



弗德生物
Fdbio science

Western Blot 应用操作手册





目 录

| | |
|--|-----------|
| 1 Western Blot简介 | 1 |
| 1.1 Western Blot原理 | 1 |
| 1.2 Western Blot优点 | 1 |
| 1.3 Western Blot应用 | 1 |
| 1.4 Western Blot成功要素 | 1 |
| 2 Western Blot基本流程 | 2 |
| 2.1 蛋白样品的提取 | 2 |
| 2.1.1 通过有机溶剂或水溶法制备总蛋白 | 2 |
| 2.1.2 通过层析或电洗脱法制备目的蛋白 | 2 |
| 2.1.3 裂解液的选择 | 2 |
| 2.2 蛋白样品的定量 | 2 |
| 2.3 蛋白样品的变性 | 3 |
| 2.4 SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) | 4 |
| 2.4.1 SDS-PAGE基本原理 | 4 |
| 2.4.2 PAGE: 聚丙烯酰胺凝胶 | 4 |
| 2.4.3 聚丙烯酰胺凝胶分类 | 5 |
| 2.5 转膜 (Transmembran) | 6 |
| 2.5.1 转膜的定义 | 6 |
| 2.5.2 转移膜的选择 | 6 |
| 2.5.3 转膜步骤 (以槽式湿转为例) | 7 |
| 2.5.4 转膜注意事项 | 7 |
| 2.5.5 转膜后检测 (此步可以省略) | 8 |
| 2.6 封闭 (Blocking) | 8 |
| 2.7 一抗、二抗孵育 (Antibody incubation) | 8 |
| 2.7.1 一抗孵育 (Primary antibody incubation) | 8 |
| 2.7.2 二抗孵育 (Secondary antibody incubation) | 9 |
| 2.7.3 注意事项 | 9 |
| 2.8 蛋白检测 (Detection of proteins) —— 显影 | 9 |
| 2.9 结果分析 (Result Analysis) | 11 |
| 2.9.1 对照设计 | 11 |
| 2.9.2 内参 | 11 |
| 2.10 膜的重复利用 (Membrane recovery) | 11 |
| 2.10.1 膜解吸的方法 | 11 |
| 2.10.2 方法步骤 | 12 |
| 3 Western Blot常见问题分析 | 12 |
| 3.1 封闭液的选择 | 12 |
| 3.2 一抗的选择 | 13 |
| 3.3 优化抗原和抗体浓度的斑点杂交方法 | 13 |
| 3.4 电泳中的问题 | 14 |
| 3.5 Western blot 结果中背景高且不均匀 | 14 |



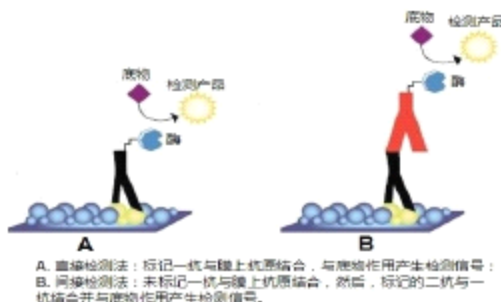
| | |
|-------------------------------------|-----------|
| 3.6 Western blot 结果中信号弱或无信号 | 15 |
| 3.7 Western blot 结果中背景较高 | 15 |
| 3.8 Western blot 结果中杂带较多 | 16 |
| 3.9 Western Blot 结果中无信号或显示信号弱..... | 16 |
| 3.10 其它现象 | 16 |
| 3.11 安全问题 | 16 |
| 4 弗德生物Western Blot产品汇总 | 17 |
| 4.1 蛋白抽提 | 17 |
| 4.2 蛋白定量 | 18 |
| 4.3 蛋白上样、电泳和染色 | 18 |
| 4.4 转膜及封闭 | 21 |
| 4.5 一抗、二抗孵育 | 21 |
| 4.6 显色 | 23 |



1 Western Blot 简介

1.1 Western Blot 原理

与 Southern 或 Northern 杂交方法类似，但 Western Blot 采用的是聚丙烯酰胺凝胶电泳，被检测物是蛋白质，“探针”是抗体，“显色”用标记的二抗。经过 PAGE 分离的蛋白质样品，转移到固相载体（例如硝酸纤维素薄膜）上，固相载体以非共价键形式吸附蛋白质，且能保持电泳分离的多肽类型及其生物学活性不变。以固相载体上的蛋白质或多肽作为抗原，与对应的抗体起免疫反应，再与酶或同位素标记的第二抗体起反应，经过底物显色或放射自显影以检测电泳分离的特异性目的基因表达的蛋白成分。该技术也广泛应用于检测蛋白水平的表达。



1.2 Western Blot 优点

高分辨率的电泳技术

特异敏感的抗原-抗体反应

1-5 ng 中等大小的靶蛋白

Western Blot 结合了凝胶电泳的高分辨率和固相免疫测定的特异敏感等多种优点，可检测到低至 1~5 ng（最低可到 10~100 pg）中等大小的靶蛋白。

1.3 Western Blot 应用

目的蛋白的表达特性分析

目的蛋白与其它蛋白的互作

目的蛋白的组织定位

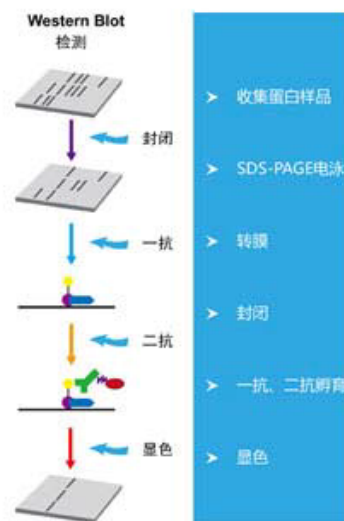
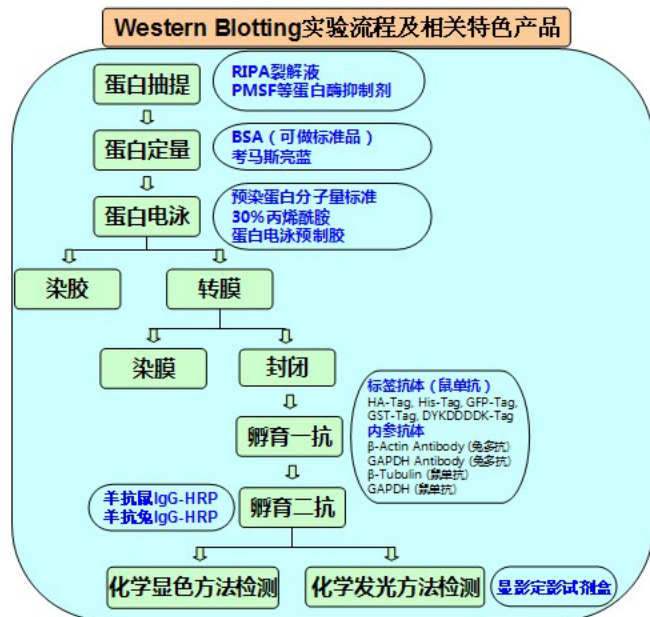
目的蛋白的表达量分析

1.4 Western Blot 成功要素

| 实验步骤 | 影响 Western Blot 成功的要素 |
|-------------------|---------------------------|
| 电泳分离蛋白 | 蛋白抽提，蛋白定量，样品制备，电泳 |
| 转膜 | 膜的选择，膜的确认，特殊处理 |
| 封闭 | 封闭液的选择，封闭条件优化 |
| 漂洗 | 漂洗液的配制与选择 |
| 抗体孵育 | 抗体选择，抗体稀释倍数优化 |
| 底物孵育 | 恰当的发光或显色底物 |
| 曝光 | 曝光时间掌控，X-光片，显影定影试剂 |
| 后 Western Blot 选择 | 抗体剥离缓冲液（蛋白印迹膜再生液），底片背景去除剂 |



2 Western Blot 基本流程



2.1 蛋白样品的提取

2.1.1 通过有机溶剂或水溶法制备总蛋白

水溶液提取法：针对水、稀盐、稀酸或碱溶液中的蛋白质。稀盐和缓冲系统的水溶液对蛋白质稳定性好、溶解度大、是提取蛋白质最常用的溶剂。

有机溶剂提取法：对于分子中非极性侧链较多的蛋白质可用有机溶剂提取，包括乙醇、丙酮和丁醇等。

2.1.2 通过层析或电洗脱法制备目的蛋白

2.1.3 裂解液的选择

根据检测蛋白位置选择合适的裂解液

| 蛋白位置 | 推荐裂解液 |
|-------------|------------------|
| 全细胞 | NP-40 或 RIPA |
| 胞浆 (可溶性蛋白) | Tris-HCl |
| 胞浆 (骨架结合蛋白) | Tris-Triton |
| 膜蛋白 | NP-40 or RIPA |
| 核蛋白 | RIPA or 核蛋白提取试剂盒 |
| 线粒体蛋白 | RIPA or 线粒体分离试剂盒 |

2.2 蛋白样品的定量

目前常用比色法测定样品蛋白的含量：Bradford 法（考马斯亮蓝法）、Lowry 法（Folin-酚试剂法）、BCA 法等。但各有优缺点，大家可以根据具体情况选取。按相应蛋白质定量试剂盒操作说明操作，测定样品浓度。

收集完蛋白样品后，为确保每个蛋白样品的上样量一致，需要测定每个蛋白样品的蛋白浓度。根据所使用的裂解液的不同，需要采用适当的蛋白浓度测定方法。因为不同的蛋白浓度测定方法对于一些去垢剂和还原剂等的兼容性差别很大，大家可以根据具体情况选取。

**Bradford 法（考马斯亮蓝法）：**

考马斯亮蓝 G-250 有红、蓝两种不同颜色的形式，在一定浓度的乙醇和酸性条件下，可配成淡红色的溶液，与蛋白结合后形成蓝色化合物，该化合物在 595 nm 处有最大吸收值，化合物颜色深浅与蛋白的浓度高低成正比。

该法操作简便迅速，消耗样品量少，但不同蛋白质之间差异大，且标准曲线线性差。高浓度的 Tris、EDTA、尿素、甘油、蔗糖、丙酮、硫酸铵和去污剂对测定有干扰。缓冲液浓度过高时，改变测定液 pH 值会影响显色。

Lowry 法（Folin-酚试剂法）：

福林-酚试剂（**Folin-phenol reagent**）的显色原理是：首先在碱性条件下蛋白质与铜作用生成蛋白质-铜复合物，该复合物随之将磷钼酸-磷钨酸还原成蓝色复合物。在一定条件下，蓝色强度与蛋白质量成正比，蛋白质浓度范围约在 25~250 μg/mL。

