用鼠源一抗检测大鼠或小鼠来源的样本。
- 如果用偶联一抗（直接法）进行检测，则无需考虑以上因素。

# 特异性抗体、标签抗体和内参抗体

- 特异性抗体

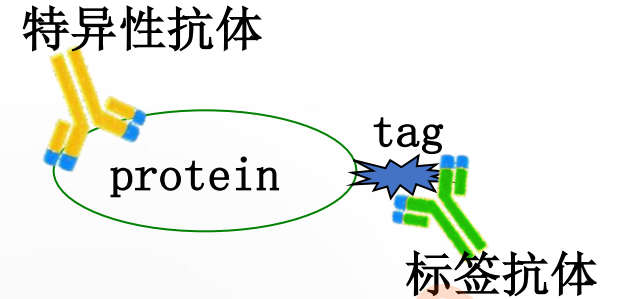
根据研究目的蛋白来选择，在于其特异性。

- 标签抗体

选择标签抗体，在于其通用性。

- 内参抗体

选择内参抗体，便于校正系统误差，准确判定待测蛋白表达水平的差异，同时可监测整个WB过程的准确性。



# 选择合适的内参

- 根据目的蛋白种属来源选择
  - 哺乳动物: GAPDH,  $\beta$ -actin,  $\beta$ -tubulin
  - 植物: Plant actin、Rubisco
- 根据目的蛋白分子量大小选择
  - 一般同内参相差5 kDa
  - 当两者相差很大时, 可以剪膜
  - 当两者相差很小时, 可以分别检测--应尽量避免
- 根据目的蛋白的定位选择
  - 核定位蛋白: Lamin B, TBP, Histone H3, PCNA
  - 膜定位蛋白: Na, K ATPase
  - 线粒体定位蛋白: VDAC1, COX IV
  - 胞质定位蛋白: GAPDH,  $\beta$ -actin,  $\beta$ -tubulin (同样适用于全细胞样品检测)
- 根据内参的丰度、异构体以及具体实验目的选择
  - $\beta$ -actin在肌肉组织中含量很少
  - 所谓的组织特异性有可能是不同公司所用抗原不同造成的:  $\beta$ -actin有N-和C-抗原的区别
  - 凋亡检测时, 不适宜选择Lamin B、TBP等作为内参。

# 选择正确的二抗

- 根据一抗的种属来源选择二抗

比如：一抗来自鼠源（如：anti-V5 mouse monoclonal antibody），二抗就要用抗鼠二抗（如：Goat anti-mouse IgG (H+L), HRP conjugated）。

## • 根据一抗的类型选择二抗

根据单体数量和重链类型，将抗体分别为IgA, IgD, IgE, IgG和IgM物种同型或类。  
其中又可分为几个亚类：IgA1-2, IgG1a, 2a, 2b, 3, IgM1-2。

一抗类型	二抗
小鼠IgG	抗小鼠IgG抗体
小鼠IgG1	抗小鼠IgG1抗体 抗小鼠IgG抗体
小鼠IgM	抗小鼠IgM抗体

- 二抗的偶联标记

- 酶标二抗（辣根过氧化物酶HRP，碱性磷酸酶AP）—— WB, ELISA, IHC
- 荧光二抗
- 生物素标记二抗



# 显色发光

		HRP	AP
底物	发光底物	Luminol	AMPPD
	显色底物	DAB, TMB, 4-CN	NBT, BCIP, NBT/BCIP
特异性		高	低
灵敏度	化学发光	高	高
	化学显色	较高	高
背景		低	较高
动力学特性		快	慢
限制因素		叠氮钠抑制HRP活性	内源碱性磷酸酶活性干扰检测
价格		便宜	昂贵

