

Western Blot 蛋白免疫印迹

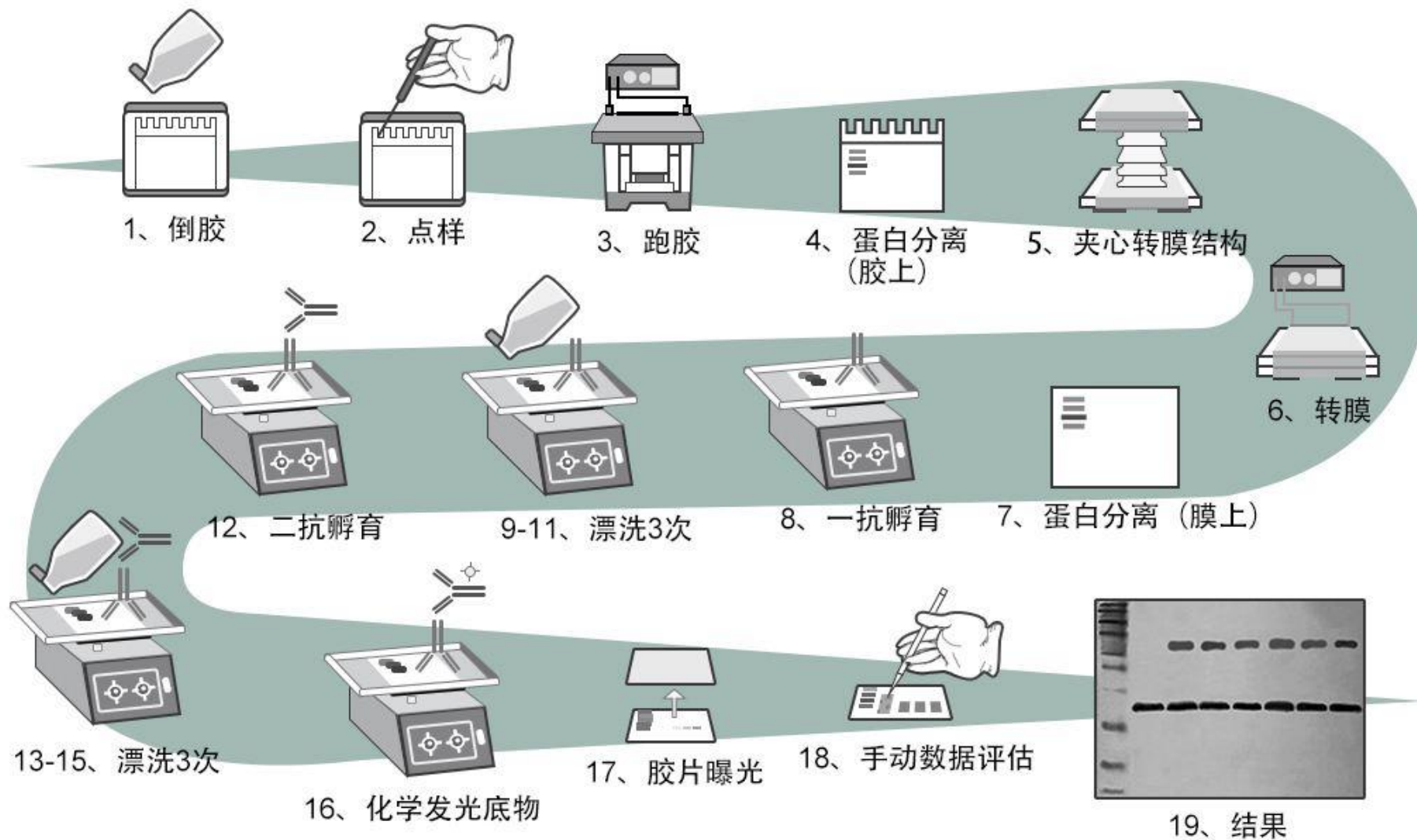
如何做好Western?

2021.11.29 复旦

e-BLOT

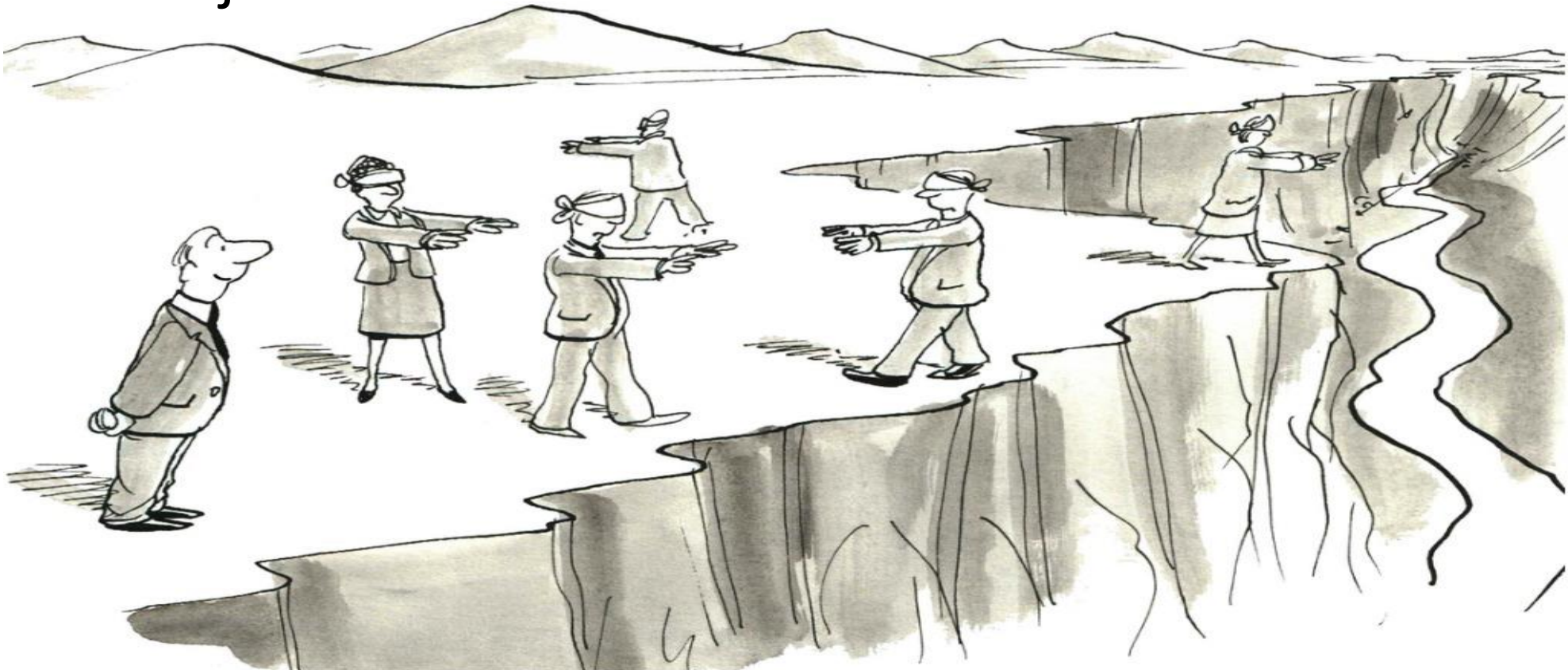
Western Blot

e-BLOT

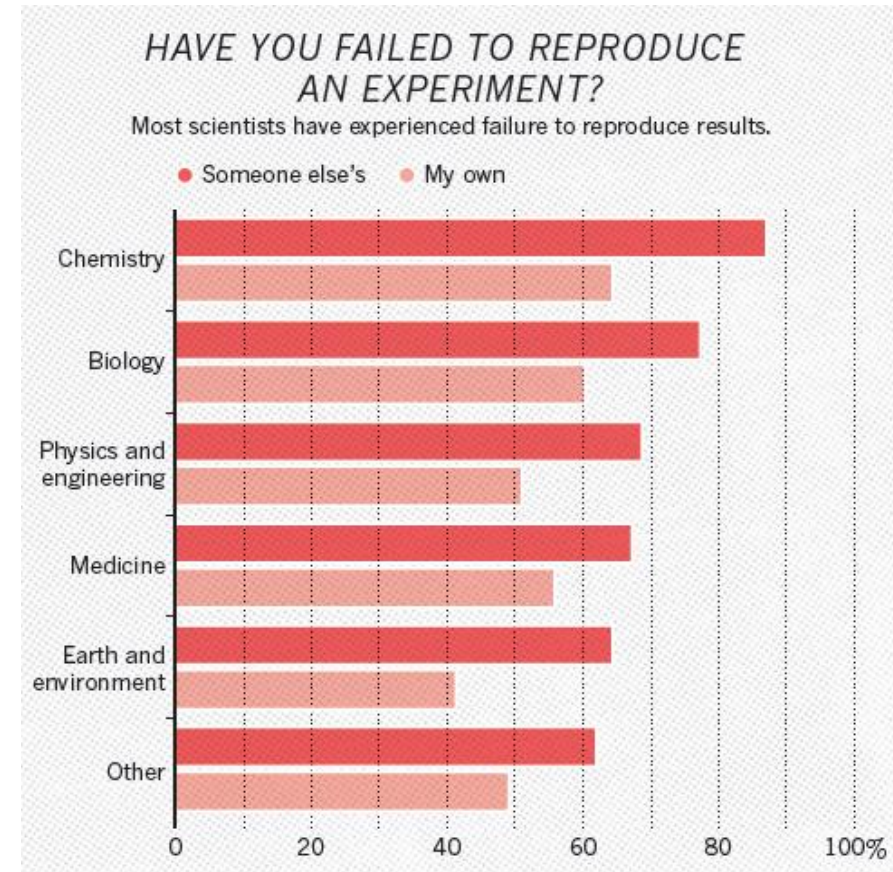
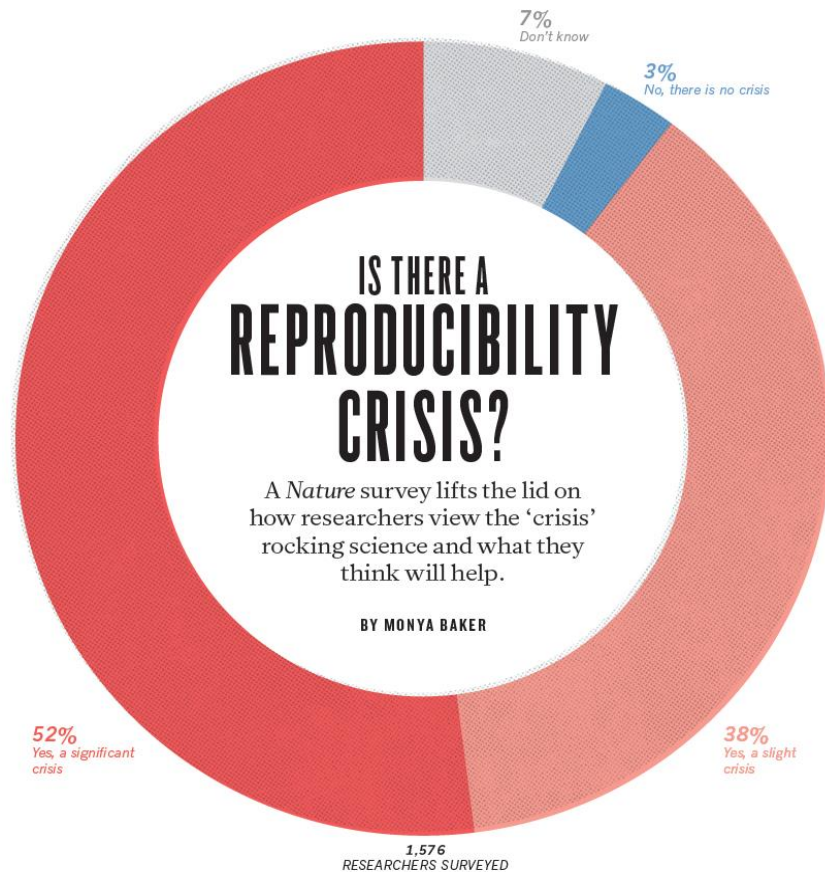


你的Western blot实验是如何开始的?

“I’m just following the protocol the way I was shown when I joined the lab...”



你的Western blot实验结果可以重复吗？



你认为做好WB实验操作技术重要还是选择重要？

e-BLOT



整天做Western blot实验, 是否被如下问题所困扰?

- ✓ WB蛋白表达的结果与基因表达的结果不一致, 却找不到原因;
- ✓ 参考高分文献做WB实验, 但是做不出文献里的结果;
- ✓ 蛋白表达量太低, 拍不出来或者拍出来图片不能用;
- ✓ 蛋白表达量相差非常大, 想要低信号出来, 高信号就过曝了;
- ✓ 曝光条件需要反复优化, 每次都要花费很长得时间来压片或者仪器曝光;
- ✓ WB结果总是有各种各样的问题, 不知道实验哪里出问题了;
- ✓ 等等.....



科研竞争日益加剧，容易做的都被做掉了，剩下的都是难做的实验了……

高丰度的被做掉了，剩下的尽是一些低丰度的蛋白；

表达差异小的被做掉了，剩下的尽是一些表达差异巨大的；

样品容易获取的被做掉了，剩下的尽是一些难获取的样品；

抗体成熟的被做掉了，剩下的尽是一些没有现成抗体的；

……

Western 实验步骤多，影响因素多，感觉结果不可控，忙活了一天半，都不知都结果会咋样？

如何选择正确的方法？

如何控制实验的每个环节？

让**Western** 变的可控

主要内容

Western Blot 简介

如何选择正确的Western 检测方法

Western Blot 流程操作及注意事项

Western Blot 常见问题及解决方案

上海易享特光电技术有限公司

SHANGHAI E-BLOT PHOTOELECTRICS TECHNOLOGY CO.,LTD.

01.