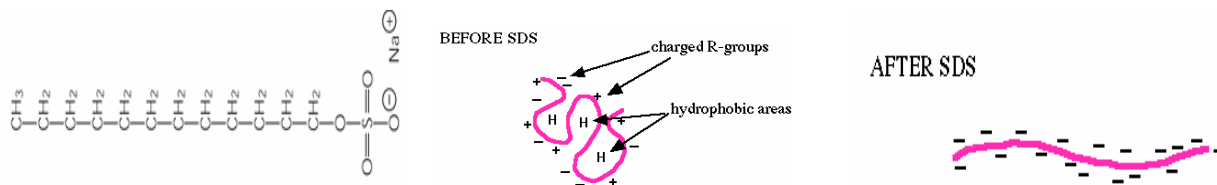
虽然该法是测定蛋白质浓度应用最广泛的方法之一，但其缺点也很明显，专一性较差，干扰物质多（如 Tris 缓冲剂、蔗糖、硫酸铵、巯基化物、酚类、柠檬酸等），标准曲线的直线关系不特别严格。因此在其应用过程中有很多新的修正。

BCA 法（二喹啉甲酸法）：

二喹啉甲酸(Bicinchoninic acid, BCA)法是Lowry测定法的一种改进方法，是近来广为应用的蛋白定量方法。其原理与Lowery法蛋白定量相似，即在碱性条件下蛋白质分子中的肽键能与Cu²⁺络合生成络合物，同时将Cu²⁺还原成Cu⁺。二喹啉甲酸及其钠盐是一种溶于水的化合物，在碱性条件下，可以和Cu⁺结合形成稳定的紫蓝色复合物，在 562 nm处有高的光吸收值，并且化合物颜色的深浅与蛋白质浓度成正比，据此可测定蛋白质浓度。

与 Lowery 法相比，BCA 蛋白测定方法操作更简单，试剂及其形成的颜色复合物稳定性更好，几乎没有干扰物质的影响，灵敏度高（微量检测可达到 0.5 μg/ml），应用更加灵活。与 Bradford 法相比，BCA 法的显著优点是不受去垢剂的影响。

BCA 法与 Lowry 法都容易受到蛋白质之间以及去污剂的干扰。Bradford 法敏感度最高，且与一系列干扰 Lowry, BCA 反应的还原剂（如 DTT, 巯基乙醇）相容。但是对于去污剂依然是敏感的，其最主要的缺点是不同的标准品会导致同一样品的结果差异较大，无可比性。

2.3 蛋白样品的变性**SDS:**

阴离子去污剂、变性剂；

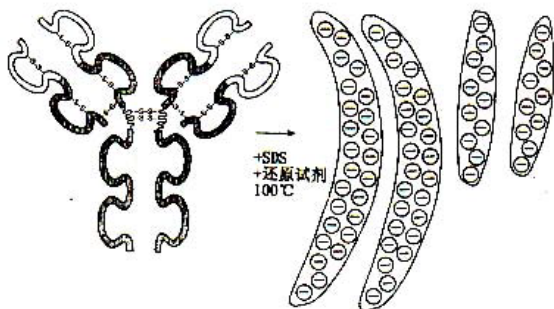
氨基酸侧链与 SDS 充分结合形成带负电荷的蛋白质-SDS 胶束；

蛋白质-SDS 胶束所带的负电荷大大超过了蛋白质分子原有的电荷量，消除了不同分子之间原有的电荷差异；

与强还原剂一起使蛋白分子氢键、疏水键打开，使蛋白质分子线性化。



蛋白质-SDS 胶束的特点:



- 具有相同的形状，形状像一个长椭圆棒；
- 平均 1 g 蛋白质结合 1.4 g SDS；
- 短轴对不同的蛋白质亚基-SDS 胶束基本上是相同的；
- 长轴的长度则与亚基分子量的大小成正比。

2.4 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

2.4.1 SDS-PAGE 基本原理

1. SDS-PAGE 是在蛋白质样品中加入 SDS 和含有巯基乙醇的样品处理液，SDS 是一种很强的阴离子表面活性剂，它可以断开分子内和分子间的氢键，破坏蛋白质分子的二级和三级结构。
2. 强还原剂巯基乙醇（或二硫苏糖醇，DTT）可以断开二硫键破坏蛋白质的四级结构。使蛋白质分子被解聚成肽链形成单链分子。解聚后的侧链与 SDS 充分结合形成带负电荷的蛋白质-SDS 复合物。
3. 蛋白质分子结合 SDS 阴离子后，所带负电荷的量远远超过了它原有的净电荷，从而消除了不同种蛋白质之间所带净电荷的差异。蛋白质的电泳迁移率主要决定于亚基的相对分子质量，而与其所带电荷的性质无关。

2.4.2 PAGE: 聚丙烯酰胺凝胶

聚丙烯酰胺凝胶 (polyacrylamide gel) 是由单体丙烯酰胺 (acrylamide, 简称Acr) 和交联剂 (crosslinker)N,N'-亚甲基双丙烯酰胺(N,N'-methylenebisacrylamide, 简称 Bis) 在催化剂 (过硫酸胺或核黄素 AP) 和加速剂 (四甲基乙二胺 TEMED) 作用下聚合交联而成的三维网状结构的凝胶。化学惰性强，具有一定的机械强度和透明度。是良好的电泳介质。

聚丙烯酰胺凝胶聚合机理是通过提供氧游离基 (free radicals) 的催化，使体系发生氧化还原作用 (catalyst-redox systems)来完成的。催化体系主要有化学催化 (AP-TEMED) 和光化学催化 (核黄素-TMED) 体系。

凝胶浓度与蛋白分离范围

| 凝胶浓度 (%) | 线性分离范围 (kDa) |
|----------|--------------|
| 15 | 10-43 |
| 12 | 12-60 |
| 10 | 20-80 |
| 8.0 | 36-94 |
| 6.0 | 57-212 |



SDS-PAGE 浓缩胶（5% Acrylamide）及分离胶配方表

| 各种组分名称 | 各种凝胶体积所对应各种组分的取用量 | | | | | | | |
|-----------------------|-------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| | 5ml | 10ml | 15ml | 20ml | 25ml | 30ml | 40ml | 50ml |
| 6% Gel | | | | | | | | |
| H ₂ O | 2.6 | 5.3 | 7.9 | 10.6 | 13.2 | 15.9 | 21.2 | 26.5 |
| 30%Acrylamide | 1.0 | 2.0 | 3.0 | 4.0 | 5.0 | 6.0 | 8.0 | 10.0 |
| 1.5M Tris-HCl (PH8.8) | 1.3 | 2.5 | 3.8 | 5.0 | 6.3 | 7.5 | 10.0 | 12.5 |
| 10% SDS | 0.05 | 0.1 | 0.15 | 0.2 | 0.25 | 0.3 | 0.4 | 0.5 |
| 10% 过硫酸铵 | 0.05 | 0.1 | 0.15 | 0.2 | 0.25 | 0.3 | 0.4 | 0.5 |
| TEMED | 0.004 | 0.008 | 0.012 | 0.016 | 0.02 | 0.024 | 0.032 | 0.04 |
| 8% Gel | | | | | | | | |
| H ₂ O | 2.3 | 4.6 | 6.9 | 9.3 | 11.5 | 13.9 | 18.5 | 23.2 |
| 30%Acrylamide | 1.3 | 2.7 | 4.0 | 5.3 | 6.7 | 8.0 | 10.7 | 13.3 |
| 1.5M Tris-HCl (PH8.8) | 1.3 | 2.5 | 3.8 | 5.0 | 6.3 | 7.5 | 10.0 | 12.5 |
| 10% SDS | 0.05 | 0.1 | 0.15 | 0.2 | 0.25 | 0.3 | 0.4 | 0.5 |
| 10% 过硫酸铵 | 0.05 | 0.1 | 0.15 | 0.2 | 0.25 | 0.3 | 0.4 | 0.5 |
| TEMED | 0.003 | 0.005 | 0.009 | 0.012 | 0.015 | 0.018 | 0.024 | 0.03 |
| 10% Gel | | | | | | | | |
| H ₂ O | 1.9 | 4.0 | 5.9 | 7.9 | 9.9 | 11.9 | 15.9 | 19.8 |
| 30%Acrylamide | 1.7 | 3.3 | 2.0 | 6.7 | 8.3 | 10.0 | 13.3 | 16.7 |
| 1.5M Tris-HCl (PH8.8) | 1.3 | 2.5 | 3.8 | 5.0 | 6.3 | 7.5 | 10.0 | 12.5 |
| 10% SDS | 0.05 | 0.1 | 0.15 | 0.2 | 0.25 | 0.3 | 0.4 | 0.5 |
| 10% 过硫酸铵 | 0.05 | 0.1 | 0.15 | 0.2 | 0.25 | 0.3 | 0.4 | 0.5 |
| TEMED | 0.002 | 0.004 | 0.006 | 0.008 | 0.01 | 0.012 | 0.016 | 0.02 |
| 12% Gel | | | | | | | | |
| H ₂ O | 1.6 | 3.3 | 4.9 | 6.6 | 8.2 | 9.9 | 13.2 | 16.5 |
| 30%Acrylamide | 2.0 | 4.0 | 6.0 | 8.0 | 10.0 | 12.0 | 16.0 | 20.0 |
| 1.5M Tris-HCl (PH8.8) | 1.3 | 2.5 | 3.8 | 5.0 | 6.3 | 7.5 | 10.0 | 12.5 |
| 10% SDS | 0.05 | 0.1 | 0.15 | 0.2 | 0.25 | 0.3 | 0.4 | 0.5 |
| 10% 过硫酸铵 | 0.05 | 0.1 | 0.15 | 0.2 | 0.25 | 0.3 | 0.4 | 0.5 |
| TEMED | 0.002 | 0.004 | 0.006 | 0.008 | 0.01 | 0.012 | 0.016 | 0.02 |
| 15% Gel | | | | | | | | |
| H ₂ O | 1.1 | 2.3 | 3.4 | 4.5 | 5.7 | 6.9 | 9.2 | 11.5 |
| 30%Acrylamide | 2.5 | 5.0 | 7.5 | 10.0 | 12.5 | 15.0 | 20.0 | 25.0 |
| 1.5M Tris-HCl (PH8.8) | 1.3 | 2.5 | 3.8 | 5.0 | 6.3 | 7.5 | 10.0 | 12.5 |
| 10% SDS | 0.05 | 0.1 | 0.15 | 0.2 | 0.25 | 0.3 | 0.4 | 0.5 |
| 10% 过硫酸铵 | 0.05 | 0.1 | 0.15 | 0.2 | 0.25 | 0.3 | 0.4 | 0.5 |
| TEMED | 0.002 | 0.004 | 0.006 | 0.008 | 0.01 | 0.012 | 0.016 | 0.02 |

2.4.3 聚丙烯酰胺凝胶分类

PAGE 分为连续系统和不连续系统两大类。连续系统电泳体系中缓冲液 pH 值与凝胶中的相同。带电颗粒在电场作用下，主要靠电荷和分子筛效应。不连续系统中带电颗粒在电场中泳动不仅有电荷效应、分子筛效应，还具有浓缩效应，因而其分离条带清晰度及分辨率均较前者佳。