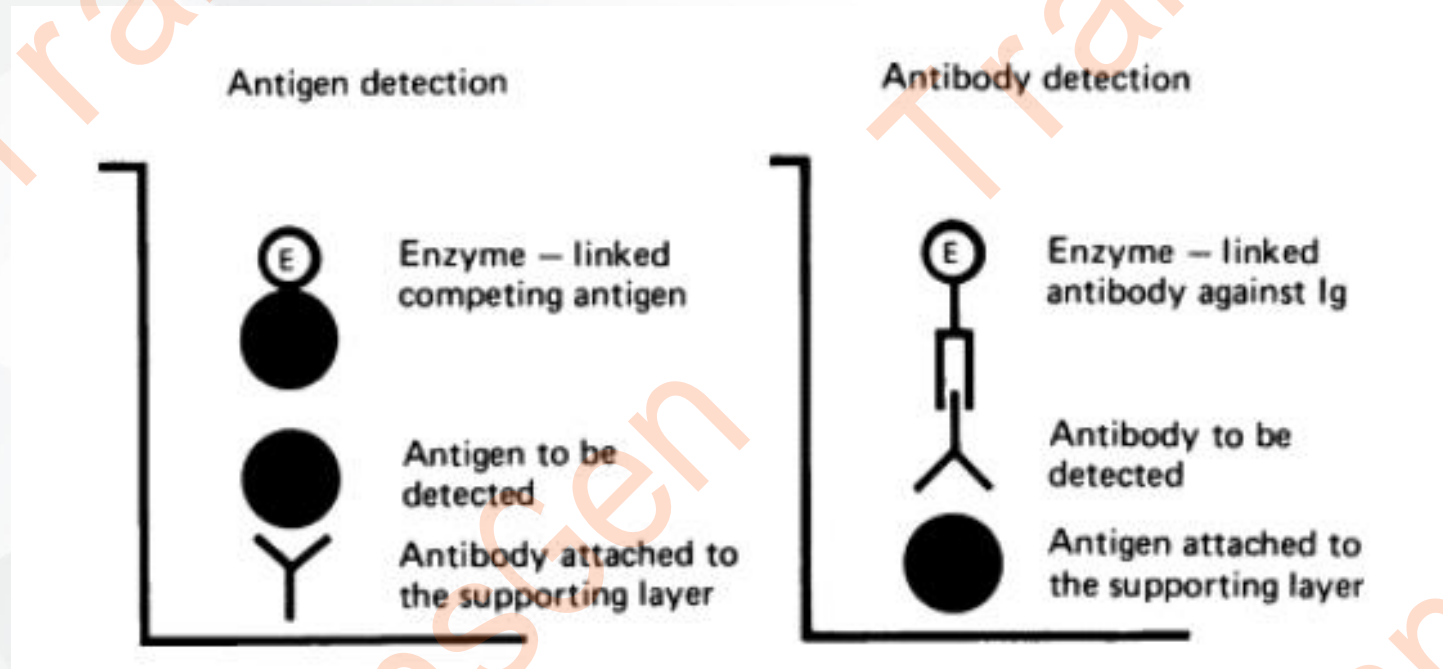
背景简介

Western Blot检测流程详解

Western Blot诊断应用

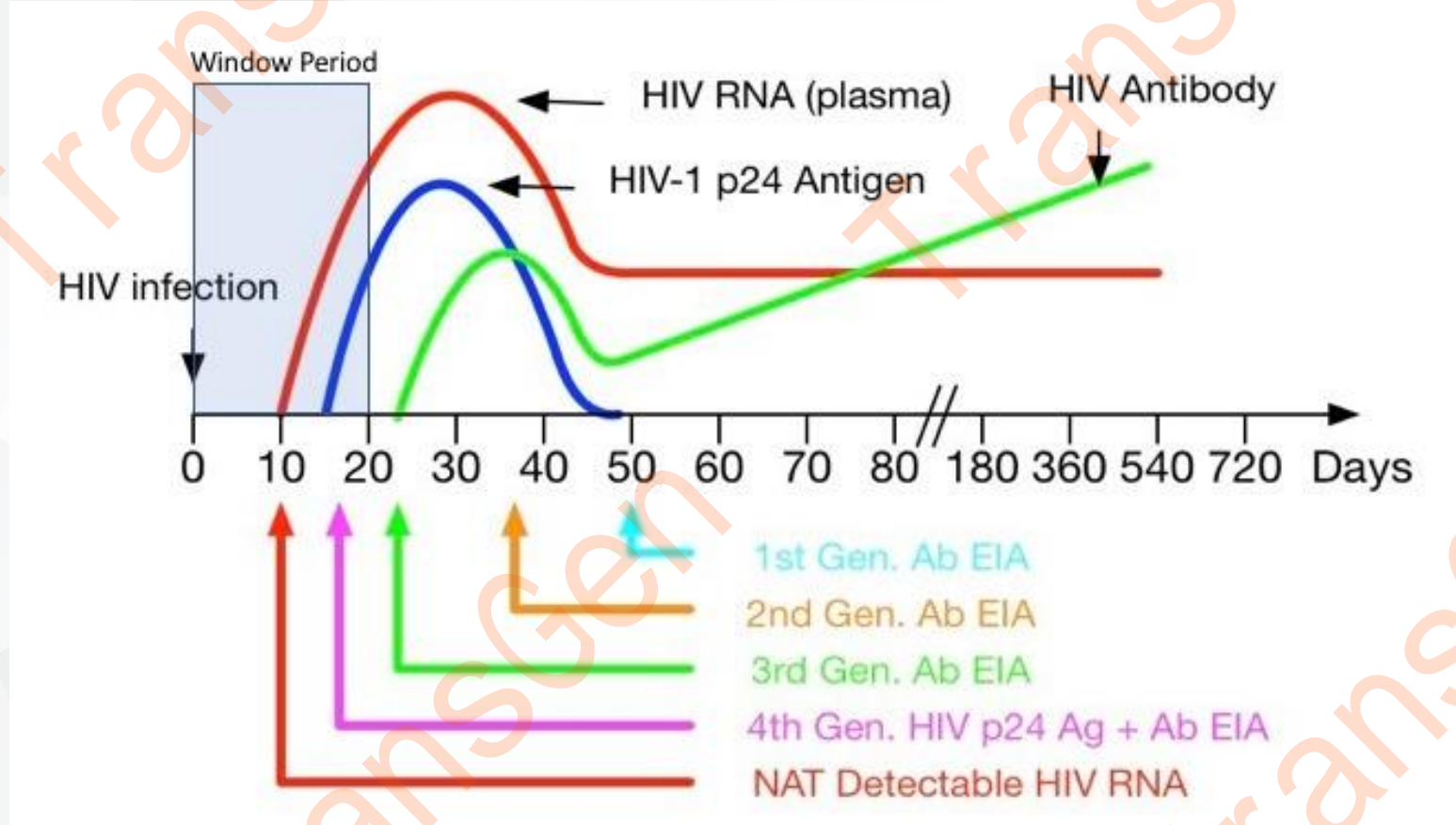
Western Blot检测现状