Western Blot 简介

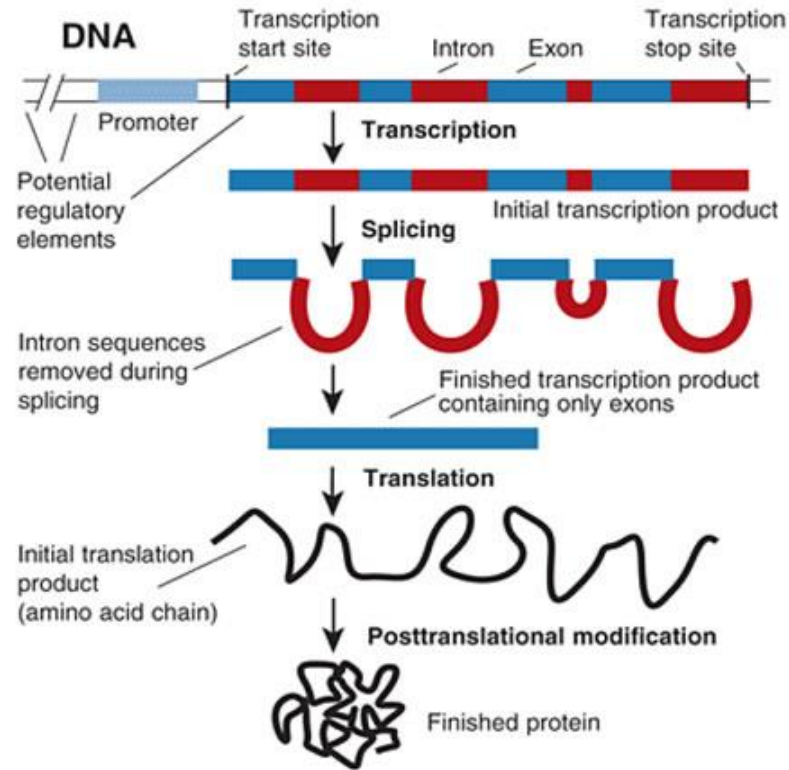
上海易享特光电技术有限公司

SHANGHAI E-BLOT PHOTOELECTRICS TECHNOLOGY CO.,LTD.

什么是western ?

Western blot是一个用于蛋白质分析的常规技术，在电场的作用下将电泳分离的蛋白从凝胶转移至一种固相支持物，然后利用**抗原-抗体的特异性反应**，从**蛋白混合物中**检测出目标蛋白，从而**定量或定性**的确定正常或实验条件下细胞或组织中目标蛋白的表达情况。

为什么要做Western?



DNA

转录

转录拼接成RNA

翻译成蛋白质

翻译后蛋白的
修饰（有功能的
蛋白）

真正对生物的机能、代谢、疾病等起作用的是有功能的蛋白

02.

如何选择正确的Western Blot检测方法

上海易亨特光电技术有限公司

SHANGHAI E-BLOT PHOTOELECTRICS TECHNOLOGY CO.,LTD.

Western Blotting数据的可信度问题



Source: “All Data are not created Equal” Editorial by Ushma S. Neill, The Journal of Clinical Investigation Volume 119:424, 2009

斯隆-凯瑟琳癌症中心主任**Ushma S. Neill**在担任 “临床调查研究杂志” 评审期间曾连续拒绝了四篇本已接受并准备发表的来稿后明确指出，所有提交的**western**数据的建立必须是平等的，其中包括：

1. 所采用的检测方法定量范围是否可靠？
2. 实验者如何确定化学发光的曝光时间？
3. 是否有内参？内参是否可靠？
4. 分析结果是否使用的是原始数据

Nature对western blot数据的要求

电泳胶和印迹

“For quantitative comparisons, appropriate reagents, controls and imaging methods with linear signal ranges should be used.”

“对于定量比较实验，应该使用适当的试剂、参比及线性范围内的成像方法。”

--- Nature



- 选择宽动态范围

的方法, 确认信号强度与所上样量之间的线性关系, 例如用胶片做化学发光方法的动态范围就很窄, 不建议使用

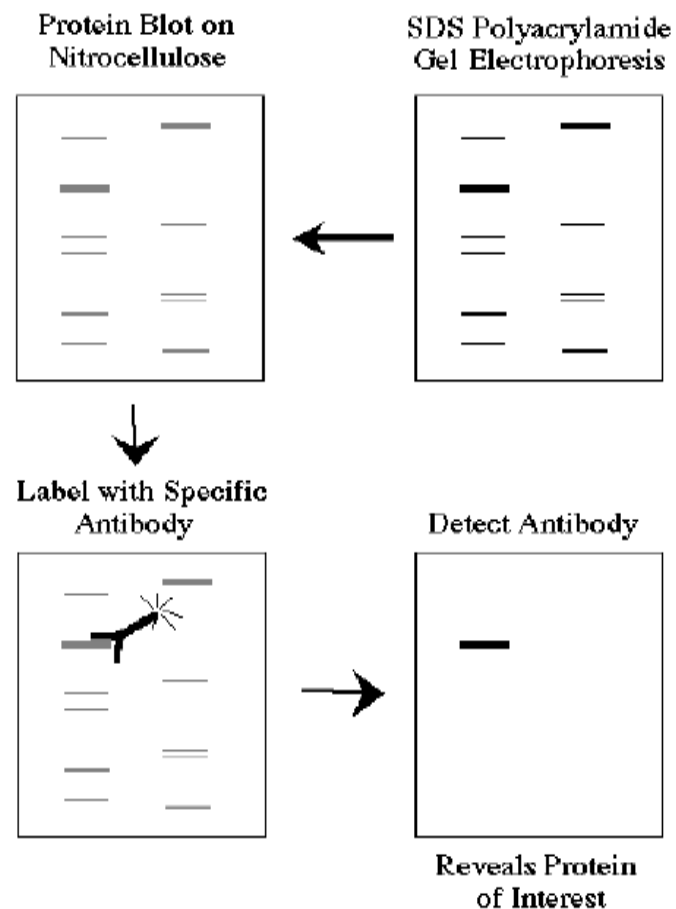


- 提交原始数据, 例如: JBC, PLOS 和 CELL 等杂志都要求要提供原始数据

Western 流程

e-BLOT

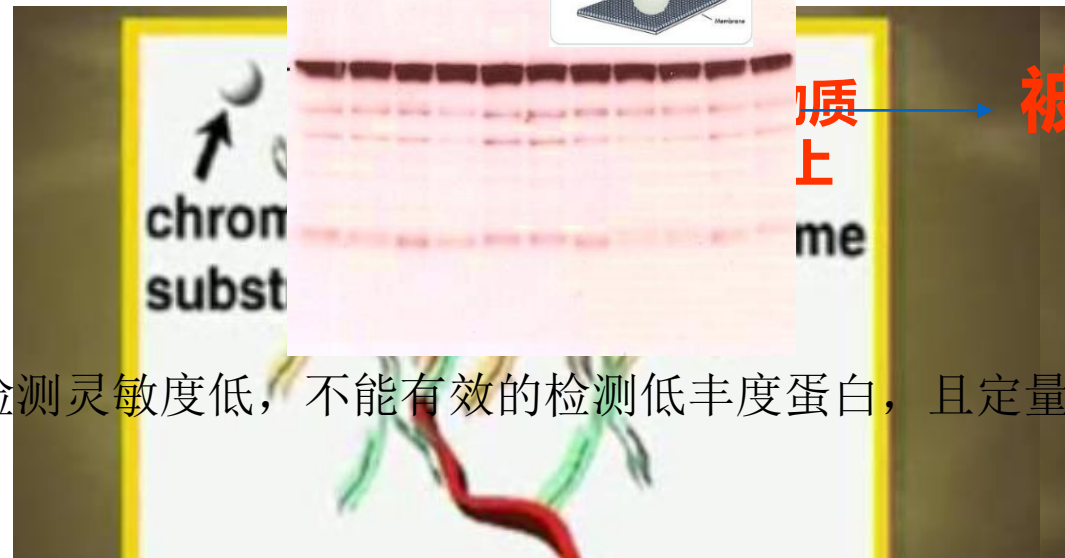
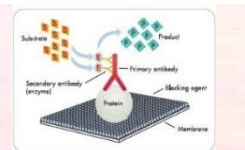
- 蛋白样品的制备
- SDS-PAGE
- 转膜
- 封闭
- 一抗杂交
- 二抗杂交
- 成像检测



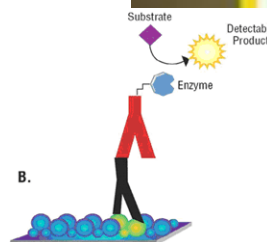
Western Blot Workflow-Detection

e-BLOT

DAB显色



DAB显色法检测灵敏度低，不能有效的检测低丰度蛋白，且定量范围只有1.5OD



更灵敏的检测方法：化学发光法

化学发光检测的优势

- 定量范围更广
- 高灵敏度

化学发光检测方法：

- 底片检测（传统的压片，显影，定影）
- 冷CCD摄像头检测

Chemiluminescence-Western Blot

e-BLOT



传统X光压片检测

- 接触式成像，无光损失，成像灵敏度极高
- 定量范围窄
- 非数字成像
- 无过度曝光提醒

Chemiluminescence-Western Blot

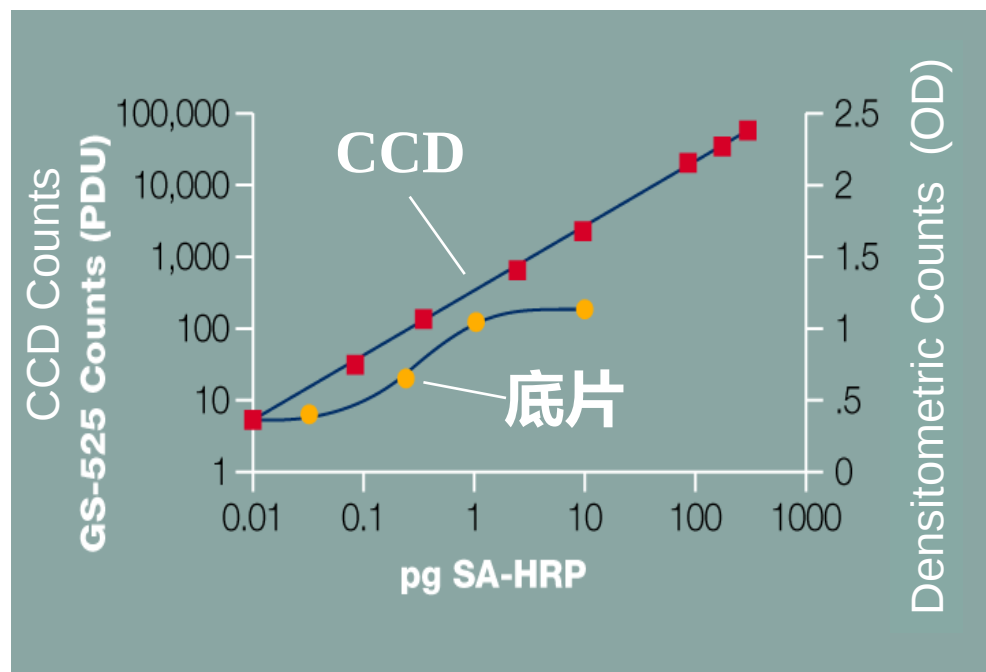


无需外在激发光源，依靠自身发光，一般要求高度制冷的冷CCD

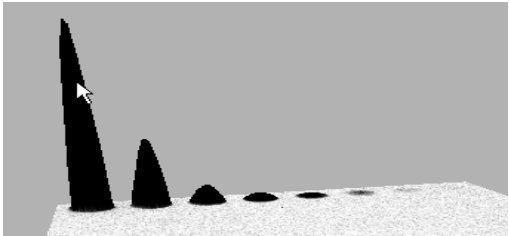
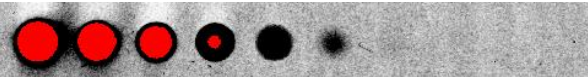
冷CCD技术在定量方面优于底片成像?

e-BLOT

- 冷CCD与光学强度具有真正的线性对应关系
- 底片的反应是非线性的



定量线性范围比较

成像方式	15s 曝光	3D显示
冷CCD 成像		
Film		

冷CCD成像技术的优势?

CCD具有更宽的动力学线性范围(理论上>4.0 个数量级, 实际在3.2个数量级左右)

- 底片的动力学线性范围低 (1.5 ~ 1.9 个数量级)
- CCD可进行更精确的浓度比较

CCD系统 可提示过饱和反应

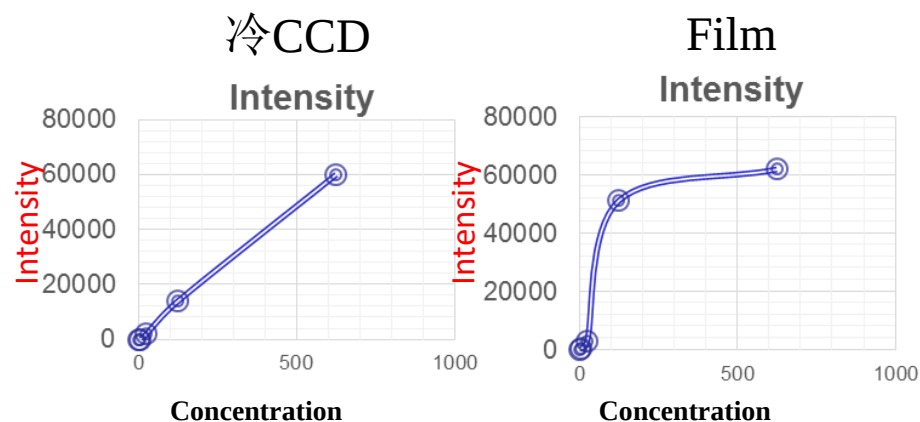
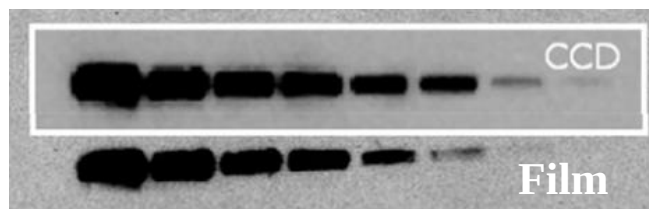
- 过饱和像素警示 (注意: 不是所有设备都有过曝提醒功能)
- 底片无法警示过饱和区域-----数据失真

CCD 系统无需任何消耗品

- 无需底片及冲洗试剂
- 无需冲洗设备及暗室

降低了输出成本 (热敏打印 vs. 底片)

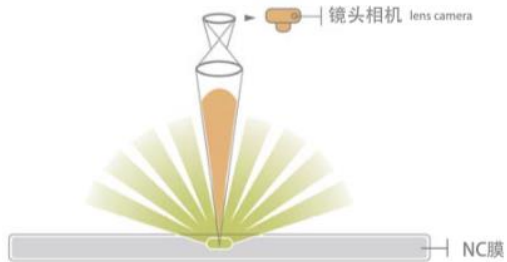
冷CCD成像与胶片法对比



与传统的压片法对比冷CCD成像系统在相同曝光时间内能得到更宽的定量范围和更高的灵敏度

冷CCD化学发光成像的局限

- 1, 样品距感光芯片距离长, 导致光信号损失90%以上, 灵敏度低
- 2, 像素点小, 定量范围窄, 易过曝
- 3, 镜头透镜组导致的图像几何畸变, 图像弥散



CCD照相成像 CCD camera imaging

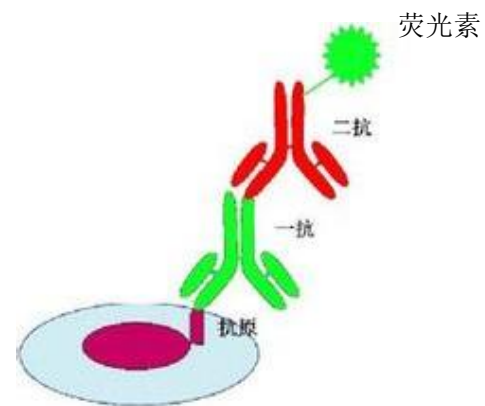
光信号损失99%以上, 低灵敏。

CCD camera losses more than 99% of light signals and significantly reduces the sensitivity.