不连续电泳

| | 作用 | 缓冲液 PH | 凝胶浓度 |
|-----|---------|----------------|-----------|
| 浓缩胶 | 使蛋白样品浓缩 | pH6.8 Tris-HCl | 低, 2-5% |
| 分离胶 | 使蛋白样品分离 | pH8.8 Tris-HCl | 高, 根据蛋白大小 |

不连续系统的浓缩效应:

凝胶层的不连续性: 浓缩胶的孔径大, 分离胶的孔径小。在电场的作用下, 蛋白质颗粒在大孔胶中遇到的阻力小, 移动快。而在小孔胶中遇到的阻力大, 移动慢。因此, 在两层凝胶的交界处, 由于凝胶孔径的不连续性使样品迁移受阻而压缩成很窄的区带。

缓冲液离子成分和pH的不连续性: HCl易解离出Cl⁻, 它在电场中迁移率大, 走在最前面, 故称为快离子或前导离子。电极缓冲液中的甘氨酸在pH6.8 的缓冲液中解离度很小, 仅为 0.1-1%, 因而在电场中迁移率很小, 称为慢离子或尾随离子。蛋白质均带负电荷, 在电场中均移向正极, 其有效迁移率介于快慢离子之间, 于是蛋白质就在快慢离子间形成的界面处, 被浓缩成极窄的区带。当进入pH8.8 的分离胶时, 甘氨酸解离度增加, 其有效迁移率超过蛋白质, 因此氯离子和甘氨酸离子沿着离子界面继续前进。蛋白质分子由于分子量大, 被留在后面, 然后分离成多个区带。



2.5 转膜 (Transmembran)

2.5.1 转膜的定义

将电泳后分离的蛋白质从凝胶中转移到固相载体（例如 NC 膜）上，通常有两种方法：毛细管印迹法和电泳印迹法。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。前者操作容易，转移效率高；而后者适用于大胶的蛋白转移，所用缓冲液少。

2.5.2 转移膜的选择

杂交膜的选择是决定 Western blot 成败的重要环节。应根据杂交方案、被转移蛋白的特性以及分子大小等因素，选择合适材质、孔径和规格的杂交膜。用于 Western blot 的膜主要有两种：硝酸纤维素膜（NC）和 PVDF 膜。NC 膜是蛋白印迹实验的标准固相支持物，在低离子转移缓冲液的环境下，大多数带负电荷的蛋白质会与膜发生疏水作用而高亲和力的结合在一起，但在非离子型的去污剂作用下，结合的蛋白还可以被洗脱下来。根据被转移的蛋白分子量大小，选择不同孔径的 NC 膜。因为随着膜孔径的不断减小，膜对低分子量蛋白的结合就越牢固。通常用 0.45 μm 和 0.2 μm 两种规格的 NC 膜。大于 20 kD 的蛋白可用 0.45 μm 的膜，小于 20 kD 的蛋白就要用 0.2 μm 的膜了，如用 0.45 μm 的膜就会发生“Blowthrough”的现象。PVDF 膜灵敏度、分辨率和蛋白亲和力比常规的膜要高，非常适合于低分子量蛋白的检测。但 PVDF 膜在使用之前必需用纯甲醇浸泡饱和1-5秒钟。

最常用于 Western Blot 的转移膜主要是硝酸纤维素（Nitrocellulose, NC）膜和聚偏二氟乙烯（Polyvinylidene Fluoride, PVDF）膜，此外也有用尼龙膜、DEAE 纤维素膜做蛋白印迹。尼龙膜和 NC 膜的特点相似，主要用于核酸杂交。

硝酸纤维素（nitrocellulose, NC）膜：NC 与蛋白质靠疏水作用结合，无需预先活化，对蛋白质的活性影响小；非特异性本底显色浅；价格低廉，使用方便。但结合在 NC 上的小分子蛋白质在洗涤时易丢失；NC 韧性较差，易损坏。

聚偏二氟乙烯(Polyvinylidene fluoride, PVDF)膜：与蛋白质亲和力高，用前需在甲醇中浸泡，以活化膜上的正电基团，使其更容易与带负电荷蛋白结合。

膜的选择主要根据：

膜与目的蛋白分子的结合能力（也就是单位面积的膜能结合蛋白的载量），以及膜的孔径（也就是拦截蛋白的大小）；

不影响后续的显色检测（也就是适和用于所选的显色方法，信噪比好）；

如果后继实验有其他要求，比如要做蛋白测序或者质谱分析，还要根据不同目的来挑选不同的转移膜。

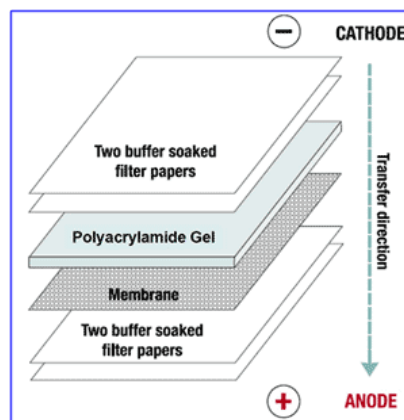
几种膜的性质对比

| | PVDF 膜 | NC 膜 | 尼龙膜 |
|--------|-----------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| 背景 | 低 | 低 | 较高 |
| 蛋白结合能力 | 100-200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ | 80-100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ | >400 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ |
| 机械强度 | 强 | 干的膜很脆 | 软而结实 |
| 溶剂抗性 | 强 | 差 | 差 |
| 使用前处理 | 甲醇润湿 | 缓冲液润湿 | 缓冲液润湿 |
| 价格 | 高 | 较低 | 低 |



2.5.3 转膜步骤（以槽式湿转为例）

1. 将胶浸于转移缓冲液中平衡 10 min。
注意：如检测小分子蛋白，可省略此步，因小分子蛋白容易扩散出胶。
2. 依据胶的大小剪取膜和滤纸 6 片，放入转移缓冲液中平衡 10 min。如用 PVDF 膜需用纯甲醇浸泡饱和 3-5 秒钟。
3. 装配转移三明治：海绵/3 层滤纸/胶/膜/3 层滤纸/海绵，每层放好后，用试管赶去气泡。
切记：胶放于负极面（黑色面）。
4. 将转移槽置于冰浴中，放入三明治（黑色面对黑色面），加转移缓冲液，插上电极，100 V，1 h（电流约为 0.3 A）。
注意：应再次检查三明治和电极是否装配正确，电源是否接通。
5. 转膜结束后，切断电源，取出杂交膜。



2.5.4 转膜注意事项

1. 泡膜：转膜之前将海绵、胶、膜都用预冷的转移 buffer 浸泡 20min；
 - a. 凝胶若是没在预冷的转膜 buffer 中浸泡，就会在转膜过程中出现凝胶皱缩，导致出现转移条带变形。
 - b. PVDF 膜具有疏水性，需用甲醇浸泡。
2. 转膜顺序：阴极碳板+海绵+三滤+胶+膜+三滤+海绵+阳极碳板；
3. 转膜条件：0.35 A/250 V/1 h/40 min/冰浴中进行转膜（转膜过程产生大量的热，注意冷却）；
（具体转膜时间要根据目的蛋白的大小而定；目的蛋白的分子量越大，需要的转膜时间越长，反之则短。）
4. 其它注意事项：
 - a. 避免直接用手碰杂交膜，使用镊子。因为手上的蛋白和油脂会影响转膜效率并会使膜脏掉。
 - b. 夹好膜和凝胶后，确定在凝胶/膜和滤纸之间没有气泡存在，否则会导致转膜不完全。
 - c. 保证膜和滤纸的大小和凝胶完全一样，过大和过小都会影响转膜效率。
 - d. 鸡来源的抗体与 PVDF 和尼龙膜有较强的结合能力，从而产生较高的背景，故如果选择鸡来源的抗体



最好使用硝酸纤维素膜（NC 膜）。

2.5.5 转膜后检测（此步可以省略）

转膜完毕后，立即把蛋白膜放置到预先准备好的 TBST（或 PBST）中漂洗 1-2 分钟，以洗去膜上的转膜液。转膜的效果可以观察所使用的预染蛋白质分子量标准，通常分子量最大的 1-2 条带较难全部转到膜上。转膜的效果也可以用丽春红染色液或硬度墨汁染色液对膜进行染色，以观察实际的转膜效果。也可以用考马斯亮蓝快速染色液对完成转膜的 SDS-PAGE 胶进行染色，以观察蛋白的残留情况。

a. 丽春红染色：蛋白带出现后，于室温用去离子水漂洗硝酸纤维素滤膜，换水几次。

b. 印度墨汁染色：只用于放射性标记抗体或放射性标记 A 蛋白探针的 Western 印迹过程。

印度墨汁不能和化学发光物合用，若是使用呈色反应的酶检测法时，印度墨汁的黑色会使凝胶难于拍照。这时，可改用其他检测方法或换用丽春红 S。

注意：从转膜完毕后所有的步骤，一定要注意膜的保湿，避免膜的干燥，否则极易产生较高的背景。

2.6 封闭（Blocking）

杂交膜上有很多非特异性的蛋白质结合位点，为防止这些位点与抗体结合引起非特异的染色和背景，一般用惰性蛋白质或非离子去污剂封闭膜上的未结合位点来降低抗体的非特异性结合。封闭剂应该封闭所有未结合位点而不替换膜上的靶蛋白、不结合靶蛋白的表位，也不与抗体或检测试剂有交叉反应。最常见的封闭剂是 BSA、脱脂奶粉、酪蛋白、明胶和 Tween-20（0.05 - 0.1%）稀溶液 PBST 或者 TBST。

5%脱脂奶粉或 BSA（室温孵育 1 h）

Western Blot 膜封闭液（弗德生物）

Tween-20 的作用：Tween-20 是一种非离子型去污剂，有复性抗原的作用，可提高特异性的识别能力。在做 western blot 时，用惰性蛋白质或非离子去污剂封闭膜上的未结合位点可以降低抗体的非特异性结合。Tween 这种非离子型去污剂在乳化蛋白时，不破坏蛋白的结构，可减少对蛋白质之间原有的相互作用的破坏。离子型去污剂如 SDS 则破坏蛋白的结构。

封闭剂选择的特殊情况：

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，因为脱脂奶粉含有糖蛋白和生物素。

如果封闭剂中含磷酸酶，用磷酸化特异性抗体分析磷酸化蛋白受到影响，因为磷酸酶与印记膜上的磷酸化蛋白接触可使之去磷酸化。

检测磷酸化抗体时，不能使用酪蛋白/脱脂奶粉作为封闭剂。

一般封闭条件为：

室温或者 37℃ 缓慢摇荡 1~2 h，特殊情况也可 4℃ 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。

2.7 一抗、二抗孵育(Antibody incubation)