## 抗体检测和抗原检测



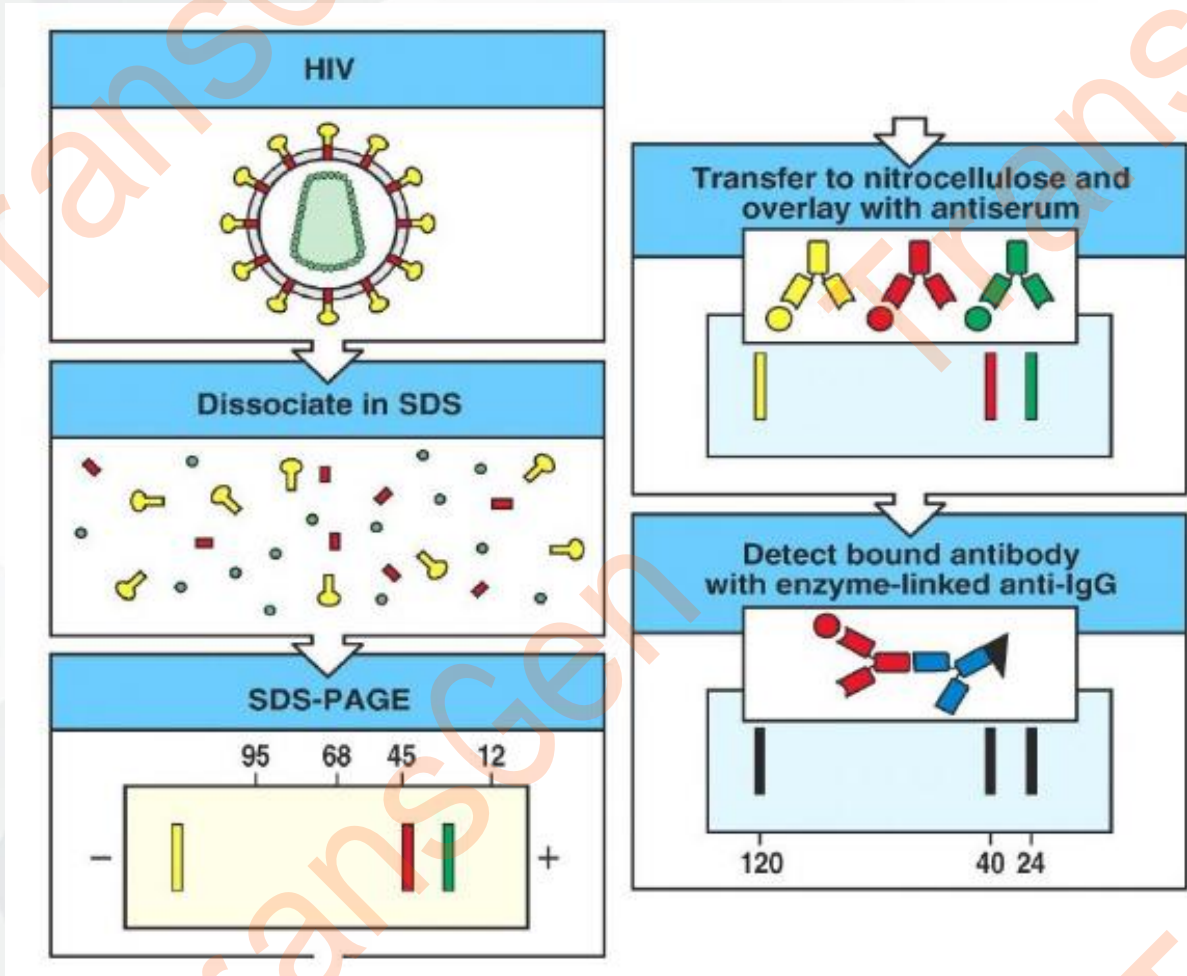
Ashley R L . Laboratory techniques in the diagnosis of herpes simplex infection.[J]. Genitourin Med, 1993, 64(3):174.