冷CCD化学发光成像的局限

- 由于光损失比较大，极低丰度的蛋白，无法检测到
- 光学畸变，导致条带有轻微弥散，分子量大小非常接近的蛋白（磷酸化蛋白）无法清晰区分
- 定量范围不够，表达变化差异大的样品不能准确定量，低丰度蛋白检测不到，高丰度蛋白容易过曝

荧光成像方法的优势和劣势

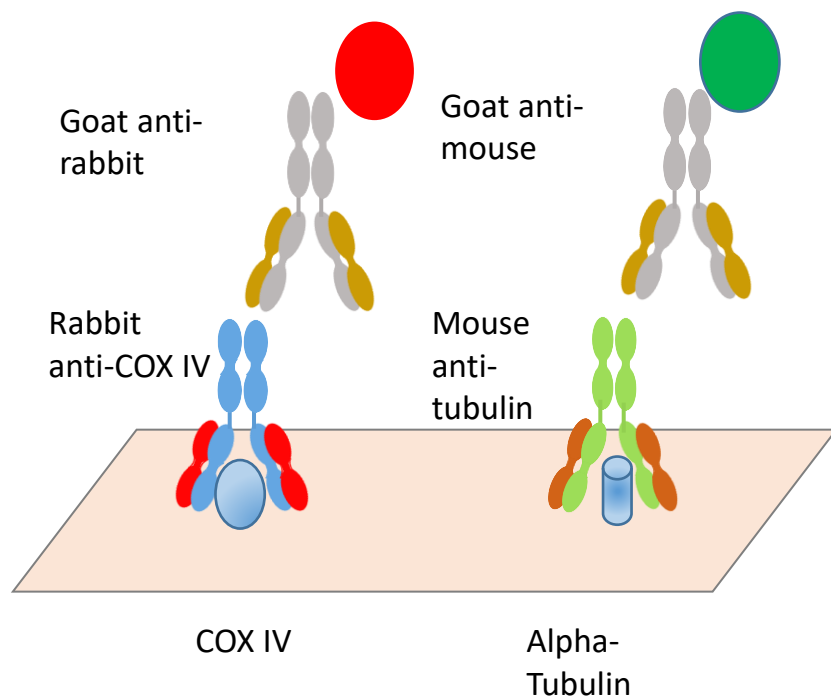


化学发光，二抗由酶标记

荧光，二抗由荧光素标记

多色荧光—多重检测

e-BLOT

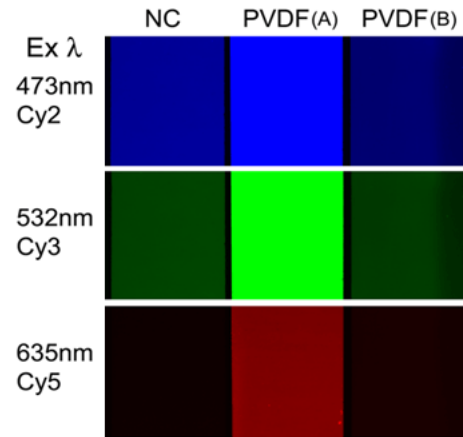


COX IV

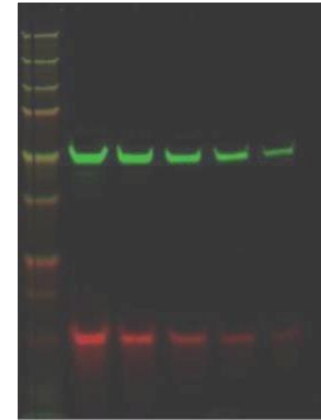


Alpha-Tubulin

荧光成像的背景会严重影响检测的灵敏度



NC膜、PVDF膜在不同激发波长下的荧光背景



荧光成像结果

近红外荧光相对于RGB荧光背景低，但是检测灵敏度仍然低于化学发光成像，无法满足低丰度蛋白成像的需求。

Western 检测的方法

- 化学发光

压片法 灵敏度高，定量范围窄

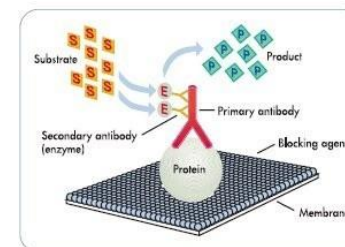
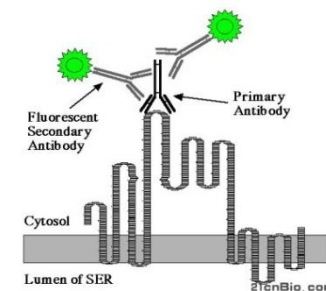
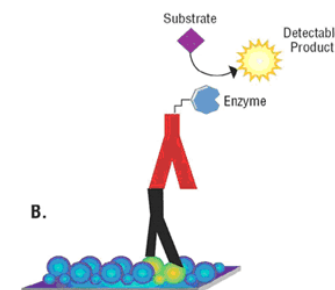
CCD成像 定量范围宽，灵敏度不够

- 荧光成像 背景高，灵敏度不够

可见荧光 背景高，灵敏度不够

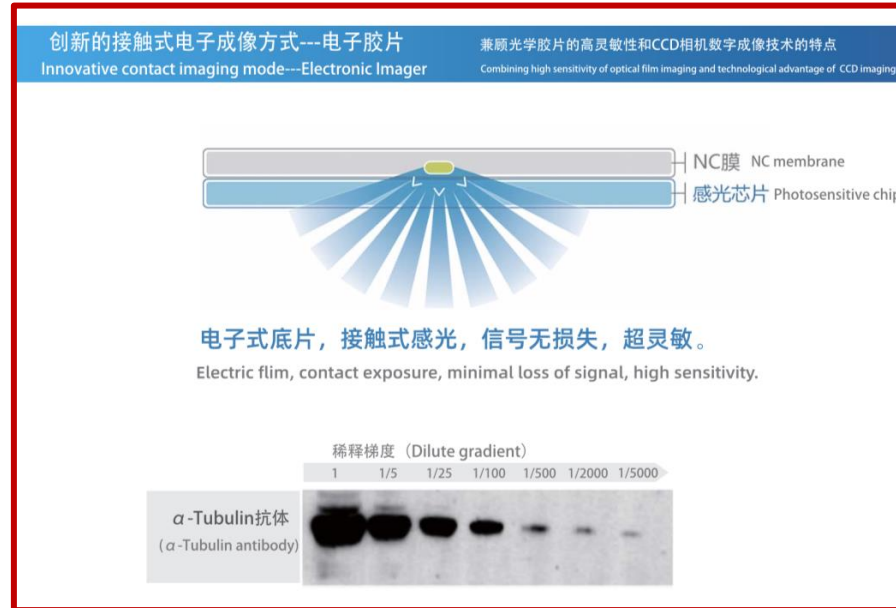
近红荧光 背景略低，灵敏度仍然不够

DAB显色 定量范围窄，灵敏度低



各种方法各有优缺点，该怎么选择？
有没有更好的方法？

电子压片法成像



- 1, 样品距感光芯片距离为0，光信号无损失
- 2, 像素点加大，满阱电子数增加，定量范围提升2个数量级
- 3, 取消镜头，图像无几何畸变

电子压片法成像

芯片加大

现有成像仪一英寸感光芯片



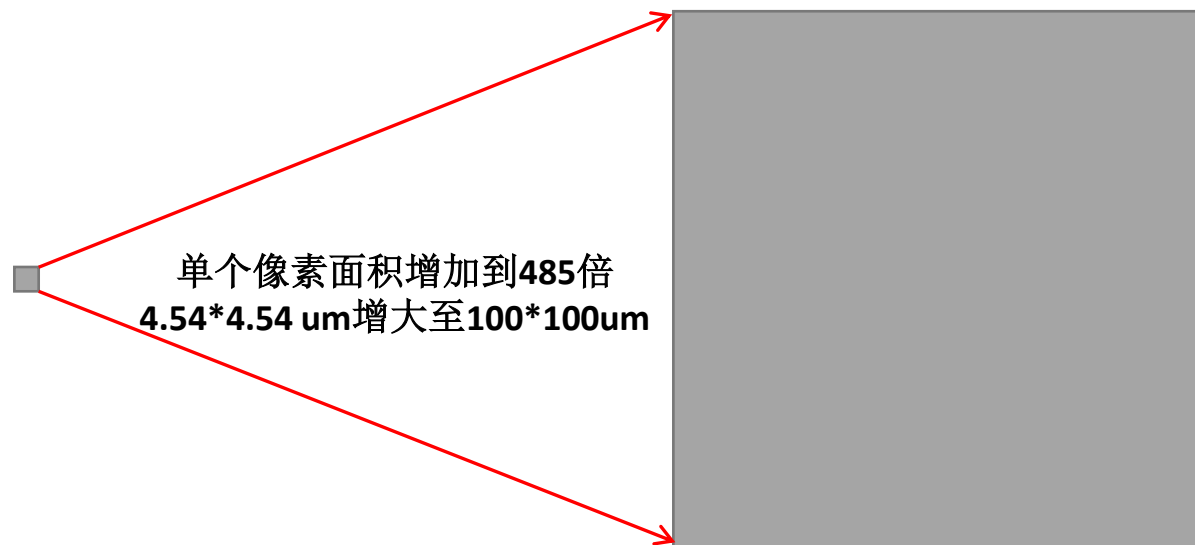
感光芯片面积增加到135倍
 1.2 cm^2 增大至 165 cm^2



电子压片法成像

像素点变大

现有成像仪单个像素大小

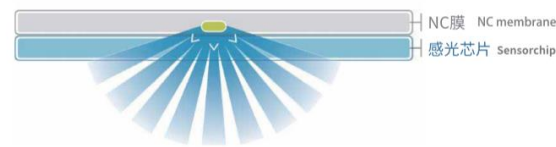


电子压片法成像

去掉镜头，样品距感光芯片距离为0



去掉镜头，接触式成像



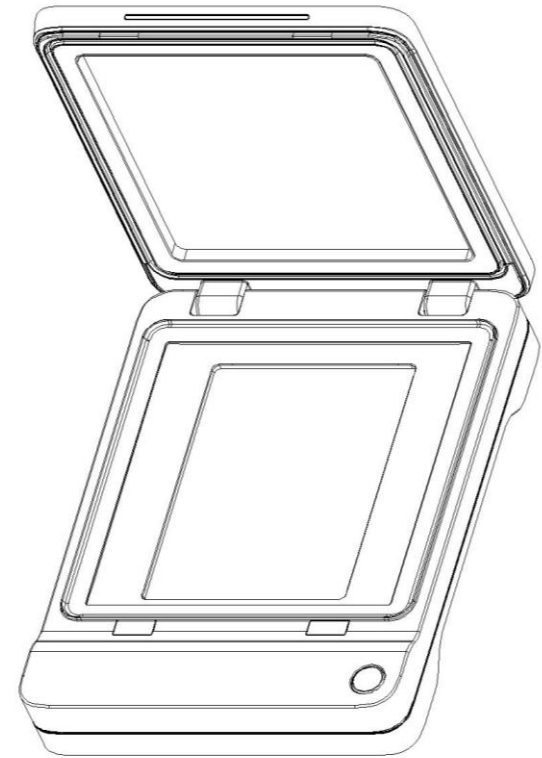
电子压片法成像—接触式成像

➤ 第四代Western成像技术，相对于冷CCD成像

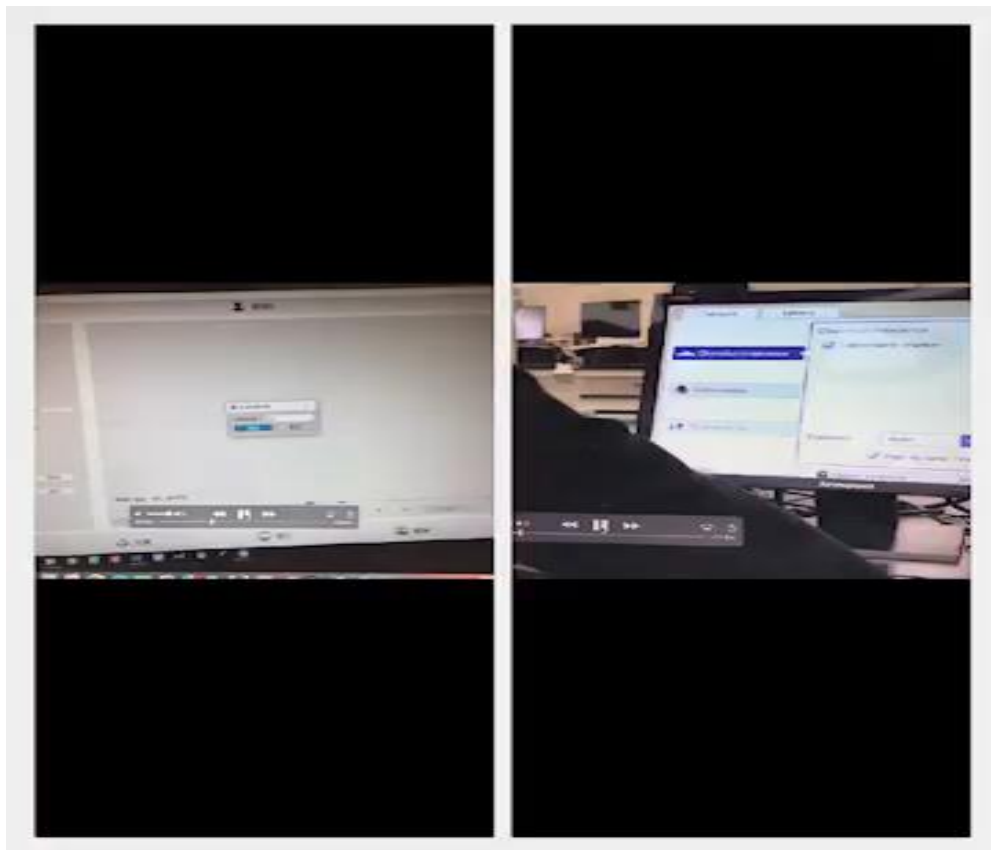
- ① 灵敏度高2-3个数量级；
- ② 定量范围高2个数量级
- ③ >95%的样品在1秒内完成成像；
- ④ 空间节省>90%；