2.7.1 一抗孵育(Primary antibody incubation)

参考一抗的说明书，按照适当比例用封闭液稀释一抗。

吸尽封闭液后，立即加入稀释好的一抗，室温或 4℃ 在摇床上缓慢摇动孵育 1~2 小时。如果一抗孵育一小时效果不佳，可以在 4℃ 缓慢摇动孵育过夜。（注意：抗体浓度过高会导致背景较深，过低会导致和抗原结合不充分，出现假阴性）。

回收一抗。然后加入 Western 洗涤液，在摇床上缓慢摇动洗涤 5-10 分钟。吸尽洗涤液后，再加入洗涤液，洗涤 5-10 分钟。共洗涤 3 次。如果结果背景较高可以适当延长洗涤时间并增加洗涤次数。



2.7.2 二抗孵育(Secondary antibody incubation)

参考二抗的说明书，按照适当比例用封闭液稀释辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗。

吸尽洗涤液后，立即加入稀释好的二抗，室温或 4℃在摇床上缓慢摇动孵育 1~2 小时。回收二抗。然后加入 Western 洗涤液，在摇床上缓慢摇动洗涤 5-10 分钟。吸尽洗涤液后，再加入洗涤液，洗涤 5-10 分钟。共洗涤 3 次。如果结果背景较高可以适当延长洗涤时间并增加洗涤次数。

前 2 步洗涤是为了洗去一抗和二抗的非特异性结合，洗涤的效果直接影响结果背景的深浅，所以洗涤一定要干净。洗涤液使用 TBST 或者 PBST，其中的 Tween20 有助于去除非特异性的结合，减少背景。同时短时间多次的洗膜（如 5-6 次，每次 3 分钟）比长时间少次数的洗膜更有效。

第 3 步 TBS 洗涤是为了洗去膜上的 Tween-20，因为它可以阻碍底物的沉积。

2.7.3 注意事项

1. 抗体保存注意事项：

收到抗体后按要求离心后再打开管盖进行分装和保存！

对于大部分抗体，比较合适的保存方式是分装后保存在-20℃。

分装的量以一次实验用完为好，最少不能少于 10 ul 每份。因为分装体积越小，抗体的浓度越可能会受到蒸发以及管壁吸附的影响。

复融后的分装抗体如果一次用不完，将剩余母液保存在 40℃，避免再冻起来！

绝对避免将抗体保存在自动除霜冰箱中。

大部分抗体收到后 40℃短暂保存 1-2 周对抗体活性是没有影响的。

长期保存，加入叠氮钠，防止细菌污染。

2. 一抗/二抗使用问题：

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。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。

3. 天然和非还原样品问题：

有些抗体只能识别的表位是非连续氨基酸，这些氨基酸虽然在蛋白质一级结构中彼此不连续，但是在空间结构中则是靠在一起的。这些抗体就只能识别靶蛋白的空间结构状态（抗体说明书中会有特殊说明）。对于这些样品，缓冲液和凝胶中就不能含有 SDS，并且不能够对蛋白进行加热变性。

有些抗体只能识别蛋白的非还原状态如氧化状态，对此类样品，就需要将缓冲液和凝胶中的还原剂 DTT 和 beta-巯基乙醇去除。

2.8 蛋白检测 (Detection of proteins) ——显影

酶促反应比同位素安全且快速，已经成为 Western Blot 的主流检测方法。酶促反应可以搭配不同的底物从而实现不同的显色方法：化学发光和底物显色，前者灵敏度很高，已经达到皮克级别，甚至还有飞克级别的，灵敏度超过了同位素；而后者由于直接显色而操作简便且成本低。

大家最为熟悉熟悉当数辣根过氧化物酶 HRP (Horseradish Peroxidase) 和碱性磷酸酶 AP (Alkaline Phosphatase)，此外还有比较少见的葡萄糖氧化酶 (Glucose Oxidase) 和 β 半乳糖苷酶 (β -Galactosidase)。

在酶连抗体中使用的酶通常是碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶。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以 H_2O_2 为底物，将 3-氨基-9-乙基吲哚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 H_2O_2 存在下，氧化化学发光物质鲁米诺 (luminol, 氨基苯二酰一胍) 并发光，在化学增强剂存在下光强度可以增大 1000 倍，通过将印迹放在照相底片上感光就可以检测辣根过氧化物酶的存在。



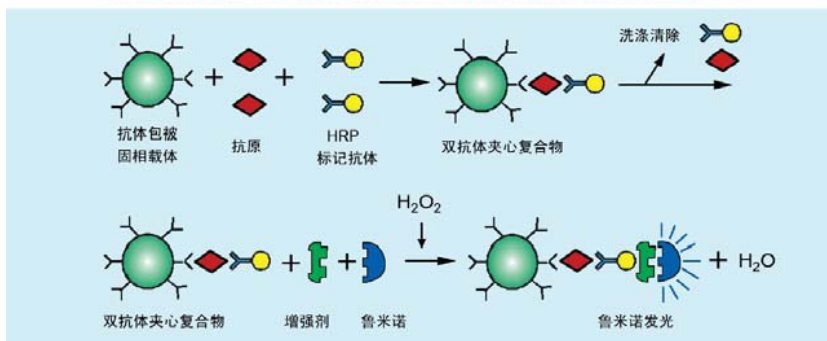
- ① HRP 标记二抗用 DAB 显色，按顺序依次将 DAB 三种剂各取 3 滴于 5 ml 蒸馏水中，避光混匀，将膜加入显色液中避光显色 5-15min 终止反应，对照 Marker 记录实验结果，将 NC 膜晾干扫描保存。HRP 的生色底物显色有 DAB、4-CN、CN/DAB、AEC 和 TMB 等。

HRP 的生色底物

| 底物 | DAB | 4-CN | AEC | TMB |
|-------|---|---------------------------------|-------------------------|------------------------------|
| 学名 | 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride | 4-chloro-1-naphthol | 3-amino-9-ethylcarbazol | 3,3,5,5-tetramethylbenzidine |
| 分子量 | 214.14 | 178.58 | 210.28 | 240.4 |
| 稳定性 | 好 | 一般 | 避光 | 好 |
| 灵敏度 | 250 pg | 1 ng | 1 ng | 100 pg |
| 背景 | 一般 | 低 | 高 | 高 |
| 产物成像性 | 不能很好的成像 | 容易成像 | 容易成像 | 容易成像 |
| 颜色 | 褐色 | 介于蓝色与蓝紫色之间（可用于 double-staining） | 棕红色 | 蓝紫色 |
| 毒性 | 有致癌作用 | 无 | 有 | 无 |

HRP 化学发光反应底物主要有 Luminol、ECL 和 SuperSignal 系列。可直接从公司购买试剂盒，操作比较简单，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。

辣根过氧化物酶标记化学发光免疫分析（双抗体夹心法）示意图



- ② AP显色底物生成的产物主要是蓝紫色，成像性好容易拍照。AP的底物显然更稳定，不像HRP那样需要新鲜配制的 H_2O_2 一类的不稳定成分，作为试剂盒可以保存时间更长。常用显色底物的是 BCIP(5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate p-Toluidine Salt)，NBT (Nitro-Blue Tetrazolium Chloride)和INT。
- 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。（注意：发光法检测的时候曝光时间要恰到好处，过短会导致曝光不彻底，影响条带亮度，过长会导致荧光信号衰弱，也会使背景颜色加深）

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。



关于磷酸化蛋白检测的注意事项：

- ① 保持待测蛋白处于磷酸化状态，在标本提取液中加入足够的磷酸酶抑制剂（NaF，可以防止去磷酸化），并将标本时刻保持在冰浴中。
- ② 使用 5%的 BSA 作为封闭试剂，不能使用脱脂奶粉（因为脱脂奶粉中含有酪蛋白，会出现很高的背景）。
- ③ 请谨记蛋白的磷酸化是需要诱导的，当信号低或者无信号时有可能是磷酸化诱导不充分！确保使用阳性对照。

2.9 结果分析 (Result Analysis)

2.9.1 对照设计

成功进行 Western Blot 检测，设置合适正确的对照是必不可少的，只要正确设置了这些对照，即可快速和准确的找到 Western Blot 的问题所在，并保证实验结果的准确性和特异性！

一般需要设置的对照如下：

- 阳性对照：明确表达检测蛋白的组织或细胞，用于检测抗体的工作效率；
- 阴性对照：明确不表达检测蛋白组织或细胞，用于检测抗体的特异性；
- 二抗对照：不加一抗，用于检测二抗的特异性；
- 内参对照：检测标本的质量和二抗系统；
- 空白对照：不加一抗和二抗；用于检测膜的性质和封闭的效果。

2.9.2 内参

内参即是内部参照，对于哺乳动物细胞表达来说一般是指由管家基因编码表达的蛋白，它们在各组织和细胞中的表达相对恒定，在检测蛋白的表达水平变化时常用它来做参照物。

在 Western Blot 中使用内参其实就是在 WB 过程中另外用内参对应的抗体检测内参，这样在检测目的产物的同时可以检测内参的表达，由于内参在各组织和细胞中的表达相对恒定，借助检测每个样品内参的量就可以用于校正蛋白质定量、上样过程中存在的实验误差，保证实验结果的准确性。此外使用内参可以作为空白对照，检测蛋白转膜情况是否完全、整个 Western Blot 显色或者发光体系是否正常。

常用的蛋白质内参有 GAPDH 和细胞骨架蛋白 beta-actin 或 beta-tubulin。一般要选择一个在处理因素作用的条件下蛋白含量不会发生改变的蛋白作内参。

常用内参

| 内参名称 | 分子量大小 | 适用范围 |
|------------|-----------|--------|
| Beta-actin | 43 kDa | 胞浆和全细胞 |
| GAPDH | 30-40 kDa | 胞浆和全细胞 |
| Tubulin | 55 kDa | 胞浆和全细胞 |
| VCD1/Porin | 31 kDa | 线粒体 |
| COXIV | 16 kDa | 线粒体 |
| Lamin B1 | 66 kDa | 细胞核 |
| TBP | 38 kDa | 细胞核 |

2.10 膜的重复利用(Membrane recovery)

2.10.1 膜解吸的方法

1. 通过加热和去污剂进行解吸，原理：组合使用去污剂和加热使抗体解离，适用于任何化学发光底物系统。



2. 酸解吸，原理：使用低 pH 改变抗体结构从而使结合位点失活，从而将抗体与抗原分离，适用于任何化学发光底物系统。

两种方法都不能去除由显色检测系统产生的有色沉淀物（例如 BCIP、4-CN、DAB 和 TMB）。然而，仍可以用针对不同靶蛋白的特异性抗体分析印迹膜。

重要提示：在各次免疫检测之间不应使印迹膜干燥。印迹膜干燥将会使任何剩余抗体与膜永久性结合。

2.10.2 方法步骤

1. 通过加热和去污剂进行解吸：

仪器和溶液：

解吸液：100 mM 2-巯基乙醇，2% (w/v) SDS，62.5 mM Tris-HCl，pH6.7

磷酸盐缓冲液 (PBS)：10 mM 磷酸钠，pH7.2，0.9% (w/v) NaCl

浅托盘，大小足以将膜放入其中。

操作：

- 在通风橱中，将印迹膜放入解吸液中在 50℃ 下振摇 30 分钟。
- 将印迹膜放入缓冲液中振摇 10 分钟。用新缓冲液重复漂洗两次。
- (可选) 重复起始检测方法 (忽略一抗步骤)，确保已灭活抗体或已从膜上解吸抗体。
- 将印迹膜放入缓冲液中振摇 10 分钟。
- 继续下一轮检测的封闭步骤。