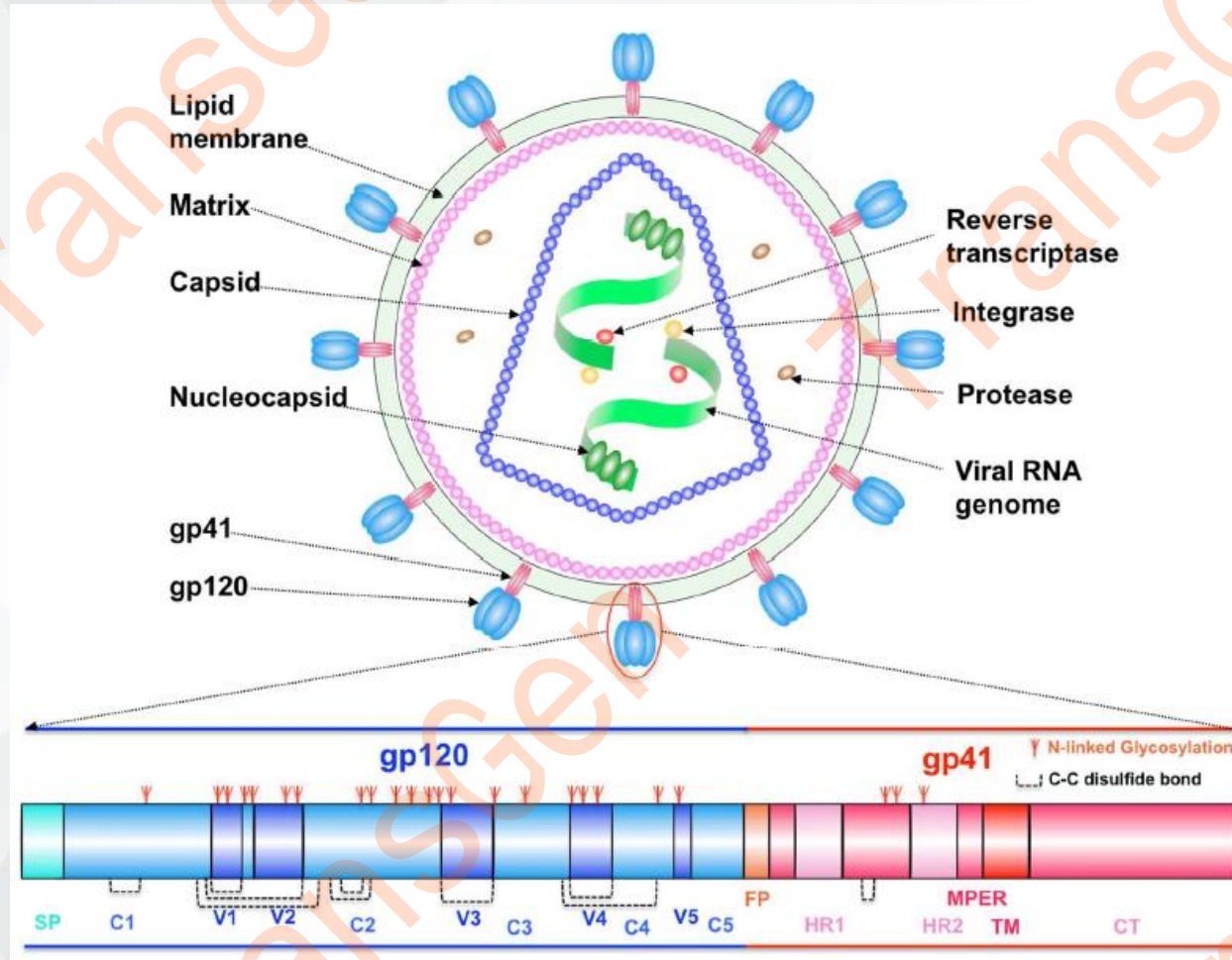
## 抗体检测和抗原检测



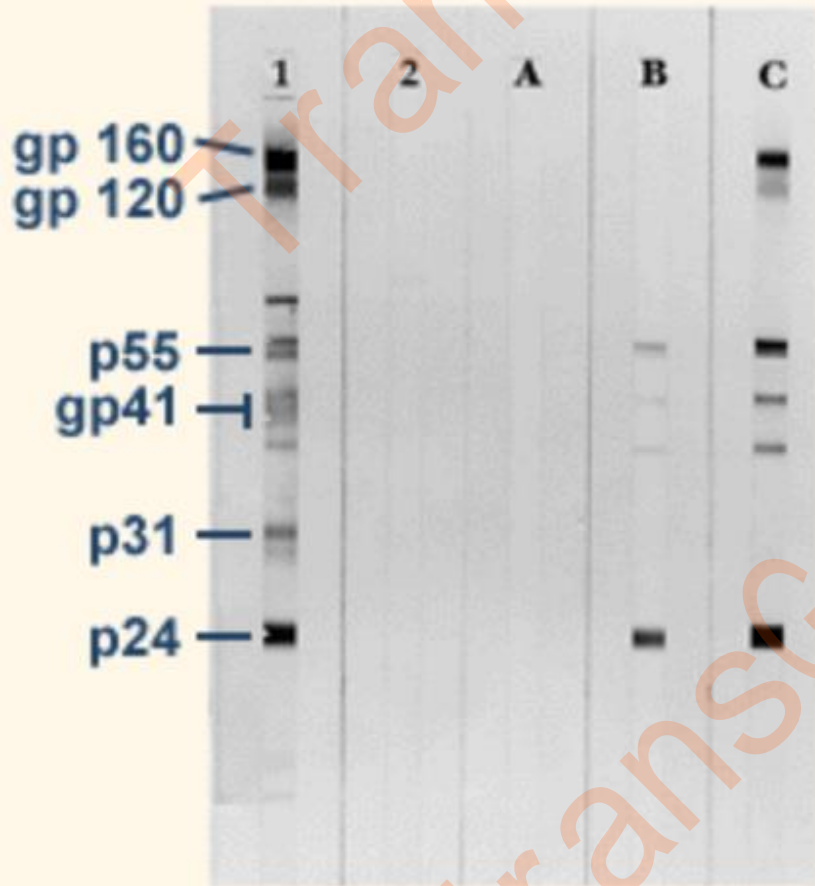
Laboratory Best Practice Blog: Best Practices for HIV-1/2 Screening:  
When to Test and What to Test

# 检测试剂盒的制备





Ding Y , Wu J , Zhou Y Y , et al. Gold Nanoparticle-Based Drug Delivery Platform for Antineoplastic Chemotherapy[J]. Current Drug Metabolism, 2014, 15(6):-