➤ 核酸印迹微弱信号的成像，southern blot, northern blot

➤ 同位素成像

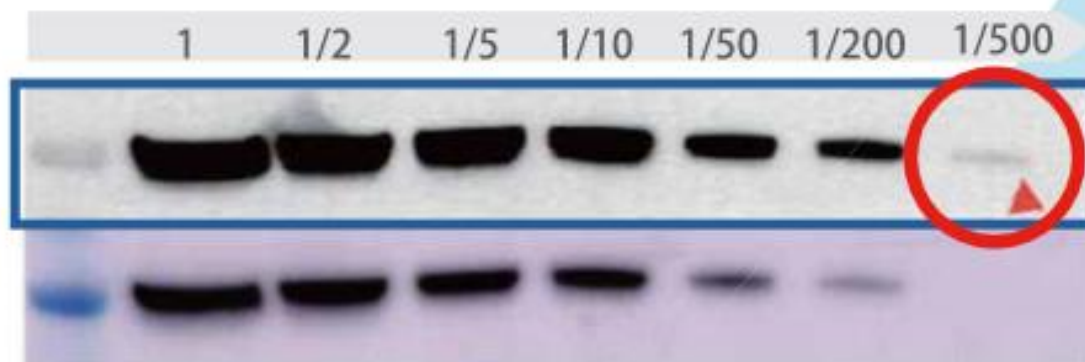


电子压片 VS 冷CCD成像—速度和灵敏度



α -Tubulin抗体 (α -tubulin antibody)

稀释梯度 (Dilute gradient)

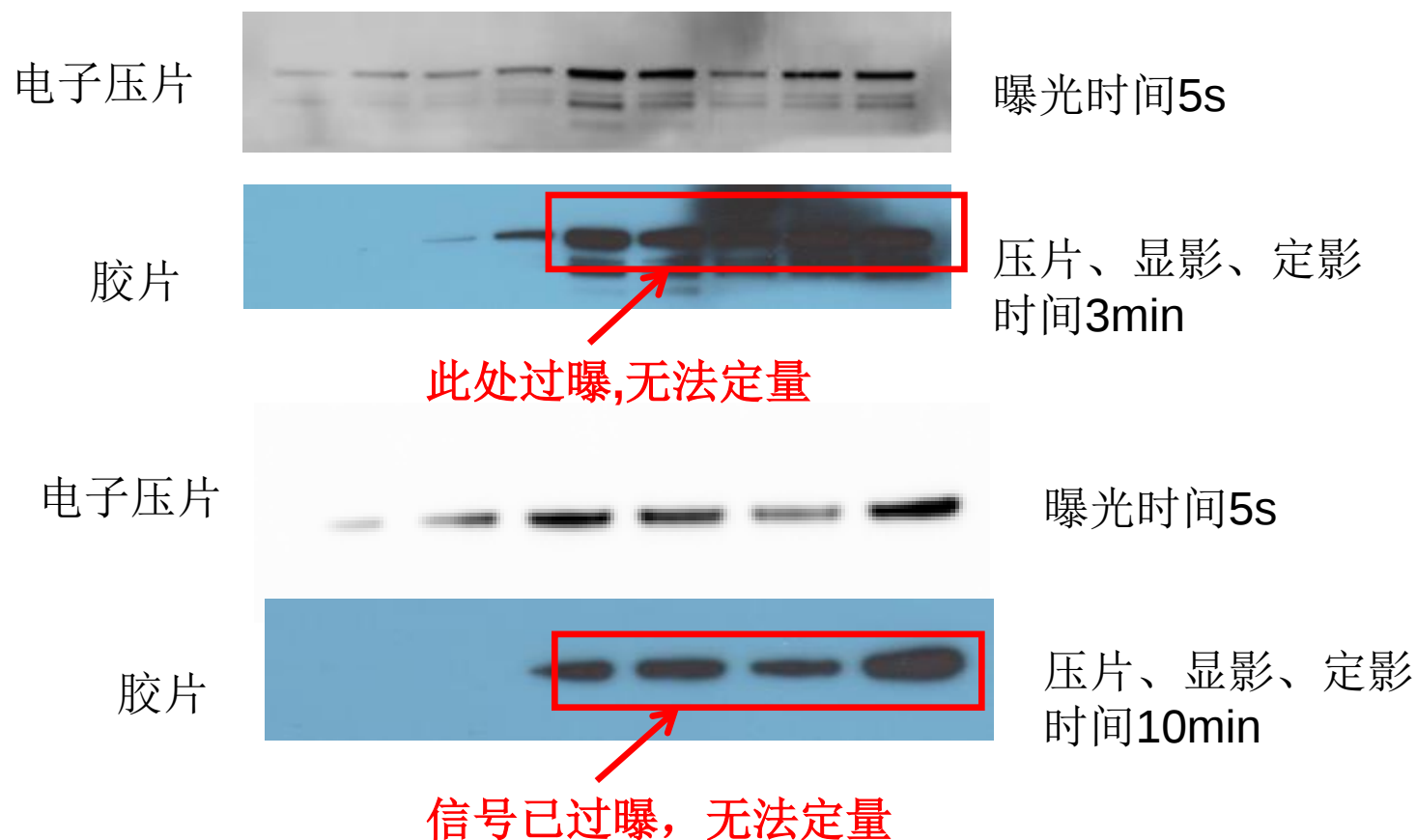


上图: Touch Imager 1秒曝光 电子压片

下图: 冷CCD相机成像60秒曝光

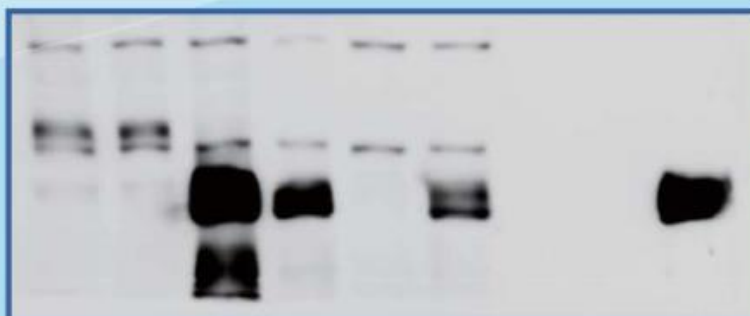
(美国某知名品牌, renowned American brand)

电子压片 VS 暗房压片—速度，定量范围和灵敏度



电子压片 VS 冷CCD成像—速度，定量范围和灵敏度

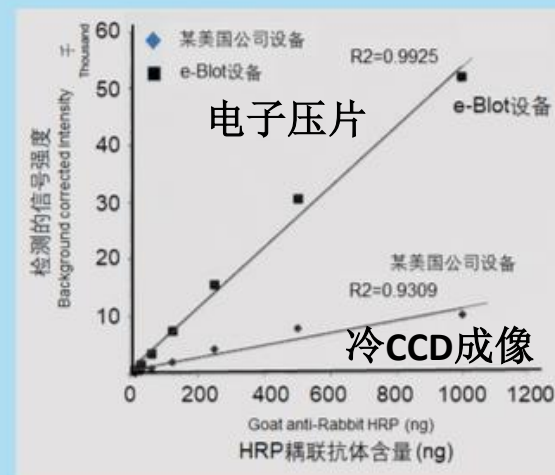
电子压片定量范围比现有冷CCD成像方法提高两个数量级



电子压片
Touch Imager
3秒曝光
3 seconds exposure



冷CCD成像
某市场一线
成像仪
5分钟曝光
5 minutes exposure



经过权威第三方检测机构检测，Touch Imager有更宽的线性动态范围，能够在更宽的信号强度范围内实现准确定量。

According to data from the SGS, the Touch imager has a wider dynamic range of sensor than others, and definitely quantity signal in a wider range of density.

使用成本对比

	胶片压片	冷CCD成像	电子压片
暗房	需要	不需要	不需要
耗材	胶片，显影液，定影液，发光液，暗盒。	发光液	低成本发光液
单个样品成本	高	中	低

要拿到可用于文章发表的western blot实验结果
必须要：

- 确保western blot实验结果的准确性
- 确保所有信号都被检测到
- 确保条带能被清晰区分

一定要选择合适的检测方法

Western 检测的方法

- 化学发光

压片法 灵敏度高，定量范围窄

CCD成像 定量范围宽，灵敏度不够

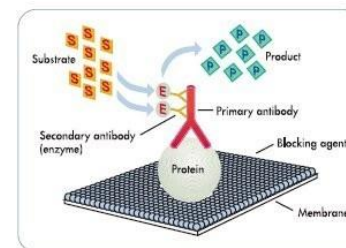
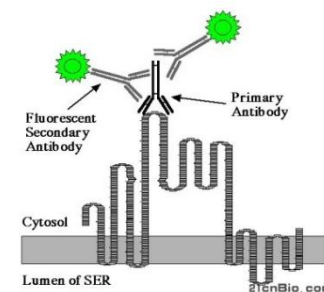
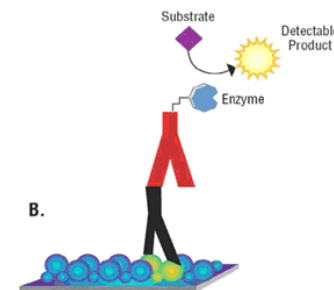
电子压片法 灵敏度最高，定量范围最宽

- 荧光成像 背景高，灵敏度不够

可见荧光 背景高，灵敏度不够

CCD成像 背景略低，灵敏度仍然不够

- DAB显色 定量范围窄，灵敏度低



03.

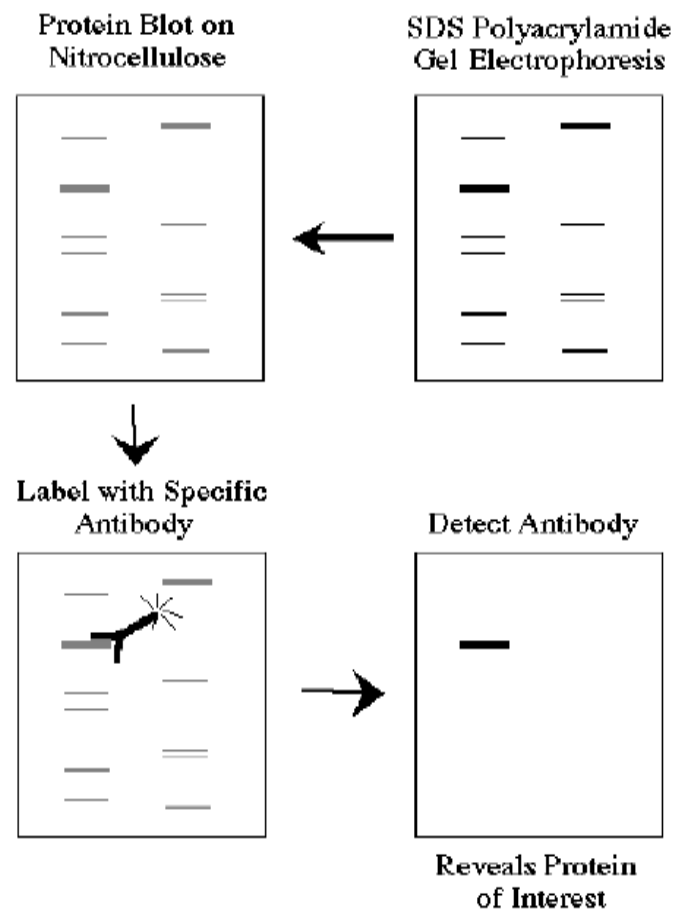
Western Blot各个环节的注意事项

上海易亨特光电技术有限公司

SHANGHAI E-BLOT PHOTOELECTRICS TECHNOLOGY CO.,LTD.

Western 流程

- 蛋白样品的制备
- SDS-PAGE
- 转膜
- 封闭
- 一抗杂交
- 二抗杂交
- 成像检测



- 细胞充分裂解;
- 蛋白提取时注意样品的粘稠度;
- 蛋白提取时尽量保证不同样品的盐浓度一致;
- 尽可能采取简单方法, 避免蛋白丢失;
- 尽可能将所有待分析的蛋白质样品全部溶解;
- 细胞和组织样品的制备应尽可能减少蛋白的降解, 低温和蛋白酶抑制剂防止蛋白降解;
- 提取过程中避免蛋白产生聚集、沉淀和变性;
- 防止发生人为的蛋白质样品化学修饰 (例如加入尿素不要超过37°C, 防止氨甲酰化而修饰蛋白);
- 制备方法应具有标准化、重现性、可靠性和简便性。

- 选择合适的胶浓度
- AP最好是新鲜配制
- TEMED 和 AP 要适量
- 玻璃板洗干净
- 胶的保存条件适当

- 非连续胶，浓缩胶和分离胶电泳条件不一样
- 电压不要太高
- 防止漏液
- 注意降温

- 选择合适的膜
- Pvd膜甲醇活化
- 温度控制
- 赶气泡
- 有效的利用SDS和甲醇

- 封闭试剂的选择
- 封闭液的浓度

- 抗体特异性
- 抗体保存
- 合适的抗体浓度
- 单克隆抗体、多克隆抗体的选择
- 一抗杂交条件
- 清洗时间和次数

04.