2. 酸解吸

仪器和溶液：

解吸液：25 mM 甘氨酸-HCl，pH2，1% (w/v) SDS

磷酸盐缓冲液 (PBS)：10 mM 磷酸钠，pH7.2，0.9% (w/v) NaCl

浅托盘，大小足以将膜放入其中。

操作：

- 将印迹膜放入解吸液中振摇 30 分钟。
- 将印迹膜放入缓冲液中振摇 10 分钟。用新缓冲液重复漂洗。
- 继续下一轮检测的封闭步骤。

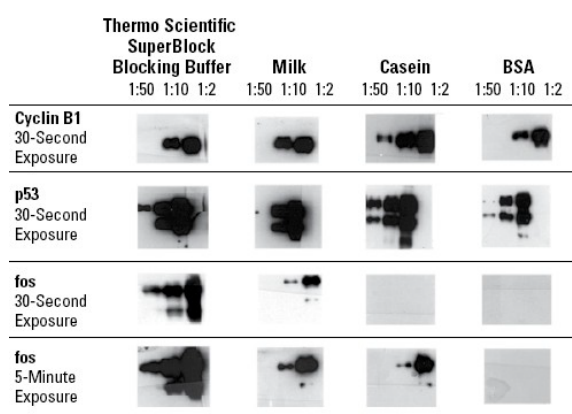
3 Western Blot 常见问题分析

3.1 封闭液的选择

封闭液如何选择

WB 用的最适封闭液往往具有系统依赖性。决定合适的封闭液可能增加系统的信号信噪比。有时，从一个底物转换到另一个底物时，所用的封闭液会使信号减少或增加背景。对系统进行不同封闭液的尝试可能达到最好的结果。避免使用牛奶做封闭试剂，依赖其抗生素蛋白，因为牛奶含有很多生物素。尽管超级封闭液会有很好的效果，但我们还是建议在一个特定系统中尝试用几种封闭试剂，因为没有一种最优封闭试剂适合所有系统。

为确定非特异性位点的最优封闭条件，对几种蛋白进行了、免疫印迹分析 (Figure 1)，对印迹结果进行分析和噪度对比。结果显示没有一种最优封闭试剂适合所有系统。





3.2 一抗的选择

一抗如何选择

免疫印迹中一抗的选择取决于被检测抗原和能识别抗原的抗体。市场上销售的一抗有很多种，都可以通过查找站点快速查找识别（如www.antibodyresource.com 或 www.linscottsdirectory.com）。另外，也可制备能识别感兴趣抗原的一抗。多克隆抗体和单克隆抗体都在免疫印迹中都能应用，多克隆抗体相对便宜，制备时间较短，而且对抗原都具有很高的亲和力。单克隆抗体以其特异性强、纯度高、浓度高及产生的背景低占优势。粗制抗体例如血清或腹水有时也用于免疫印迹，但是其中的杂质会增加背景。为了获得强特异性的抗体，可以用固定抗原进行亲和纯化。

Western Blotting 的抗体溶液往往要将1 mg/ml的原液稀释1/100- 1/500000。每个检测系统的最佳抗体浓度都需要实验确定。较敏感的检测系统需要少量抗体，从而降低抗体成本，并且可以用有限的供应量进行更多的实验。另外，因为亲和力高，抗体量少，产生的背景也少。抗体稀释液通常是包含封闭试剂的洗脱液，抗体稀释液中少量的封闭试剂和去垢剂往往有利于最大限度的减少背景。在免疫印迹中使用的标记二抗包括生物素、荧光素、罗丹明、DyLight 染料、辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶。

3.3 优化抗原和抗体浓度的斑点杂交方法

斑点杂交方法——优化抗原和抗体浓度

对于一个给定的抗原，最佳的抗体浓度依赖的抗原和抗体本身。抗原和抗体的亲和力，以及一抗与二抗的特异反应都是不同的。最优抗原和抗体浓度可通过免疫印迹实验中使用不同浓度的抗原和抗体作用确定。另外，更快和更简单的方法是进行斑点印迹实验。以下是使用超敏感信号底物进行的斑点印迹的操作方法。
注：所有的抗体稀释度假定起始浓度为 1 mg/mL。

1. 用TBS 和PBS 稀释的蛋白样品，好的稀释方法是由样品中的抗原稀释浓度决定的，但是由于抗原的浓度是未知的，所以有必要进行宽范围的稀释度的检测。SuperSignal West Pic 化学发光底物的检测灵敏度可达皮g 水平，所以样品的稀释范围可以从微克水平到皮克水平。如果要使用过多的抗原，结果会出现以下情况：非特异性条带、模糊条带和信号降低。
2. 准备转印膜。所需膜的数量依赖于被屏蔽的一抗和/或二抗有多少种不同稀释浓度。通常，一种或两种一抗的稀释度是用两种或三种不同的二抗稀释度进行测定的。例如：1/1000 的一抗和1/50000 的二抗；1/1000 的一抗和1/100000 的二抗；1/5000 的一抗和1/50000 的二抗；以及1/5000 和1/100000 的二抗。
3. 将膜放在滤纸上。将抗原稀释液点在膜上。用尽可能小量的稀释液点在膜上（2-5 ul 为宜），因为用的体积越大，信号越弥散。抗原溶液在膜上干10-30 分钟或直至无可见的水分。
4. 用含0.05%的Tween-20 封闭液封闭膜上的非特异性点，室温震荡孵育1 h。
5. 将一抗稀释到封闭液/Tween-20 去污剂中，并加到膜上，室温震荡孵育1h。
6. 用 TBS 或 PBS 洗膜 4-6 次，用尽可能大体积的洗脱液，

在洗脱液中加入0.05%的吐温，用以减少非特异背景。每次洗脱过程中，使膜悬浮在洗脱液中震荡大约5 分钟，倒出洗脱液并重复。孵育前，在洗脱液中短时间的漂洗可能会增加洗脱效率。

7. 制备二抗/HRP 结合的封闭试剂/Tween-20 去垢剂稀释液，将二抗稀释液加到膜上震荡孵育1 h。
8. 按第6 步方法再次清洗膜。
9. 准备底物工作缓冲液，混合等体积的鲁米诺/增强剂和稳定的过氧化物溶液。制备足够体积确保印迹点完全湿润，保证印迹点在孵育过程中不会干。推荐体积：0.1 ml/cm²印迹面。
10. 将膜在超感应显色底物工作液中孵育5 分钟；
11. 将膜从底物上移除，放到塑料布或其它防护膜上；
12. 将印迹贴到胶片上，在蛋白旁边曝光。任何标准的或者增强的放射自显影胶片都可以用。推荐第一次曝光30-60 s，为得到最佳结果，曝光时间可不同。另外，也可用CCD 相机或其它成像设施；然而这些设施可能需要更长的曝光时间。
13. 在最佳的印迹膜上，超感应反应底物产生的信号可能会持续超过8 h。未获得最佳结果，印迹能重复曝光到胶片上或者成像系统中。随印迹时间的延长，需延长曝光时间。如果未得到最佳结果，可用抗原和/或抗体稀释液重复进行这个程序。



3.4 电泳中的问题

| 出现问题 | 原因 |
|----------|--|
| 一条带呈笑脸状 | ● 凝胶不均匀冷却，中间冷却不好；电泳系统温度偏高 |
| 一条带呈皱眉状 | ● 可能是由于装置不合适，特别可能是凝胶和玻璃挡板底部有气泡，或者两边聚合不完全 |
| 拖尾 | ● 样品溶解不好 |
| 纹理（纵向条纹） | ● 样品中含有不溶性颗粒 |
| 条带偏斜 | ● 电极不平衡或者加样位置偏斜 |
| 条带两边扩散 | ● 加样量过多 |

3.5 Western blot 结果中背景高且不均匀

| 可能的原因 | 建议 |
|-----------------------|---|
| 抗体浓度太高 | ● 一抗或二抗浓度太高会导致高背景，降低抗体浓度 |
| 使用的封闭液不兼容 | ● 对比不同的封闭缓冲液 |
| 非特异性位点封闭不足 | ● 优化封闭缓冲液，最好的封闭缓冲液具有系统依赖性 |
| | ● 提高封闭液中蛋白的浓度 |
| | ● 优化封闭时间和/或温度。室温封闭至少 1 h 或者 4° C 封闭过夜 |
| | ● 在封闭液中加入 Tween-20，Tween-20 的终浓度为 0.05% |
| 封闭液中与其它蛋白发生抗体的交叉反应 | ● 换一种不同的封闭液 |
| | ● 不要用含抗生素蛋白的牛奶封闭，牛奶含生物素 |
| | ● 交叉反应的检测。封闭一张干净的膜，与抗体一起孵育，然后用超感应化学发光底物检测 |
| 洗涤不充分，增加洗涤次数和使用缓冲液的体积 | ● 降低 HRP 结合物的浓度 |
| | ● 如果洗涤液中无 Tween-20，添加 Tween-20 使其终浓度为 0.05% |
| 膜的曝光时间过久 | ● 缩短印迹膜曝光到胶片的时间 |
| | ● 按照说明书的指示，保证膜始终是湿润的 |
| | ● 用一张新膜 |
| | ● 保证膜完全被液体覆盖，避免其干燥 |
| | ● 在孵育过程中始终进行震荡 |
| | ● 小心夹膜——损坏膜可能导致非特异性结合 |
| | ● 不能空手持膜，始终带干净手套或用镊子 |
| 缓冲液污染或结块沉淀 | ● 制备新的缓冲液 |
| 抗体浓度太高 | ● 若一抗和/或二抗浓度过高会产生高背景，降低抗体浓度 |
| HRP 处产生聚集体 | ● 用 0.2 μm 过滤器过滤结合物 |
| 结合可产生斑点 | ● 用一种新的高质量的结合物 |
| 缓冲液中有污染 | ● 使用新的缓冲液 |
| | ● 缓冲液使用前过滤 |
| 操作设备被污染 | ● 保证电泳仪器、印迹仪器和孵育用容器清洁，无外缘污染物 |
| | ● 保证在转膜后没有凝胶留在膜上，蛋白可能黏在胶上导致背景 |