## Band pattern Interpretation

1. Lane 1, HIV+ serum (positive control)
2. Lane 2, HIV- serum (negative control)
3. Lane A, Patient A
4. Lane B, Patient B
5. Lane C, Patient C

# 免疫胶体金技术

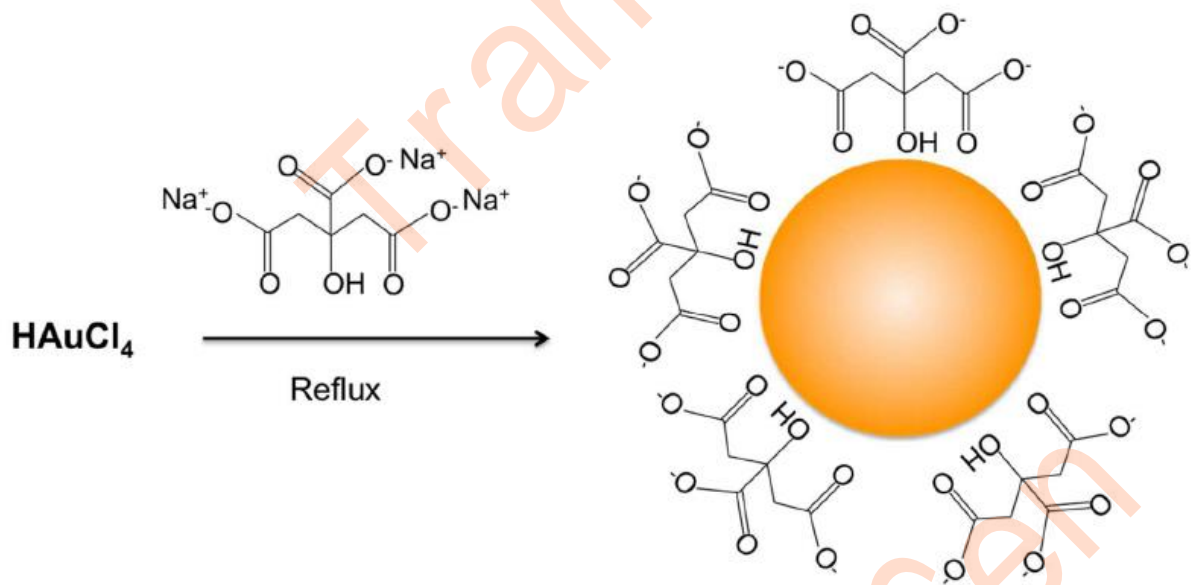
免疫胶体金技术(Immune colloidal gold technique) 是以胶体金作为示踪标志物应用于抗原抗体的一种新型的免疫标记技术。胶体金是一种特定大小的金颗粒，这种金颗粒由于静电作用，成为一种稳定的胶体状态，故而称为胶体金。