Western Blot常见问题及解决方案

上海易亨特光电技术有限公司

SHANGHAI E-BLOT PHOTOELECTRICS TECHNOLOGY CO.,LTD.

SDS-PAGE电泳

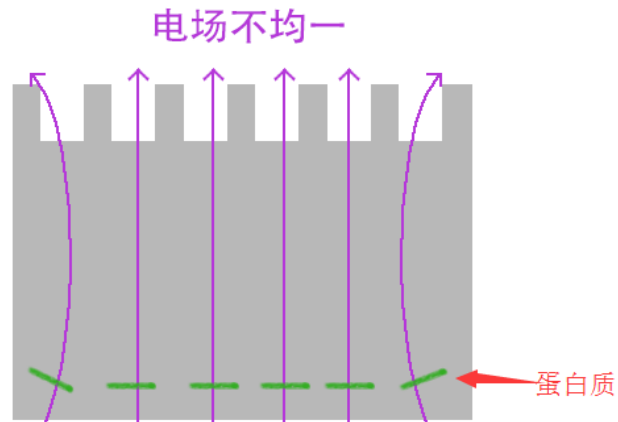
◆ 胶不平？

◆ 凝胶漏液？

- 胶板洗刷干净
- 加入AP和TEMED的量要合适
- 加入试剂后摇匀，使其充分混合，防止部分胶块聚合不均匀
- 温度合适，受热不均匀导致胶聚合不均匀
- 两块玻璃板底部要对齐

SDS-PAGE电泳

- ◆ 条带比正常的窄?
- ◆ “微笑”或“倒微笑”条带?



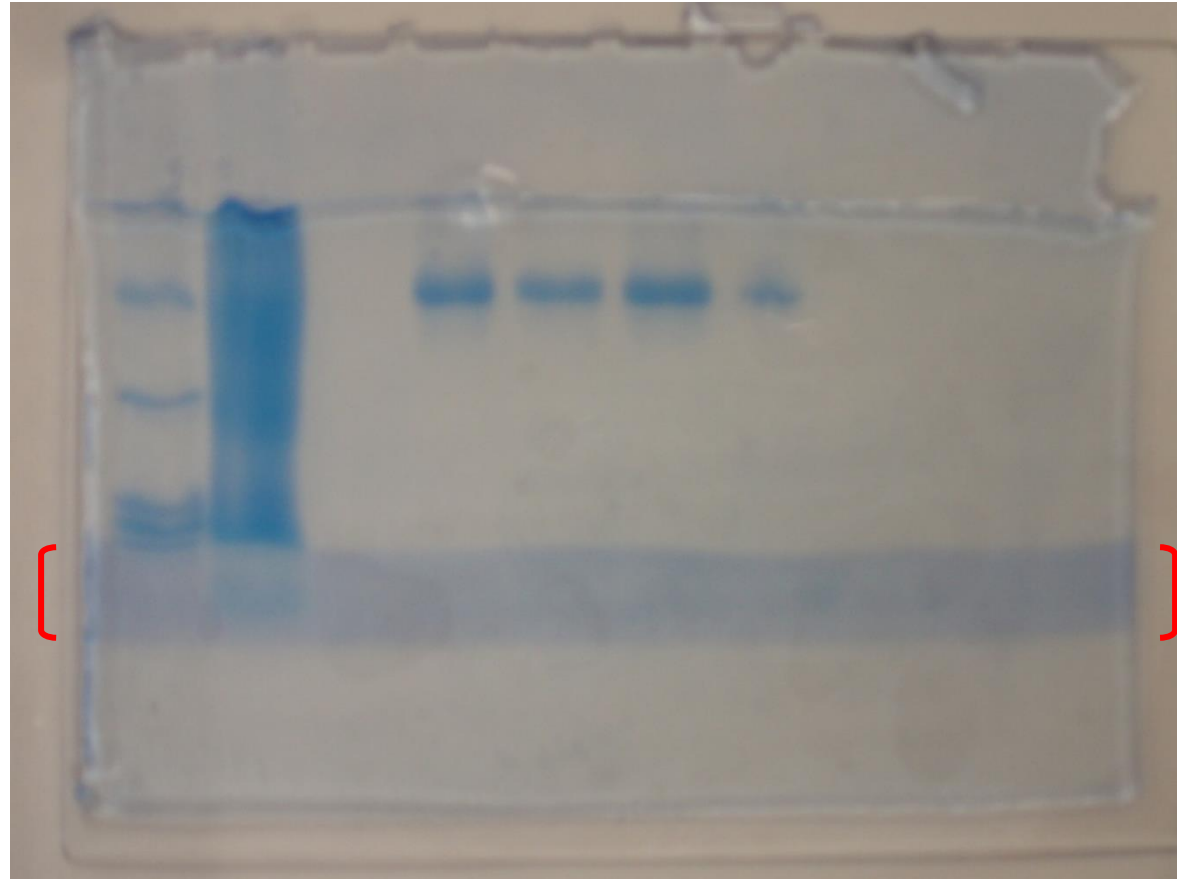
- 凝胶聚合不均匀，灌胶时候尽量混合均匀，动作轻缓
- 拔梳子要迅速，清洗加样孔要小心，以免把上样带扭曲
- 样品盐浓度过高会挤压其他条带导致宽窄不一，纯化样品，调整盐浓度
- 胶板底部有气泡会影响电泳效果，应赶走气泡。同时注意电泳槽装置是否合适

转膜及抗体检测

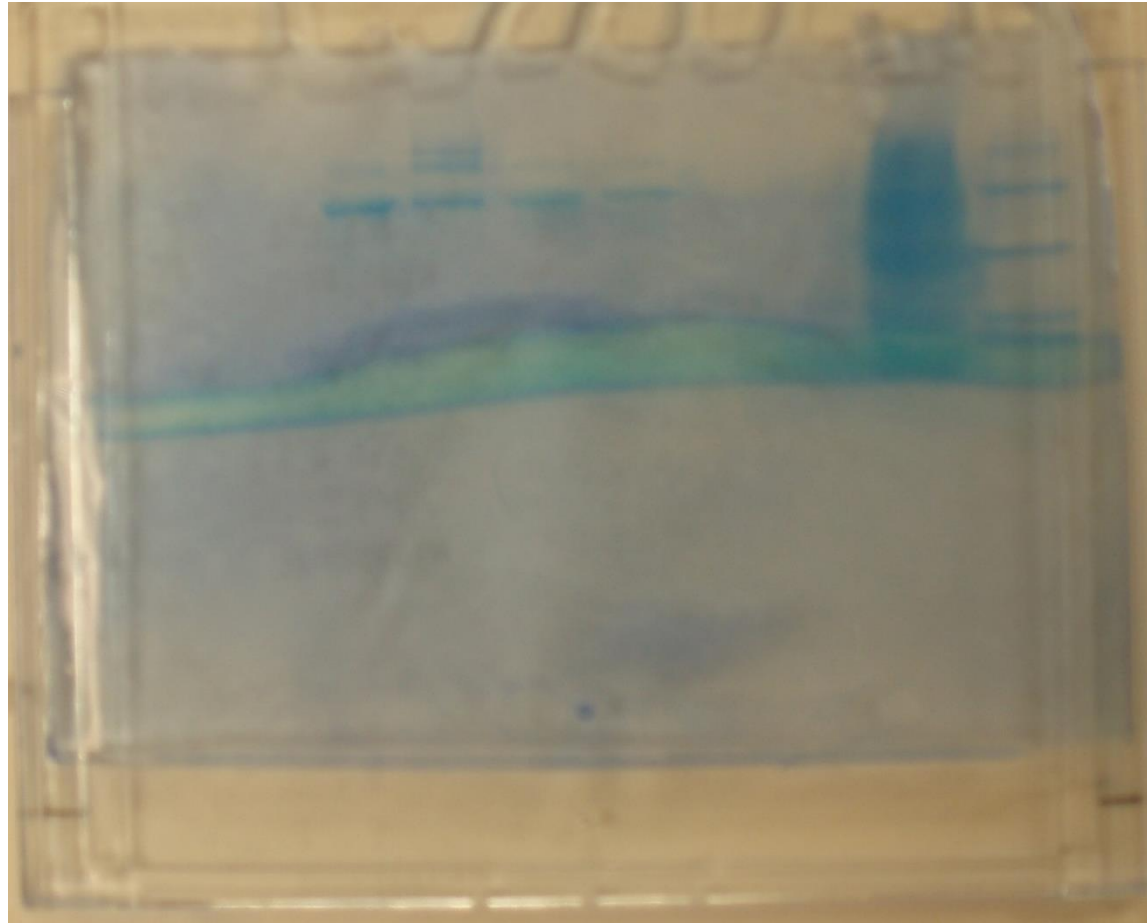
- ◆ 凝胶肿胀或卷曲？
- ◆ 条带歪斜或漂移？
- ◆ 单个或多个白点？
- ◆ 转膜缓冲液过热？

- 可将凝胶在转膜之前放到转膜缓冲液中浸泡5-10min
- 电转仪长期使用导致海绵变薄，“三明治”结构不紧凑导致。可在两块海绵之间垫上少许普通的草纸
- 确保膜和胶块之间没有气泡
- 缓冲液中离子浓度太低，电流或电压太高。转膜过程注意降温