**3.6 Western blot 结果中信号弱或无信号**

| 可能的原因 | 建议 |
|----------------|---|
| 蛋白未转到膜上 | <ul style="list-style-type: none"> ● 转膜结束后，用总蛋白染色剂染胶来确定转膜效率。（注：总蛋白染色剂可能检测不到低量的抗原。） ● 确保转膜过程中胶与膜完全接触。 ● 确保转印夹层排布正确 ● 确保按照膜的制造商的使用说明润湿膜 ● 确保转印部件在电印迹过程中未过热 ● 使用正对照和/或分子量Marker ● 优化转印时间和电流 ● 确保样品制备条件优于蛋白印迹，为破坏样品的抗原性。（注意：许多蛋白不能在还原状态下进行） |
| 蛋白未完全结合到膜上 | <ul style="list-style-type: none"> ● 在转膜缓冲液中加入 20%的甲醇促进结合。低分子量的抗原可能会穿过转印膜，需使用小孔径的膜进行。 |
| 抗体不足 | <ul style="list-style-type: none"> ● 增加抗体浓度。抗体与目标蛋白的亲和力可能很小 ● 抗体可能失活，可用斑点印迹检测其活性。 |
| 抗体浓度太高 | <ul style="list-style-type: none"> ● 使用太多一抗或二抗可能导致信号迅速消失，呈现出很弱的信号。 |
| 抗原不足 | <ul style="list-style-type: none"> ● 加入更多的蛋白进行跑胶 ● 抗原被封闭液掩蔽 ● 试用不同的封闭液 ● 优化封闭液中蛋白浓度 |
| 缓冲液中含有叠氮钠 | <ul style="list-style-type: none"> ● 叠氮钠是一种 HRP 的抑制剂，缓冲液不能使用叠氮钠作为防腐剂 |
| 曝光时间太短 | <ul style="list-style-type: none"> ● 延长胶片的曝光时间（注意：超感应化学发光底物会持续发光至少 6 个小时） |
| 底物孵育时间太短 | <ul style="list-style-type: none"> ● 在使用超感应底物时需进行 5 分钟的底物孵育。 |
| 底物失活 | <ul style="list-style-type: none"> ● 超感应化学发光底物和超感应 west 膜室温状态下化学底物可保存至少 12 个月，超感应免疫膜化学发光底物可保存至少 6 个月 ● 为衡量底物的活性，准备一个小量的工作液在一个暗室内，加入少量的 HRP 结合物，会观察到绿光。如果未检测到光，底物或 HRP 结合物均有可能失活 ● 确保两底物无交叉污染两种底物试剂的污染可能导致活性下降 |
| 膜可以修复剥离重新用探针检测 | <ul style="list-style-type: none"> ● 在膜剥离过程中可能会有抗原损失或变性 ● 优化剥离程序 ● 如有必要可重新用探针检测 ● 避免在同一张膜上重复进行探针检测 |
| 在膜上消解抗原 | <ul style="list-style-type: none"> ● 封闭底物可能含有蛋白水解酶活性（如明胶） |
| 印迹膜保存时蛋白降解 | <ul style="list-style-type: none"> ● 准备一张新的印迹膜 |

3.7 Western blot 结果中背景较高

| 可能的原因 | 建议 |
|-----------|---|
| 膜封闭不够 | <ul style="list-style-type: none"> ● 延长封闭的时间；选择更加适合的封闭液 |
| 一抗稀释度不适宜 | <ul style="list-style-type: none"> ● 对抗体进行滴度测试，选择最适宜的抗体稀释度 |
| 一抗孵育的温度偏高 | <ul style="list-style-type: none"> ● 建议 4℃结合过夜 |



| | |
|-------------|-----------------------|
| 选择的膜容易产生高背景 | 一般硝酸纤维素膜的背景会比 PVDF 膜低 |
| 膜在实验过程中干过 | 实验过程中要注意保持膜的湿润 |
| 检测时曝光时间过长 | 减少曝光时间 |

3.8 Western blot 结果中杂带较多

| 可能的原因 | 建议 |
|---|--|
| 目的蛋白有多个修饰位点（磷酸化位点、糖基化位点、乙酰化位点等），本身可以呈现多条带 | ● 查阅文献或进行生物信息学分析，获得蛋白序列的修饰位点信息，通过去修饰确定蛋白实际大小 |
| 目的蛋白有其它剪切本 | ● 查阅文献或生物信息学分析可能性 |
| 样本处理过程中目的蛋白发生降解 | ● 加入蛋白酶抑制剂；样本处理时在冰上操作 |
| 上样量过高，太敏感 | ● 适当减少上样量 |
| 一抗不纯 | ● 纯化抗体 |
| 一抗或者二抗浓度偏高 | ● 降低抗体浓度 |
| 一抗特异性不高 | ● 重新选择或制备高特异性的抗体 |

3.9 Western Blot 结果中无信号或显示信号弱

| 可能的原因 | 建议 |
|-----------------|---|
| 检测样本不表达目的蛋白 | ● 选择表达量高的细胞作为阳性对照，用于确定检测样本是否为阴性 |
| 检测样本低表达目的蛋白 | ● 提高上样量，裂解液中注意加入蛋白酶抑制剂 |
| 转移不完全或过转移 | ● 可以用丽春红染膜并结合染胶（考马斯亮蓝）后确定条带是否转至膜上或转移过头；适当调整转膜的时间和电流 |
| 抗体不能识别测试种属的相关蛋白 | ● 购买抗体前应当认真阅读抗体说明书，确定其是否能够交叉识别测试种属的对应蛋白 |
| 一抗孵育时间不足 | ● 建议 4℃ 结合过夜 |
| 二抗与一抗不匹配 | ● 选择针对一抗来源的种属的抗体 |
| 洗膜过度 | ● 洗膜时间不宜过长，加入的去垢剂不宜过强或过多，建议使用 0.1% 的弱去垢剂 Tween-20 |

3.10 其它现象

| 出现现象 | 产生原因 |
|-------------|---------------------------------|
| 膜上多处出现黑点或黑斑 | ● 抗体与封闭试剂发生非特异性的结合 |
| 反白（条带显白色） | ● 目的蛋白含量太高或者一抗浓度偏高 |
| 蛋白分子量偏低或偏高 | ● 胶浓度不适合，高分子量要用低浓度胶；小分子蛋白要用高浓度胶 |

3.11 安全问题

操作有毒试剂时，带手套和口罩，且操作挥发性试剂应在通风橱中进行。



4 弗德生物 Western Blot 产品汇总

此部分中标注促销价的产品，促销信息截止日期为：**2013年12月31日**（常年特价产品除外）。

凡活动期间累积购买以上蛋白检测类即用型试剂满**2000元**，即送“二抗”一支（**GAM007, GRA007** 任选）或实物礼品“**100元手机充值卡**”一张

4.1 蛋白抽提

| | 产品货号 | 产品名称 | 规格 | 品牌 | 价格(¥) |
|------------|------------------|---------------------|-----------------------|--------------|--------------------|
| 蛋白裂解试剂 | P1010 | PBS磷酸盐缓冲液2L | 2L | FDbio | 8 |
| | P1022 | 1×PBS Solution | 100 ml | FDbio | 20 |
| | P1022 | 10×PBS Solution | 500 ml | FDbio | 90 |
| | D0012 | DNase I | 25 mg /100mg(200U/mg) | FDbio | 108/398 |
| | P0014 | PMSF | 1g/5g/25g | FDbio | 50/265/1100 |
| | L0005 | 溶菌酶 | 1g/5g | FDbio | 18/80 |
| | FD008 | RIPA 裂解液 | 100 ml | FDbio | 200 |
| | R0010 | 高效RIPA组织细胞快速裂解液 | 20ml/100ml | FDbio | 120/400 |
| | R0030 | 非变性裂解缓冲液 | 100ml | FDbio | 180 |
| | SM0010 | 线粒体提取试剂盒 | 50T/100T | FDbio | 360/600 |
| SN0020 | 细胞核提取试剂盒 | 50T/100T | FDbio | 360/600 | |
| 蛋白酶和磷酸酶抑制剂 | P0100 | PMSF (100 mM) | 1 ml | FDbio | 60 |
| | P0005-5 | Pepstatin (胃蛋白酶抑制剂) | 5 mg | FDbio | 360 |
| | P0005-25 | | 25 mg | FDbio | 1530 |
| | L0002-5 | Leupeptin (亮抑蛋白酶肽) | 5 mg | FDbio | 280 |
| | L0002-25 | | 25 mg | FDbio | 1260 |
| | A8260 | Aprotinin (抑肽酶) | 2g | FDbio | 120 |
| | A8260 | | 5g | FDbio | 360 |
| | M8210 | β-Me (β-巯基乙醇) | 100 ml | FDbio | 130 |
| E8030 | EDTA.2Na | 500 g | FDbio | 90 | |
| 去垢剂 | T8200 | Triton X-100 | 100 ml | FDbio | 40 |
| | T8200 | | 500 ml | FDbio | 180 |
| | T8210 | Triton X-114 | 100 ml | FDbio | 60 |
| | N8030 | NP-40 | 50 ml | FDbio | 100 |
| | N8030 | | 100 ml | FDbio | 160 |
| | T0014-250 | Tween-20 | 100 ml | FDbio | 60 |
| | T0014-250 | | 250 ml | FDbio | 120 |
| | T0014-500 | | 500 ml | FDbio | 360 |
| | T0018 | Tween-80 | 100 ml | FDbio | 50 |
| | S0002-250 | SDS | 250 g | FDbio | 70 |



| | | | | | |
|------|-----------|----------------------|------|-------|-----|
| 蛋白纯化 | C0008-1 | CHAPS | 1g | FDbio | 125 |
| | C0008-5 | | 5g | FDbio | 563 |
| | D0005 | 脱氧胆酸钠 | 25g | FDbio | 120 |
| | MD10-14 | 透析袋 MD10(8000-14000) | 5米/卷 | FDbio | 240 |
| | TXDMD25-5 | 透析袋 MD25(8000-14000) | 5米/卷 | FDbio | 100 |
| | MD34-14 | 透析袋 MD34(8000-14000) | 5米/卷 | FDbio | 110 |
| | MD44-14 | 透析袋 MD44(8000-14000) | 5米/卷 | FDbio | 120 |
| | MD77-14 | 透析袋 MD77(8000-14000) | 5米/卷 | FDbio | 340 |

RIPA 裂解液:

| 产品货号 | 产品描述 | 包装 | 品牌 | 目录价 |
|-------|----------|--------|-------|-----|
| FD008 | RIPA 裂解液 | 100 ml | FDbio | 200 |

应用: 改良型的细胞、组织裂解液, 应用广, 可用于动物组织及细胞总蛋白的提取;