胶体金在弱碱环境下带负电荷，可与蛋白质分子的正电荷基团形成牢固的结合，由于这种结合是静电结合，所以不影响蛋白质的生物特性。

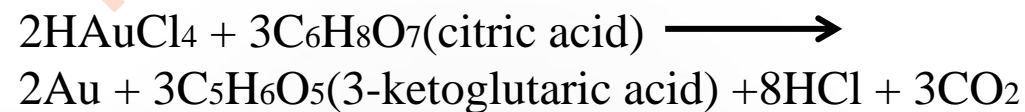
# 免疫胶体金技术

- (1) 使用方便快捷，便于基层使用和现场使用，所有反应能在15分钟内完成；
- (2) 成本低，不需要特殊的仪器设备；
- (3) 应用范围广，可适应多种检测条件；
- (4) 可以进行多项检测，若阳性样本比较难获得，多项检测可以节省样品，降低成本；
- (5) 标记物稳定，标记样品在4℃贮存两年年以上，无信号衰减现象；
- (6) 胶体金本身为红色，不需要加入发色试剂。

## 胶体金的合成

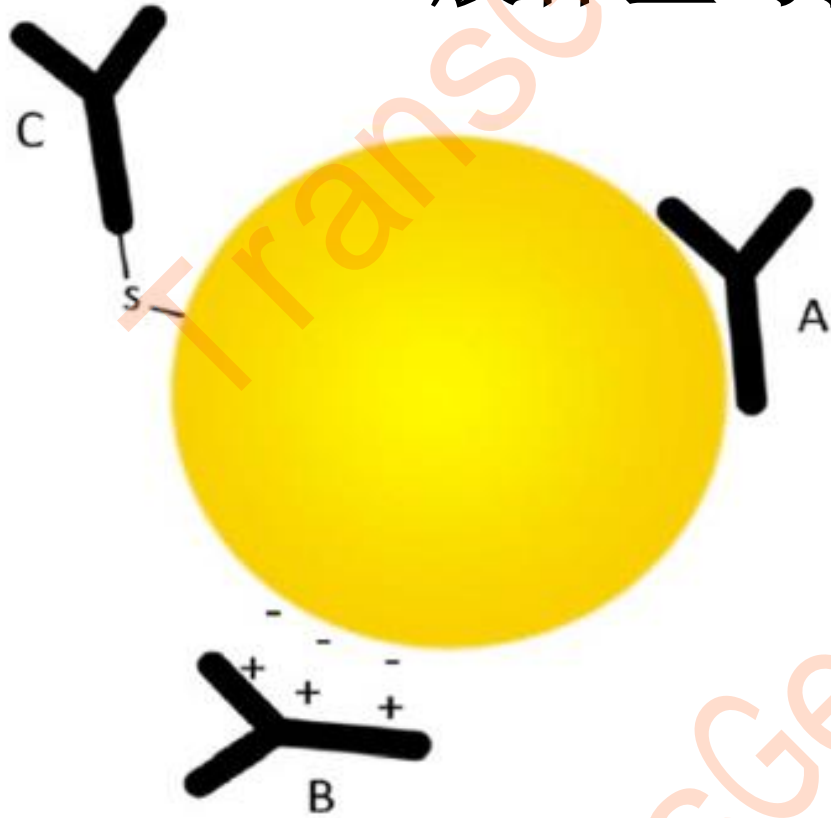


The synthesis reaction can be summarized as:



Ding Y , Wu J , Zhou Y Y , et al. Gold Nanoparticle-Based Drug Delivery Platform for Antineoplastic Chemotherapy[J]. Current Drug Metabolism, 2014, 15(6):-.