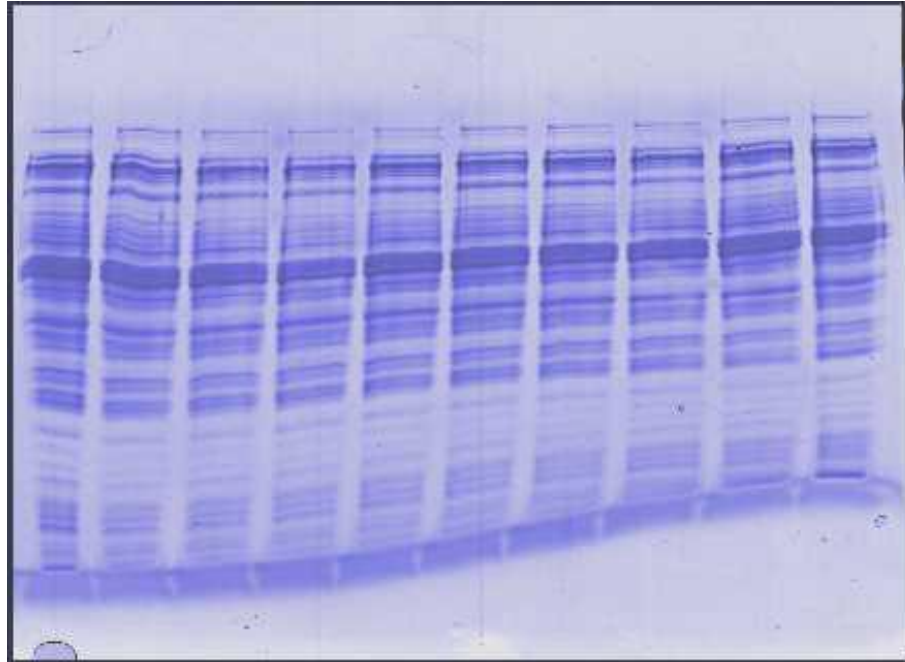
离子浓度太低，蛋白跑不动了



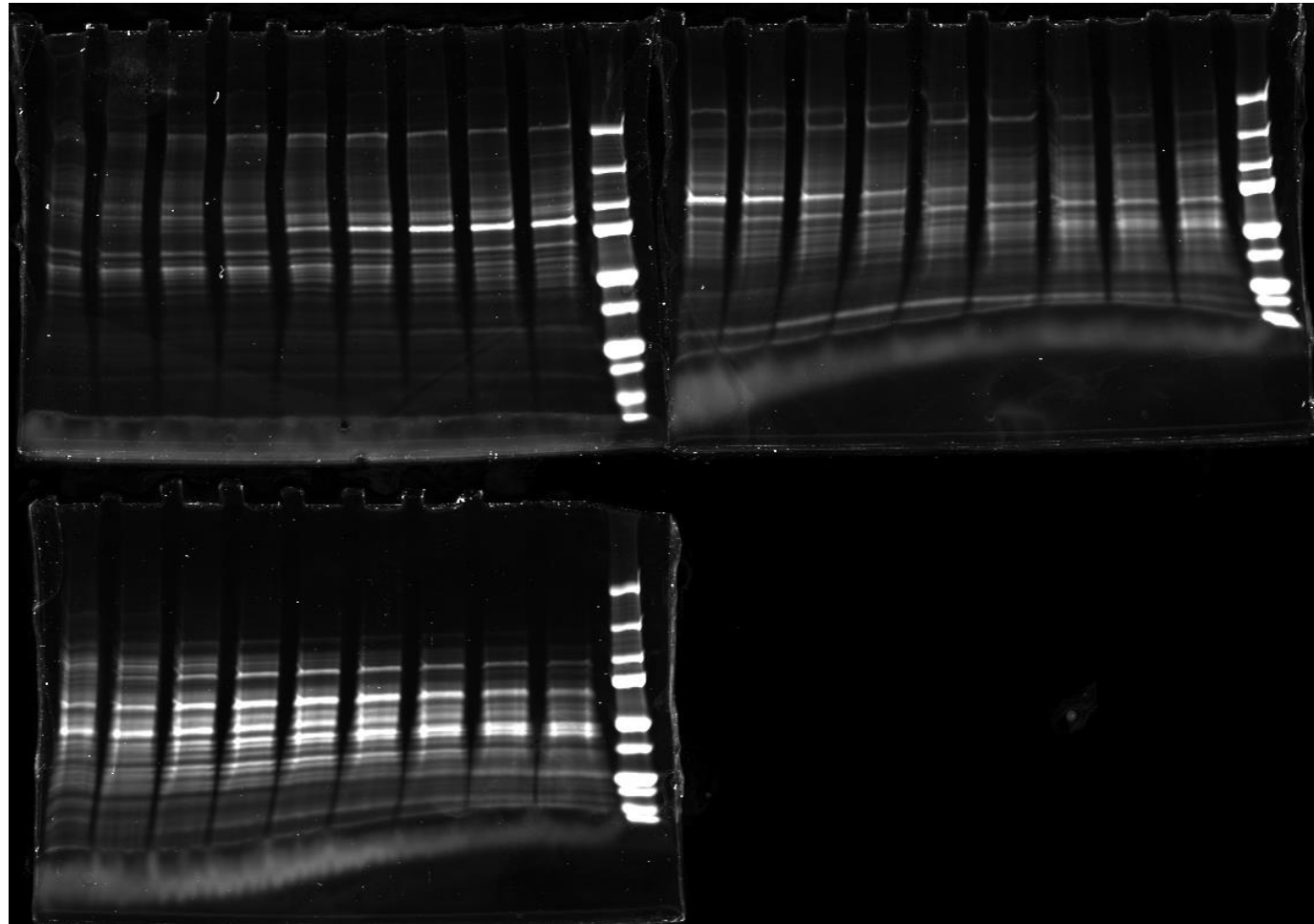
离子浓度太低，蛋白跑不动了



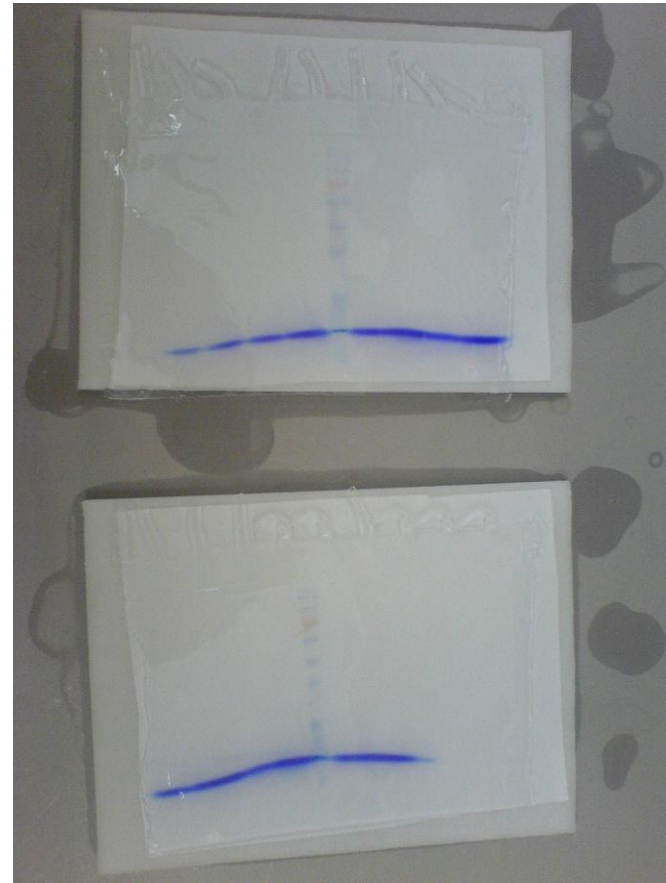
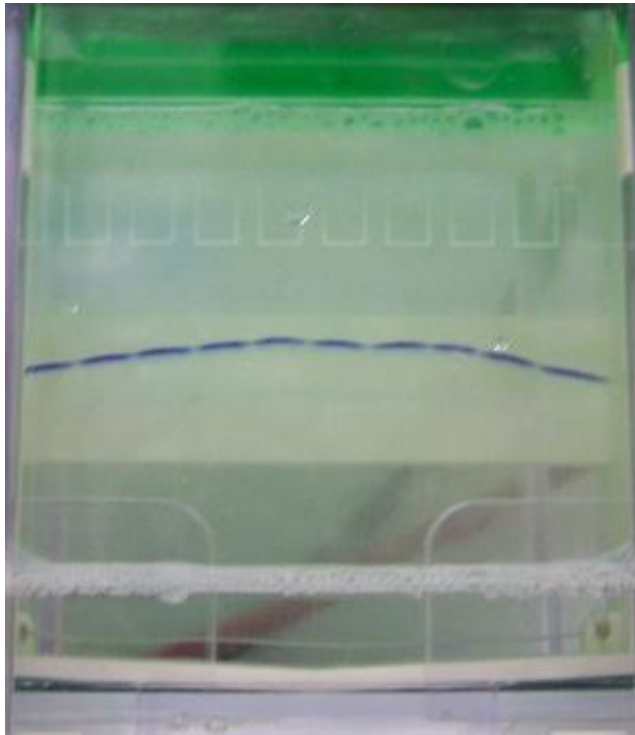
电流太大



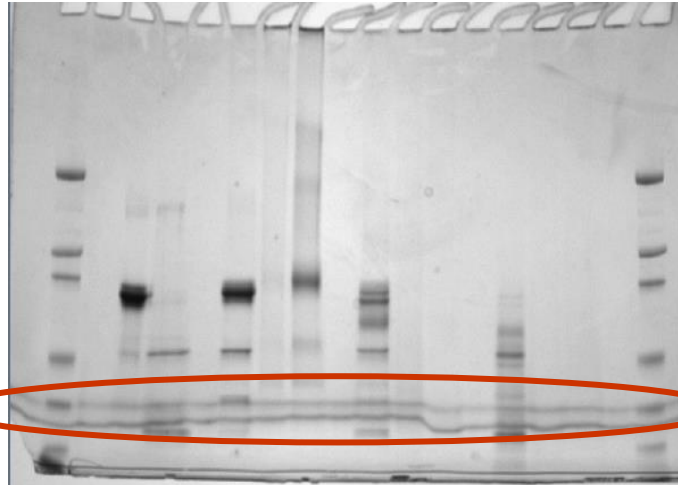
电流太大



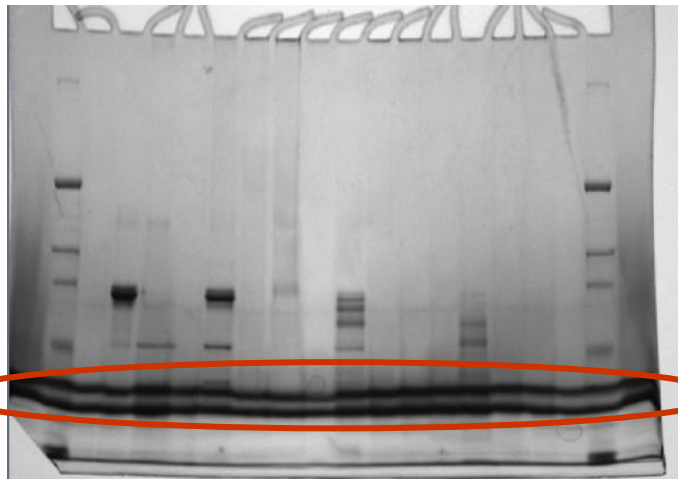
上槽漏液



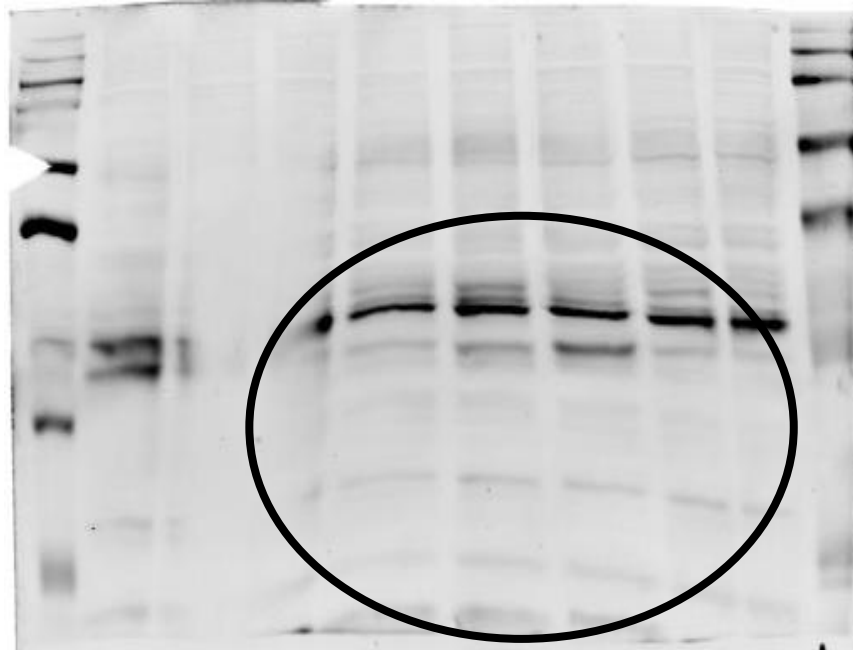
角蛋白污染



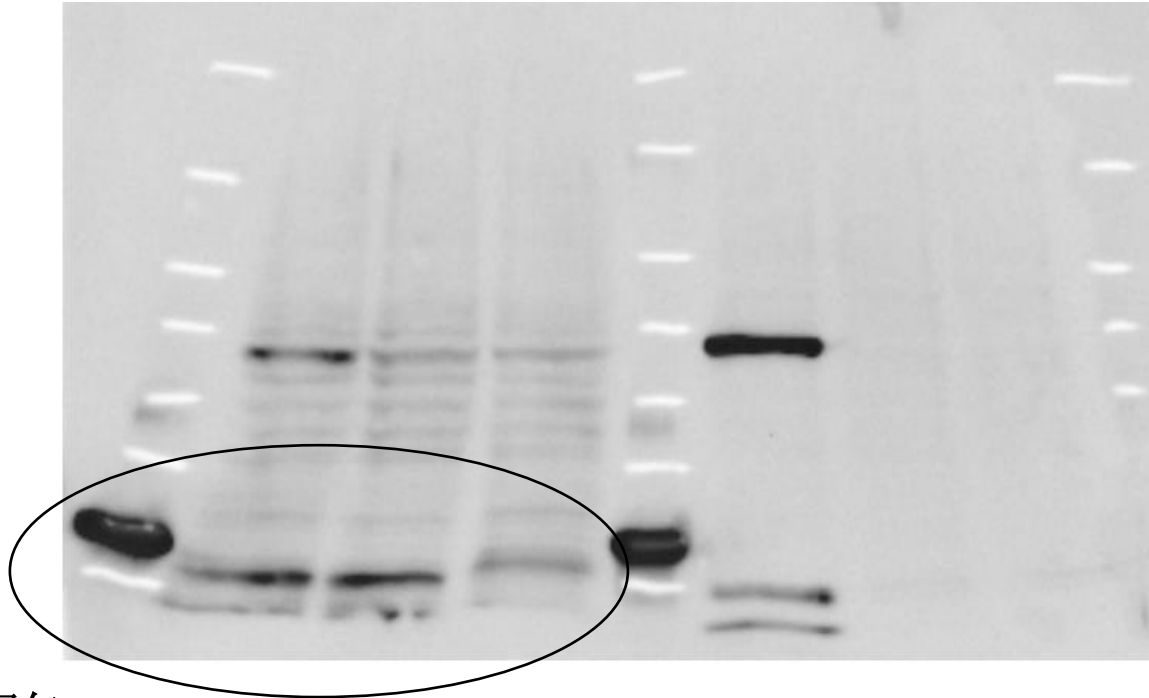
58 Kd to 64 Kd



盐浓度不一致



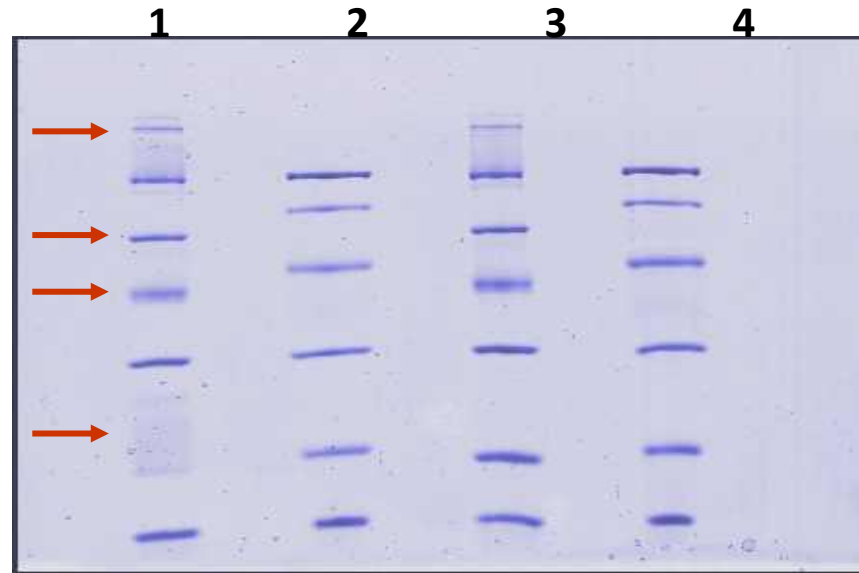
不规则



缓冲液没有混匀
缓冲液配置错误，比如：Tris glycine 比例不对
缓冲液调pH值时，反复加入酸碱，致使缓冲液盐浓度过高

盐浓度过高会导致电流过大，进而使得转印系统产热过多而导致过热，过热会使中间的泳道跑得比两边的泳道快，进而形成微笑状

还原剂与加热影响



LANE 1: Standards diluted 1:20 in Laemmli Buffer **without BME** and no heat.

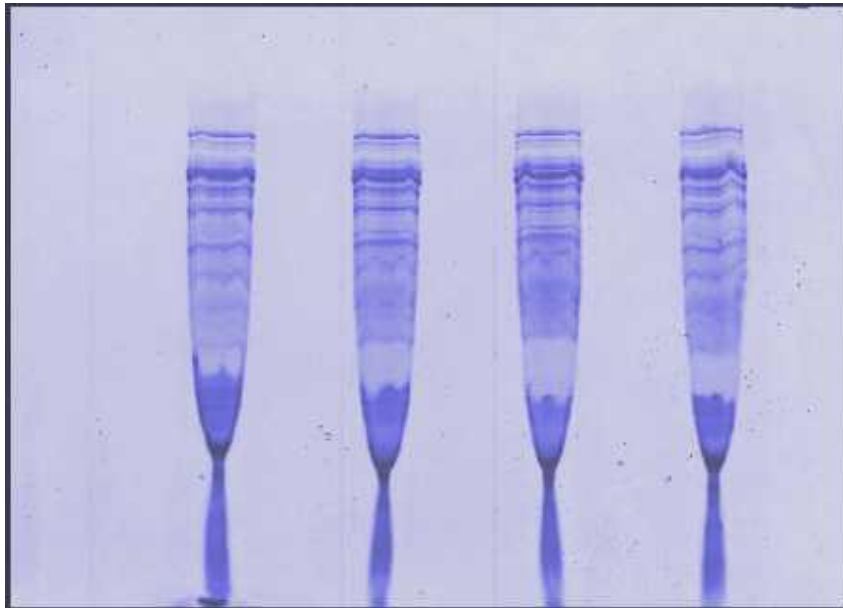
LANE 2: Standards diluted 1:20 in Laemmli Buffer **with BME** and no heat.