特点: 弗德生物研发生产的 RIPA 裂解液能温和裂解细胞及组织, 未加强去污剂 SDS, 防止蛋白变性, 可更好的保证蛋白的原有活性, 方便后续研究应用。可与弗德生物提供的 **6×SDS loading buffer (SN336)** 搭配使用, 进行后续蛋白电泳实验; 在提取蛋白之前, 可根据不同蛋白特性, 加入不同蛋白酶抑制剂、还原剂及盐等; 使用 RIPA 裂解得到的蛋白样品, 可以用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。

下游应用: 可用于蛋白分析 (定量、电泳)、免疫印迹分析 (Western Blot) 和蛋白纯化等众多下游实验应用。

相关产品: 10×PBS 缓冲液 (SN330-2)、常用的蛋白酶抑制剂 PMSF (P0014)、β-Me、DTT、抑蛋白酶肽 (A0018) 及其它蛋白酶抑制剂。

4.2 蛋白定量

| 产品类别 | 产品货号 | 产品名称 | 规格 | 品牌 | 价格 (¥) |
|------|----------|--------------------|---------------|-------|--------|
| 蛋白定量 | C0019-1 | 考马斯亮兰 G-250 | 1 g | FDbio | 20 |
| | C0019-5 | | 5 g | FDbio | 100 |
| | C0019-50 | | 50 g | FDbio | 900 |
| | C0020-1 | 考马斯亮兰 R-250 | 1 g | FDbio | 30 |
| | C0020-5 | | 5 g | FDbio | 135 |
| | C0020-5 | | 50 g | FDbio | 1093 |
| | A8010 | 牛血清白蛋白 BSA | 5 g | FDbio | 120 |
| | F8010 | 福林酚 | 50 ml | FDbio | 300 |
| | PC0010 | Bradford 蛋白浓度测定试剂盒 | 2500 微孔(250T) | FDbio | 150 |
| | PC0020 | BCA 蛋白浓度测定试剂盒 | 500 微孔(50T) | FDbio | 330 |
| | PC0030 | Lowry 法蛋白浓度测定试剂盒 | 1000 微孔(100T) | FDbio | 330 |

4.3 蛋白上样、电泳和染色

| 产品类别 | 产品货号 | 产品名称 | 规格 | 品牌 | 价格 (¥) |
|------|-------|-----------------------|------|-------|-------------|
| 电泳分 | FD345 | 蛋白电泳预制胶液 (6%) 6×8 cm | 10 T | FDbio | 300 (促 150) |
| | FD344 | 蛋白电泳预制胶液 (8%) 6×8 cm | 10 T | FDbio | 300 (促 150) |
| | FD341 | 蛋白电泳预制胶液 (10%) 6×8 cm | 10 T | FDbio | 300 (促 150) |



| | | | | | |
|-------------|--------------------------------|----------------------------------|--------------|--------------|--------------------|
| 离 蛋 白 | FD346 | 蛋白电泳预制胶液 (12%) 6×8 cm | 10 T | FDbio | 300 (促 150) |
| | FD347 | 蛋白电泳预制胶液 (15%) 6×8 cm | 10 T | FDbio | 300 (促 150) |
| | SN342 | SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒 | 10 T | FDbio | 300 |
| | A1010 | 30%丙烯酰胺(29:1) | 100 ml | FDbio | 80 |
| | FD002 | 5×双色Loading buffer | 5ml | FDbio | 156 (促销 91) |
| | FD003 | 2×双色 Loading buffer | 25ml | FDbio | 405 (促销 243) |
| | T1020 | 1 M×Tris buffer solution pH6.8 | 100 ml | FDbio | 50 |
| | SN317-2 | 1 M×Tris buffer solution pH6.8 | 500 ml | FDbio | 200 |
| | T1010 | 1.5 M×Tris buffer solution pH8.8 | 100 ml | FDbio | 50 |
| | SN318-2 | 1.5 M×Tris buffer solution pH8.8 | 500 ml | FDbio | 200 |
| | A1030 | 10%过硫酸铵 | 1ml/5×1ml | FDbio | 15/50 |
| | S1010 | 10%SDS | 100ml/500ml | FDbio | 50/180 |
| | T1080 | 20×TBS | 500ml | FDbio | 100 |
| | SN343 | 5×SDS-PAGE 电泳缓冲液 | 500 ml | FDbio | 230 |
| | P1300 | 考马斯亮蓝快速染色液 | 500 ml | FDbio | 140 |
| | SN349 | 考马斯亮蓝脱色液 | 500 ml | FDbio | 85 |
| | T8090 | TEMED | 50 ml | FDbio | 90 |
| | T8090 | | 100ml | FDbio | 160 |
| | M8210 | β-巯基乙醇 | 50 ml | FDbio | 65 |
| | A8081 | Acrylamide 丙烯酰胺 | 500g | FDbio | 120 |
| | M8200 | 甲叉—双丙烯酰胺 | 25g | FDbio | 50 |
| | B0006-50 | | 50g | FDbio | 100 |
| | M8200 | | 100g | FDbio | 180 |
| | B0006-500 | | 500g | FDbio | 450 |
| | A8090 | 过硫酸铵 | 25g | FDbio | 37 |
| | A8090 | | 100 g | FDbio | 137 |
| | A8090 | | 500 g | FDbio | 360 |
| | D0011-5 | DTT | 5 g | FDbio | 180 |
| | D0011-10 | | 10 g | FDbio | 260 |
| | D0011-25 | | 25 g | FDbio | 593 |
| | B0011-1 | Bromophenol Blue (溴酚兰) | 1g | FDbio | 15 |
| | B0011-5 | | 5g | FDbio | 68 |
| | B0011-25 | | 25g | FDbio | 304 |
| T8230 | Tris HCl (Tris 盐酸 Amresco0234) | 100 g | FDbio | 120 | |



| | | | | | |
|----------|------------|------------------------|-------|-------|-----|
| | T0009-50 | Tris HCl (三羟甲基氨基甲烷盐酸盐) | 50 g | FDbio | 160 |
| | T0009-100 | | 100 g | FDbio | 288 |
| | T0008 | Tris base (三羟甲基氨基甲烷) | 500 g | FDbio | 160 |
| | G8200 | Glycine | 500 g | FDbio | 80 |
| 蛋白Marker | FD0671-20T | 预染蛋白分子量标准 10-170 kDa | 20T | FDbio | 250 |
| | FD0671-50T | | 50T | FDbio | 526 |
| 印迹膜染色试剂 | P0018-10 | Ponceau S (丽春红 S) | 10 g | FDbio | 110 |
| | P0018-100 | | 100 g | FDbio | 880 |

A. 预染蛋白分子量 Marker:

| 产品货号 | 产品描述 | 包装 | 品牌 | 目录价 ¥ |
|------------|-----------|---------------|-------|-------|
| FD0671-20T | 预染蛋白分子量标准 | 20 T (100 µl) | FDbio | 250 |
| FD0671-50T | 预染蛋白分子量标准 | 50 T (250 µl) | FDbio | 426 |

应用：监控蛋白的 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳迁移；监控 Western 杂交的蛋白转膜效率；SDS-PAGE 电泳和 Western 杂交粗略鉴定蛋白大小。

特点：与 Fermentas SM0671 相同，分子量范围较宽，为 10-170 kDa，含有两条参考条带，分别 72 kDa 的橙色参考条带和 10kDa 的绿色参考条带。条带窄，易于辨认；颜色稳定；明亮的参考条带；宽分子量范围；即用型上样，无需煮沸。

相关产品：10×PBS 缓冲液 (SN330-2)、常用的蛋白酶抑制剂 PMSF (P0014)、β-Me、DTT、抑蛋白酶肽 (A0018) 及其他蛋白酶抑制剂。

| 不同蛋白分子量与转膜条件 | | | | |
|--------------|---------------------------|--------|--------|--------------|
| 蛋白分子量 (kDa) | 转膜缓冲液 | SDS 浓度 | 甲醇浓度 | 转膜时间 (冰水浴) |
| 10-60 | 48 mM Tris, 39 mM Glycine | 可不加 | 20% | 300mA, 1 h |
| 60-100 | 48 mM Tris, 39 mM Glycine | 0.037% | 20% | 300mA, 1.5 h |
| 100-200 | 48 mM Tris, 39 mM Glycine | 0.1% | 10-15% | 300mA, 2 h |

20 kDa 以下蛋白推荐使用 0.22 µm PVDF 膜，其余条件不变。

B. 30%丙烯酰胺:

| 产品货号 | 产品描述 | 包装 | 品牌 | 目录价 |
|--------|---------------------|--------|-------|-----|
| SD6017 | 30%(W/V) Acrylamide | 100 ml | FDbio | 80 |
| SD6017 | 30%(W/V) Acrylamide | 500 ml | FDbio | 260 |

应用：用于蛋白 SDS-PAGE 电泳，核酸 PAGE 电泳，分离蛋白或核酸。

特点：弗德生物研发生产的 30% (29:1) 丙烯酰胺，已过滤，即买即用，需避光保存。

下游应用：用于蛋白 SDS-PAGE 电泳，核酸 PAGE 电泳，分离蛋白或核酸。

相关产品：蛋白提取相关试剂、蛋白电泳相关试剂、考马斯亮蓝染色液、考马斯亮蓝脱色液。



C. 蛋白电泳预制胶

| 产品货号 | 产品描述 | 包装 | 品牌 | 目录价 | 促销价¥ |
|-------|----------------------|------|--------------|-----|------|
| FD345 | 蛋白电泳预制胶液（6%） 6×8 cm | 10 T | FDbio | 300 | 150 |
| FD344 | 蛋白电泳预制胶液（8%） 6×8 cm | 10 T | FDbio | 300 | 150 |
| FD341 | 蛋白电泳预制胶液（10%） 6×8 cm | 10 T | FDbio | 300 | 150 |
| FD346 | 蛋白电泳预制胶液（12%） 6×8 cm | 10 T | FDbio | 300 | 150 |
| FD347 | 蛋白电泳预制胶液（15%） 6×8 cm | 10 T | FDbio | 300 | 150 |

应用：用于蛋白 SDS-PAGE 电泳，测定蛋白的分子量大小。

特点：SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)是目前电泳法变性分离蛋白质的主要方法，本公司生产的预制胶液为即用液，用户只需自备制胶器具即可快速配制分离胶、浓缩胶进行蛋白电泳实验。