## 胶体金与抗体的耦连方式



抗体与金纳米颗粒表面之间的疏水和离子相互作用。

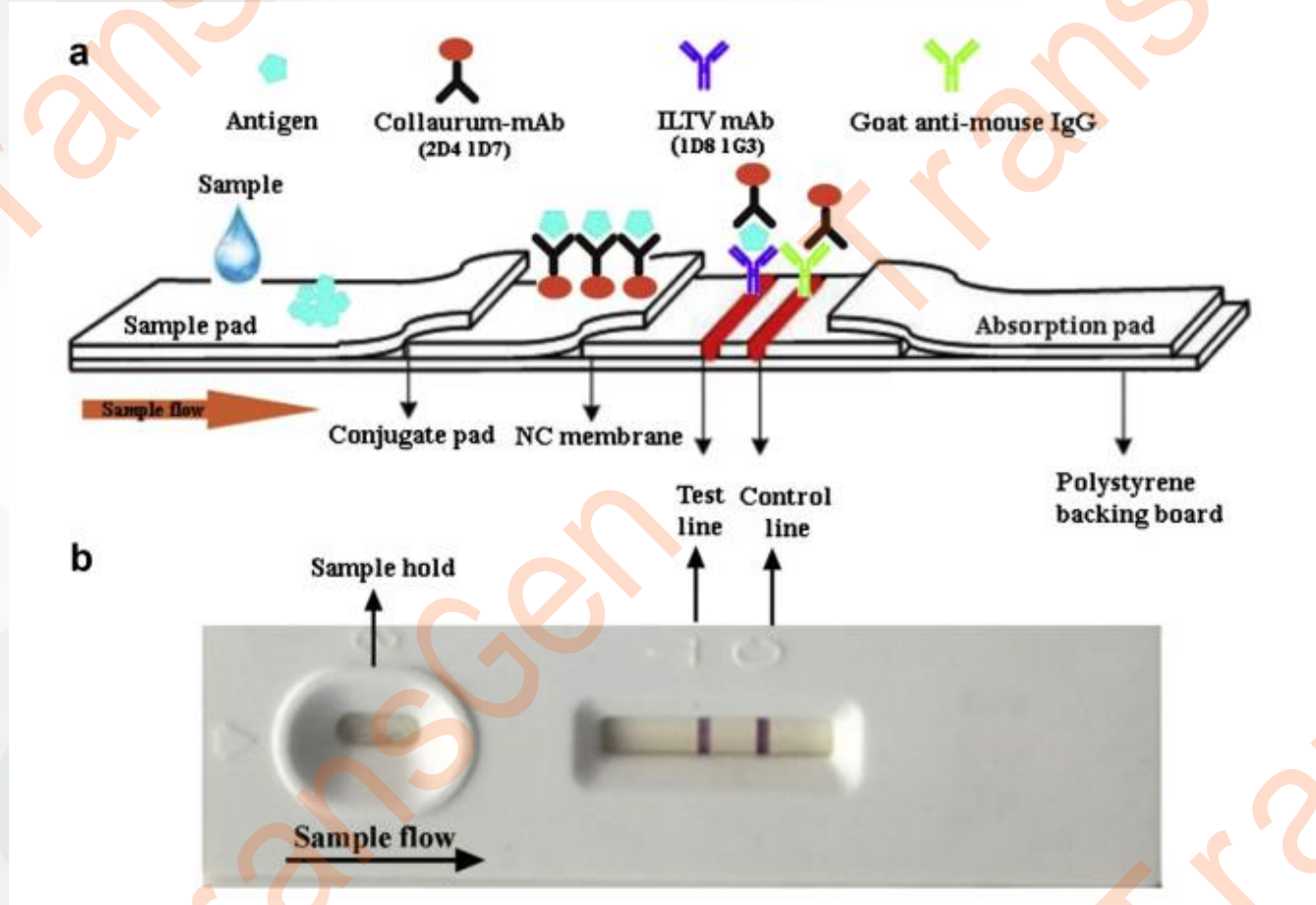
A 疏水相互作用；

B 离子相互作用；

C 由于固定结合而形成共价键。

Jazayeri M H , Amani H , Pourfatollah A A , et al. Various methods of gold nanoparticles (GNPs) conjugation to antibodies[J]. Sensing & Bio Sensing Research, 2016, 9(C):17-22.