LANE 3: Standards diluted 1:20 in Laemmli Buffer **without BME** and heated 10 min 90C.

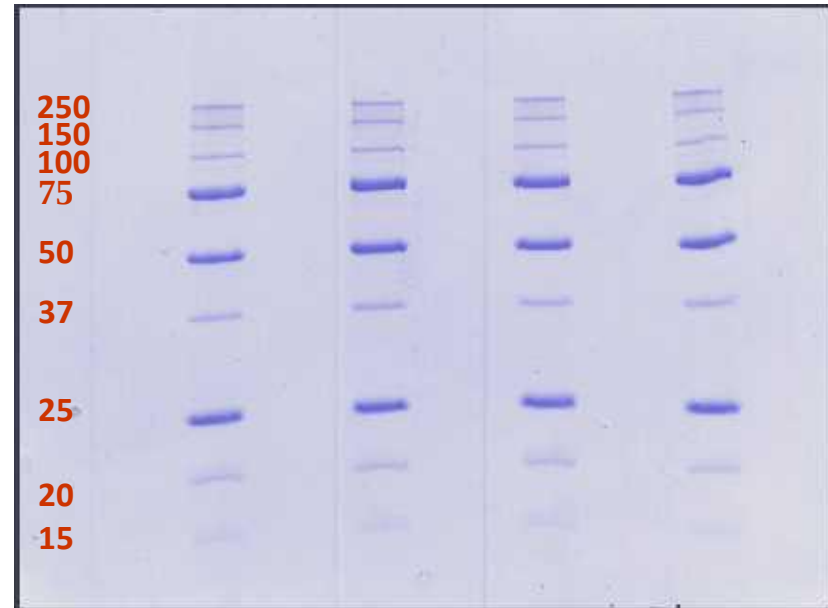
LANE 4: Standards diluted 1:20 in Laemmli Buffer **with BME** and heated 10 min 90C

400V电压电泳结果

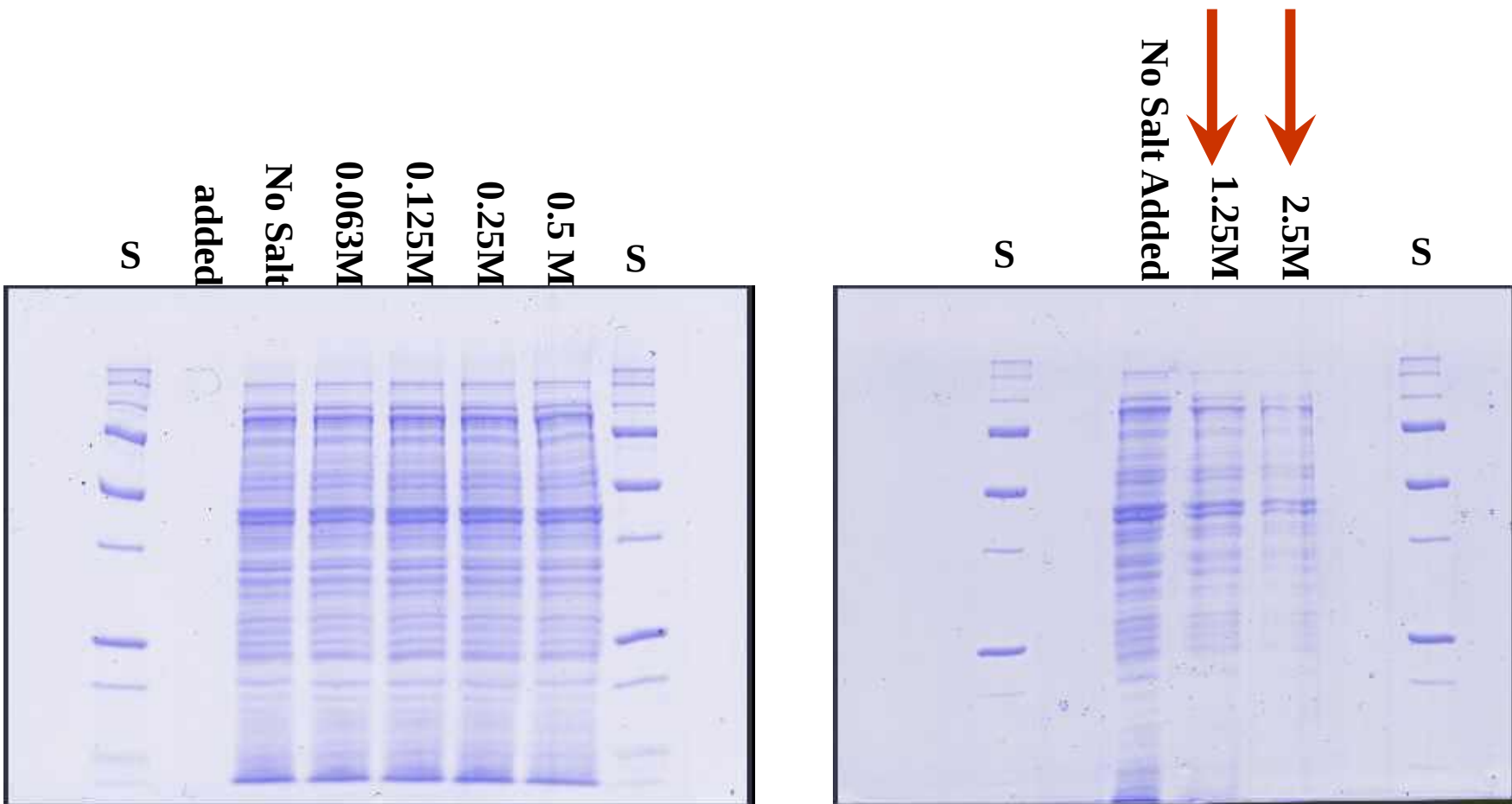
A



B

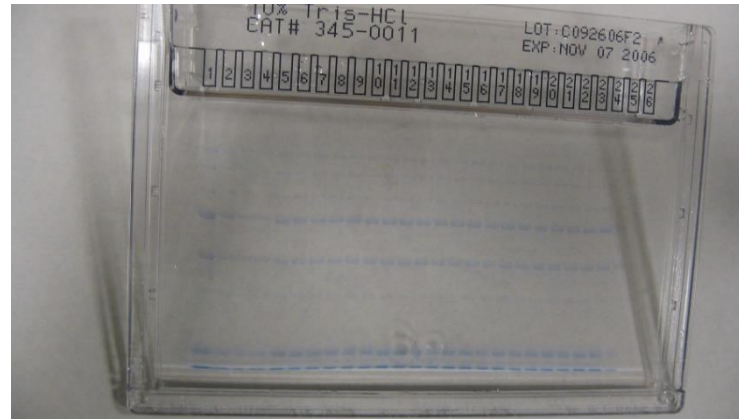


样品盐浓度影响



预制胶不可冷冻

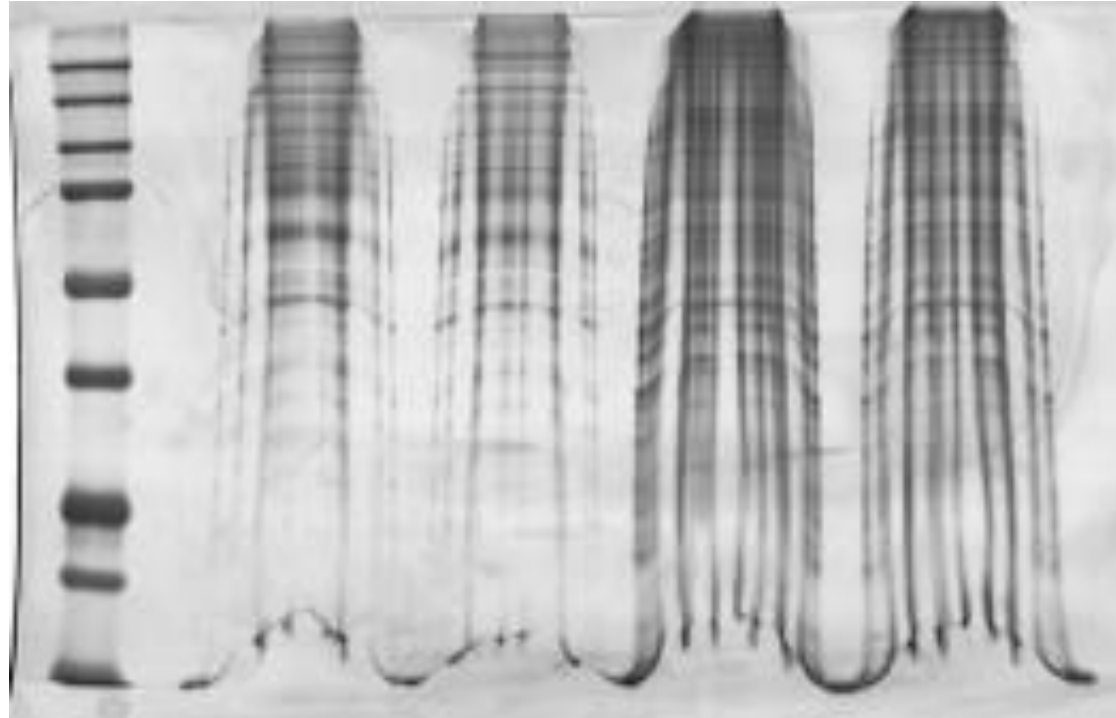
Gel stored at 4C



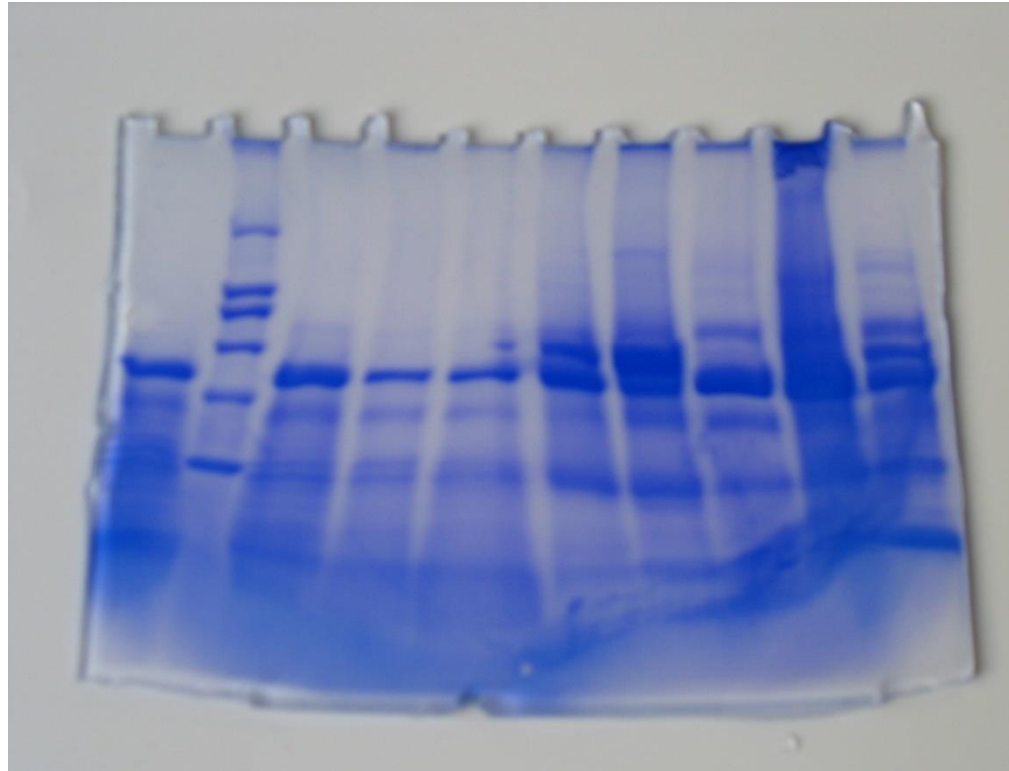
**Gel allowed to freeze
before
the run**



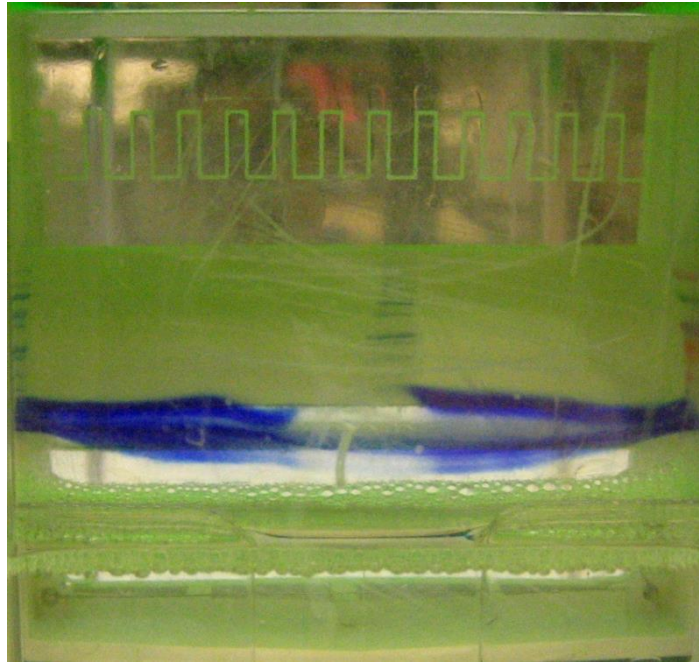
样品沉淀



样品孔之间漏样



胶和玻璃板之间有縫隙



原因: 胶干了, 胶的膨胀, 冷冻, 粗暴操作

转移到膜上的蛋白很少

原因

1. 蛋白分子量 < 10KD
2. 蛋白的等电点 > 9
3. SDS浓度不合适
4. 凝胶太厚

对策

1. 蛋白分子量 < 10KD时，减少转膜时间；使用小孔径的膜
2. 更换高pH值Buffer
3. 在阴极buffer中加入 0.005 - 0.01% SDS 可提高转膜效率
4. 延长转膜时间