下游应用：用于蛋白 SDS-PAGE 电泳，进行 Western Blot 分析。

相关产品：蛋白电泳相关试剂、考马斯亮蓝染色液、考马斯亮蓝脱色液。

4.4 转膜及封闭

| 产品类别 | 产品货号 | 产品描述 | 包装 | 品牌 | 目录价 |
|------|--------------------|----------------------|-------------|--------------|--------------------|
| 转膜 | IPVH00010-1 | PVDF 膜 0.45 μm | 13.25×15 cm | FDbio | 120 |
| | SX0015 | NC 膜/硝纤膜 | 15×20 cm | FDbio | 100 |
| | SN322 | western 转膜液 | 1 L | FDbio | 40 (促 30) |
| | P0018 | 丽春红 S | 10 g | FDbio | 90 |
| | P0018-100 | | 100 g | FDbio | 810 |
| 封闭 | SN323 | western 封闭液 I (脱脂奶粉) | 100 ml | FDbio | 100 |
| | SN324 | western 封闭液 II (BSA) | 100 ml | FDbio | 100 |
| | SN330-1 | 10×PBS | 100 ml | FDbio | 20 |
| | SN330-2 | | 500 ml | FDbio | 60 |
| | SN331 | 1×PBS 固体粉末 | 2 L | FDbio | 5 |
| | SN382 | PBST Buffer | 500 ml | FDbio | 60 |
| | SN327 | TBST buffer | 500 ml | FDbio | 60 |
| | B0012-5 | 牛血清白蛋白 | 5 g | FDbio | 80 |
| | B0012-10 | | 10 g | FDbio | 150 |
| | B0012-25 | | 25 g | FDbio | 280 |
| | 232100 | 脱脂奶粉 | 500 g | FDbio | 600 |
| | T0014-500 | Tween-20 | 100 ml | FDbio | 122 (促 100) |
| | T0018 | Tween 80 (吐温-80) | 100 ml | FDbio | 50 |

4.5 一抗、二抗孵育

| 产品类别 | 产品货号 | 产品名称 | 规格 | 品牌 | 价格(¥) |
|------|--------|---------------------------|---------------------|--------------|------------------|
| 内参抗 | AP0063 | GAPDH Antibody | 50 μl/100 μl | FDbio | 1000/1500 |
| | AP0060 | β-Actin Antibody | 50 μl/100 μl | FDbio | 1000/1500 |
| | AP0064 | β-Tubulin Antibody | 50 μl/100 μl | FDbio | 1000/1500 |



| | | | | | |
|---------------|----------------|--|-----------------------|--------------|---------------------|
| 体 | SAM1003 | GAPDH mouse Monoclonal Antibody | 50 μl/100 μl | FDbio | 1000/1500 |
| 标签抗体 | SAM1006 | His-Tag mouse Monoclonal Antibody | 50 μl/100 μl | FDbio | 1000/1500 |
| | SAM1007 | HA-Tag mouse Monoclonal Antibody | 50 μl/100 μl | FDbio | 1000/1500 |
| | SAM1008 | GFP-Tag mouse Monoclonal Antibody | 50 μl/100 μl | FDbio | 1000/1500 |
| | SAM1009 | GST-Tag mouse Monoclonal Antibody | 50 μl/100 μl | FDbio | 1000/1500 |
| | SAM1010 | DYKDDDDK-Tag mouse Monoclonal Antibody | 50 μl/100 μl | FDbio | 1000/1500 |
| | 二抗 | GAM007 | 山羊羊抗小鼠 IgG (H+L), HRP | 100 μl | FDbio |
| GAR007 | | 山羊羊抗兔 IgG (H+L), HRP | 100 μl | FDbio | 200 (促销 120) |
| RAG007 | | 兔抗山羊羊 IgG (H+L), HRP | 100 μl | FDbio | 280 (促销 144) |

A. 一抗——内参抗体

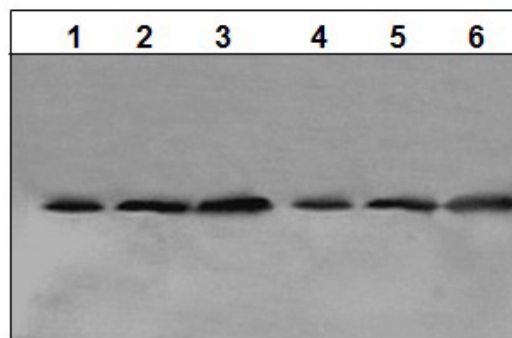
| 产品货号 | 产品描述 | 包装 | 品牌 | 目录价 |
|--------|------------------|--------------|--------------|-----------|
| AP0060 | β-Actin Antibody | 50 μl/100 μl | FDbio | 1000/1500 |

应用：β-Actin 抗体是 Western Blot 很好的内参指标。

特点：β-Actin 可作为内参蛋白来检测其他蛋白的表达情况，弗德生物研发生产的 β-Actin antibody 为多克隆兔抗血清，经纯化达到高效价，抗体稳定，经多次实验验证，并且可重复使用。β-Actin 是横纹肌纤维中的一种主要蛋白质成分，也是肌肉细丝及细胞骨架微丝的主要成分。

| 公司 | 货号 | 体积 | 使用次数 (1ml 用量) | 来源 | 反应性 | WB 稀释比列 | 价格 (元) |
|------|--------|--------------|---------------|------|---------|---------------|-----------|
| XX | XXX | 40 μl | 40 次 | 小鼠单抗 | 人、大鼠、小鼠 | 1:1000 | 378 |
| 弗德生物 | AP0060 | 50 μl/100 μl | >100 次/>200 次 | 兔多抗 | 人、大鼠、小鼠 | 1:2000-1:4000 | 1000/1500 |

由表格中可看出，XX 公司生产的抗体稀释度较低，且它的使用次数是以 1 ml 为抗体使用量，同等量下，我们的 Actin 抗体长久使用较占优势，虽价格较高，但单次折算价格较低，并且可以重复使用 2-3 次，1:2000 是起始稀释度，各实验者可以根据自身实验进行调整提高稀释度，因而 50 μl 包装使用次数将远不止 100 次。



Western blot 分析 B-Actin 抗体最佳稀释度

1,2,3: 大鼠组织裂解液，上样 20ug/孔，抗体稀释度 1:2000

4,5,6: 大鼠组织裂解液，上样 20ug/孔，抗体稀释度 1:4000

**B. 二抗——羊抗兔 IgG-HRP, 羊抗鼠 IgG-HRP**

| 产品货号 | 产品描述 | 包装 | 品牌 | 目录价 | 促销价 |
|--------|---------------------|--------|-------|-----|-----|
| GAM007 | 羊抗小鼠 IgG (H+L), HRP | 100 μl | FDbio | 200 | 120 |
| GAR007 | 羊抗兔 IgG (H+L), HRP | 100 μl | FDbio | 200 | 120 |

应用：辣根过氧化物酶标记抗体目前广泛用于免疫与分子生物学、免疫细胞化学、病理学诊断及自身免疫性疾病的临床免疫学诊断。

特点：IgG 采用常规方法进行标记，标记后抗体为了减低与其他物种血清蛋白的交叉反应性，需进行进一步纯化，纯化后抗体与其他血清蛋白无交叉，与 Ig 类蛋白仍存在交叉反应性。不同实验的推荐使用浓度（**Western blotting: 1:10,000-1:200,000; Enzyme immunoassays: 1:5,000-1:100,000; Immunohistochemical staining: 1:500-1:5,000**）。

相关产品：显影定影试剂盒、Western 封闭液 I（脱脂奶粉）、Western 封闭液 I（BSA）、Western 转膜液、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒、TMB、DAB。

4.6 显色

| 步骤 | 产品货号 | 产品描述 | 包装 | 品牌 | 目录价 |
|------|------------|-------------------------|--------|-------|-----------|
| | 20-500-120 | EZ-ECL Kit +4°C (120ml) | 120ml | FDbio | 800 |
| 底物孵育 | DA1010 | DAB 浓缩型试剂盒 | 3ml/组 | FDbio | 80 |
| | D0001-5 | DAB | 5g | FDbio | 536 |
| | PR1100 | BCIP/NBT 地物显色试剂盒 | 25ml | FDbio | 220 |
| | N0006-1 | NBT（氮兰四唑） | 1 g | FDbio | 1170 |
| | B0002-100 | BCIP | 100 mg | FDbio | 242 |
| 曝光检测 | SN340 | 显影定影试剂盒 | 100 ml | FDbio | 100(促 80) |

显影定影试剂盒

| 产品货号 | 产品描述 | 包装 | 品牌 | 目录价 ¥ | 促销价 ¥ |
|-------|---------|----------------|-------|-------|-------|
| SN340 | 显影定影试剂盒 | Kit (各 100 ml) | FDbio | 100 | 80 |

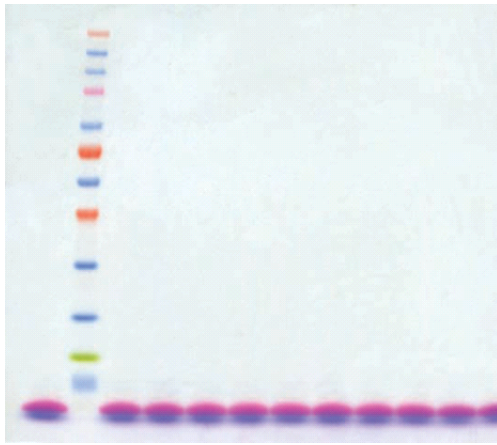
应用：显影定影试剂盒是一个用于 Western、Northern、Southern 等后续压片后的洗片试剂。本试剂盒中的显影和定影试剂的配方特别适合于 X 光片的显影定影，对于普通的黑白底片或照片的显影定影也适用。本显影定影试剂盒不需要其它任何试剂，即可使用。

特点：弗德生物研发生产的显影定影试剂盒中有显影液 100 ml 和定影液 100 ml。每次使用需用 20 ml，用完另外收藏，可反复使用 3-4 次，可保存一周时间。

显影时把 X 光片完全浸没在显影液内，显影 10 秒至 2 分钟。具体显影时间要根据显影情况而定，可以在红灯下观察，当发现显影的程度已经达到预定目标，即可停止显影，在自来水中冲洗 2-3 分钟，以完全冲洗去显影液。然后，浸没在定影液内，定影 10 分钟左右。如果定影时间再长一些例如 30 分钟，通常对洗片的结果没有明显影响。在自来水中冲洗 10 分钟，以充分洗去各种残留溶液和试剂。

相关产品：标记二抗、PVDF 膜、转膜缓冲液、蛋白电泳缓冲液等。

相关推荐:



双色 Loading Buffer

1. 选用昂贵的 DTT, LDS 取代 β -Me, SDS, 还原性更强, 阴离子去垢效果更好
2. PH 值 8.5 更能防止煮样过程中因 PH 值下降造成的降解
3. 加入红色染料实时监控转膜效率



预制胶缓冲液

1. 采用预制胶系统, 是保存时间更长, 4 度保存一年
2. 不再需要繁琐的配置制胶的各种组分
3. 不再需要分离胶与浓缩胶分开加样凝固, 同时灌胶, 一次成型
4. 条带更紧凑
5. 转膜时间大大缩短, 转膜效率高, 无残留蛋白

预付款客户享受以下品牌代购:

分子生物学



免疫学



实验耗材



杭州弗德生物科技有限公司

FDbio Science Biotech Co., Ltd

浙江省杭州市西湖区三墩振华路 200 号瑞鼎大厦 B505

电话: 18814823735 网址: www.fdbiotech.com