# 胶体金检测试剂盒



背景简介

Western Blot检测流程详解

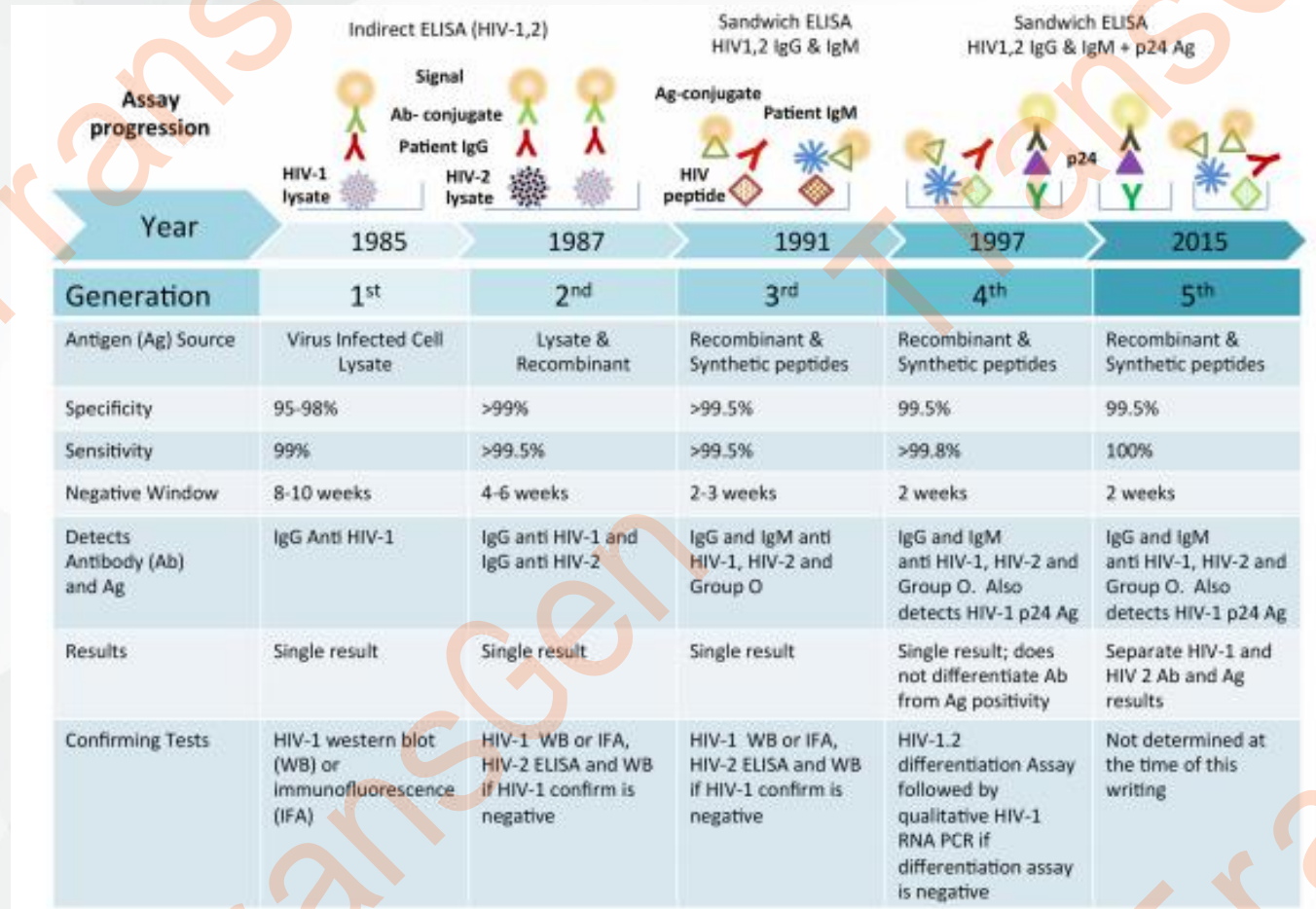
Western Blot诊断应用

Western Blot检测现状

# 免疫印迹法的检测使用情况

免疫印迹法已经成为实验室和临床诊断的有力工具，它是实验室工作人员用来辅助临床医生进行疾病诊断、治疗方案选择和疗效监测的众多方法之一。免疫印迹法经常被用来辅助诊断丙型肝炎、艾滋病、莱姆病和梅毒等感染性疾病，同时也包括一些自身免疫性疾病，如：副肿瘤性疾病和肌炎等

# 免疫印迹法在HIV检测中的发展



Thomas, S, Alexander. Human Immunodeficiency Virus Diagnostic Testing: 30 Years of Evolution.[J]. Clinical and vaccine immunology : CVI, 2016. [www.transgen.com.cn](http://www.transgen.com.cn)

# 免疫印迹法检测的劣势

- 操作比较繁琐，周期比较长；
- 操作易丢失蛋白，检测灵敏度不够；
- 需要相对应的抗体，成本较高；
- 存在假阳性。



谢谢!

[www.transgen.com.cn](http://www.transgen.com.cn)

北京全式金生物技术有限公司