背景太高

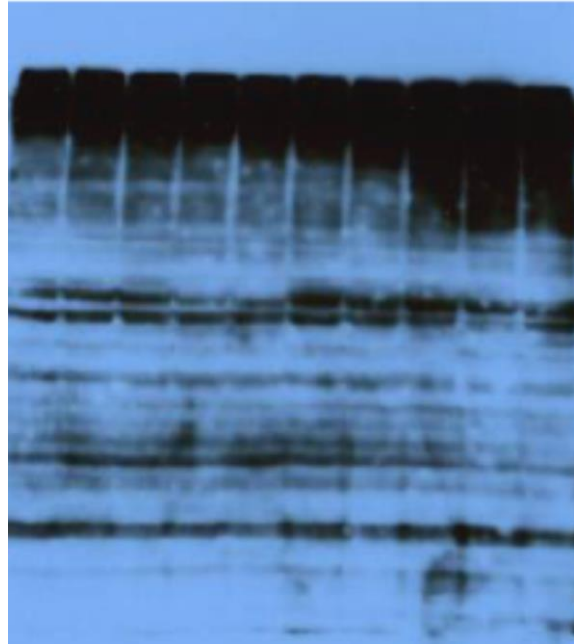
原因

1. 膜没有均匀浸湿
2. 膜或者缓冲液污染
3. 封闭不充分
4. 抗体与封闭剂出现交叉反应
5. 抗体浓度过高

对策

1. 转膜前用100%甲醇将膜完全浸湿
2. 拿取膜与吸水纸时要戴手套，更换新鲜转膜缓冲液
3. 检测一抗、二抗与封闭剂是否有交叉反应
4. 杂交前检测一抗、二抗的工作浓度

背景太高



比较不同封闭液的效果

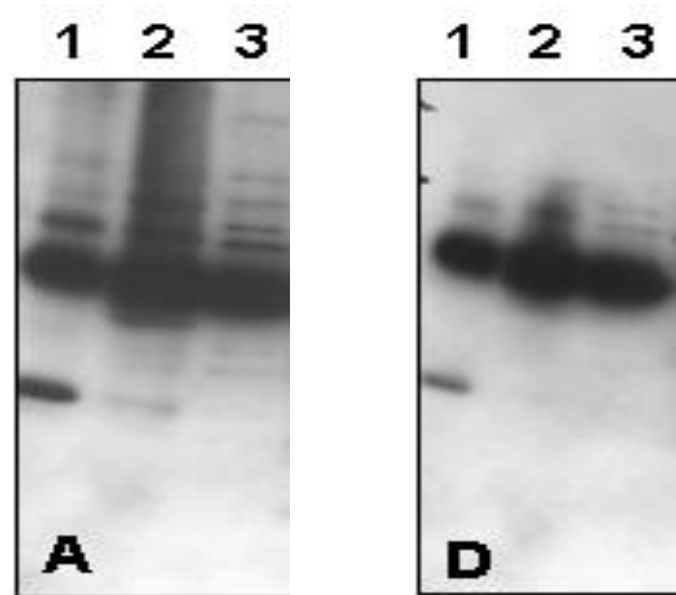


Milk：脱脂奶粉

Casein：干酪素/酪蛋白（动物奶中的含磷蛋白）

BSA：牛血清白蛋白

调整封闭液的浓度

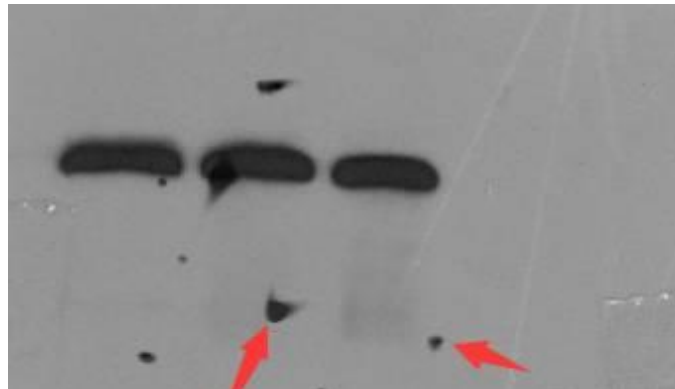


A: blocking with 2% milk

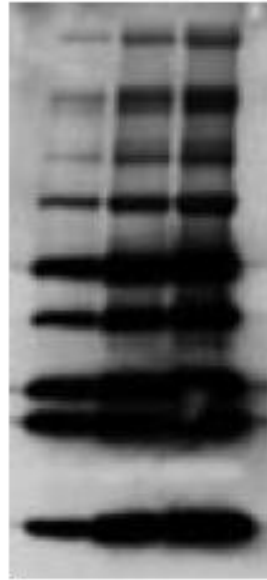
D: blocking with 5% milk

脱脂奶粉溶解不完全

e-BLOT



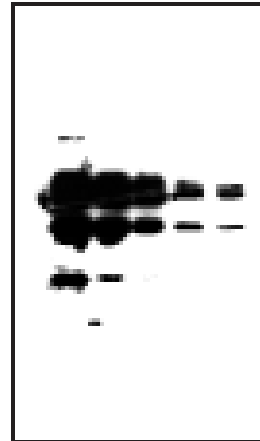
优化上样量



优化一抗和二抗的浓度



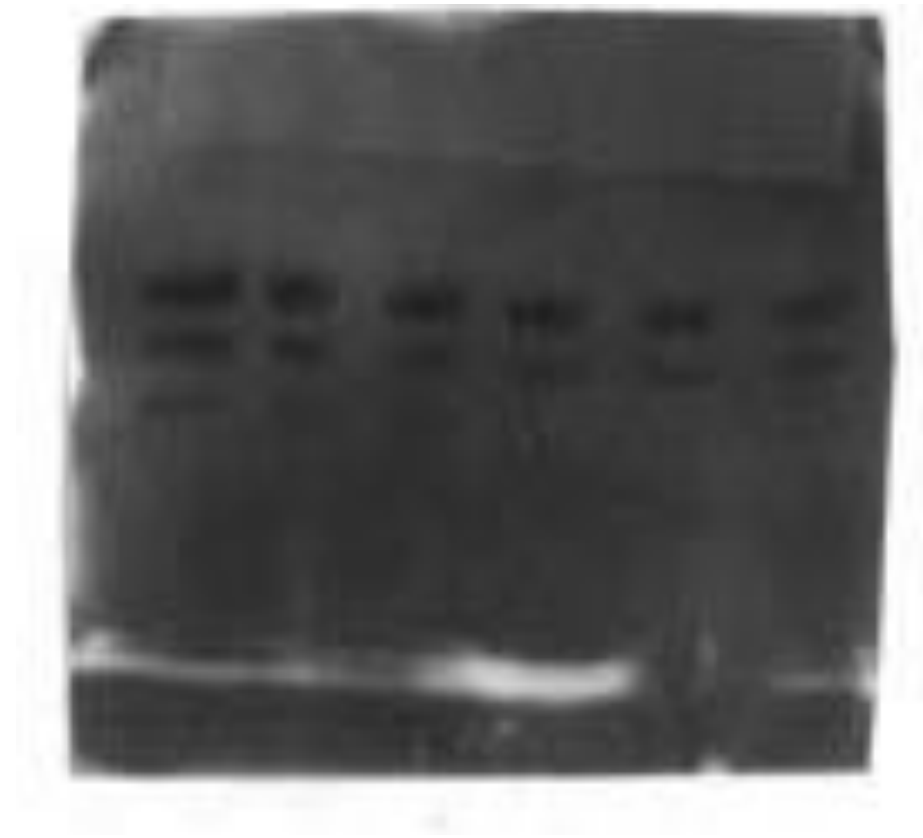
Primary Antibody 1:500
Secondary Antibody 1:5,000



Primary Antibody 1:5,000
Secondary Antibody 1:50,000

背景高—信号太弱

e-BLOT



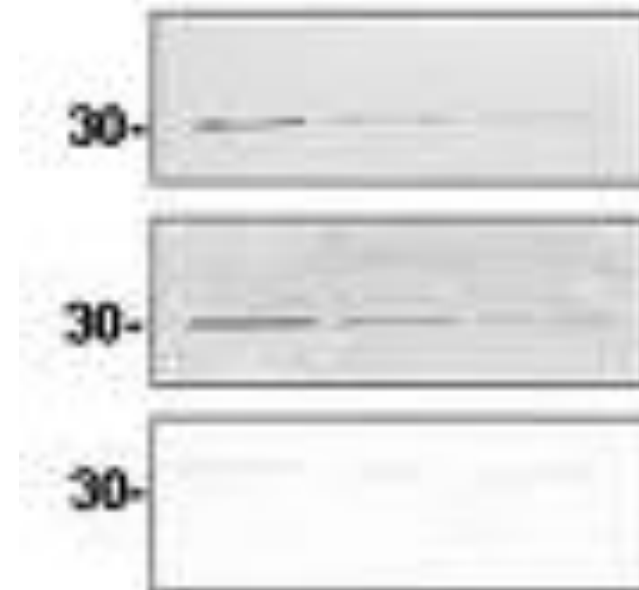
杂交信号很弱

原因

1. 抗体保存不当
2. 抗原不充足
3. 膜的漂洗过度

对策

1. 抗体长期保存应在 -70°C ，分装以避免反复冻融
2. 增加蛋白上样量，做已知标准量蛋白的对照
3. 减少漂洗的时间和次数



出现非特异带

原因

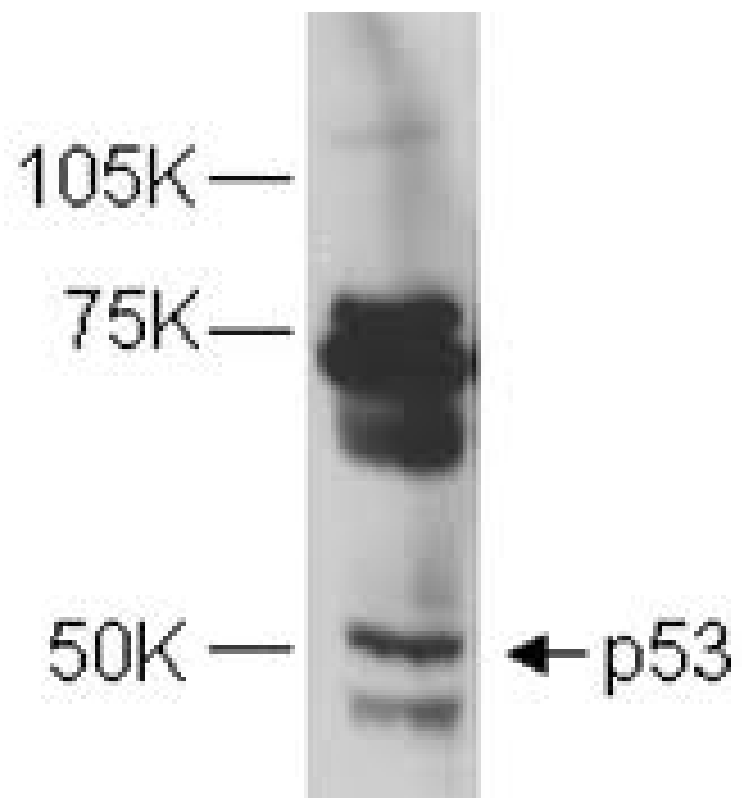
1. 一抗不是唯一特异的
2. 二抗出现非特异结合

对策

1. 制备单克隆抗体或者重新选取合成抗原多肽的位点
2. 设立不加一抗，只加二抗的平行对照来检测二抗是否有非特异结合

非特异性条带

e-BLOT

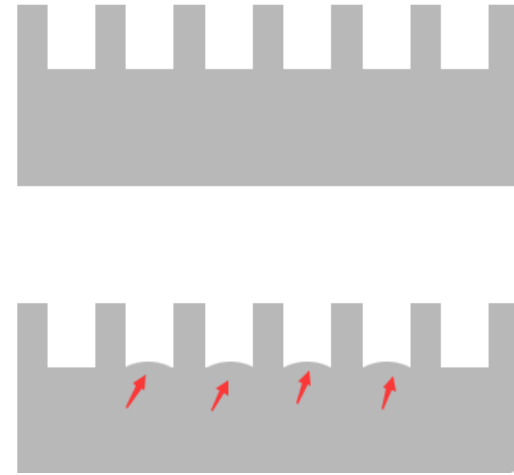
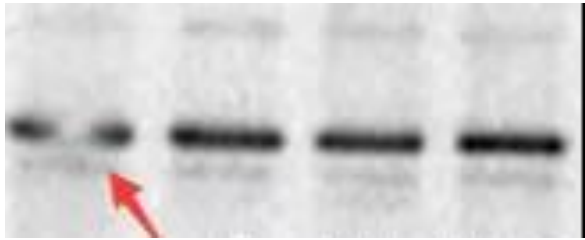


成像结果异常—一条带发白



可能原因是一抗浓度过高，二抗上HRP催化活力太强，同时显色底物处于临界点，反应时间不长，将周围底物催化完，形成了空白。可降低一抗和二抗浓度，或者更换底物来避免该现象。

成像结果异常—哑铃状条带



- 1，由于配置胶有问题，胶凝固后不均一，可通过重新配置胶，确保胶质量无问题来避免该现象出现。
- 2，样品可能含有过多杂质，我们在样品使用前对其进行离心，以去除过多杂质。

成像结果异常—一条带变形



可能的原因是SDS-PAGE胶中有气泡或者不溶性颗粒。我们在配胶过程中要小心，使用无杂质的液体。

你认为做好WB实验操作技术重要还是选择重要？

e-BLOT



选对正确的方法

控制好实验细节

让**Western**实验从不可控变成可控

eBlot Touch Imager 电子压片成像仪

解决Western成像的疑难杂症

- ① 灵敏度高三个数量级;
- ② 定量范围高两个数量级;
- ③ >95%的样品在1秒内完成成像;
- ④ 空间节省>90%;
- ⑤ 首次实现同位素低成本直接成像;
- ⑥ 核酸印迹Southern Blot、Northern Blot成像

