

化学发光免疫印迹技术指南和实验方案

简介

免疫印迹是一种功能强大的常用技术,可用于鉴别并定量复杂混合物中的特定蛋白。该技术最初由Towbin et al.建立,能够实现对于固定于硝酸纤维素膜或PVDF膜上的蛋白质样本的间接检测。在常规免疫印迹流程中,首先通过SDS-PAGE分离蛋白质样本,然后在电场作用下转移至膜上。封闭后,使用靶向目的抗原的一抗(单克隆或多克隆)检测膜。漂洗后再使用靶向一抗的酶标二抗孵育膜。酶的活性,例如碱性磷酸酶(AP)和辣根过氧化物酶(HRP),是生成信号所必需的。最后,再次漂洗膜,使用适当的酶底物进行孵育,即可生成可采集的信号。

该指南介绍了使用化学发光底物进行免疫印迹检测的通用方案和影响因素。文中采用了相关的Thermo Scientific™ 和 Invitrogen™ 蛋白质研究产品作为参考,但所述的策略和方法适用于大多数增强型化学发光(ECL)分析与检测。

化学发光免疫印迹的类型和影响因素

辣根过氧化物酶(HRP)是Western blot中最常用的酶,在本文中会作为示例通篇讨论。最常用的HRP底物基于鲁米诺,可生成化学发光信号。化学发光的原理是化学反应过程中生成的能量以光的形式释放。在HRP和过氧化物缓冲液的作用下,鲁米诺氧化并形成激发态产物,发出光线的同时逐渐衰变为基态。因为只有在酶-底物反应过程中发射光线,一旦酶附近的底物耗尽,信号输出就会停止。相比之下,显色底物(如DAB)生成的沉淀即便是在反应终止后仍在膜上可见。我们介绍了几种最常用的Thermo Scientific SuperSignal™ HRP和Pierce™ ECL化学发光底物(表1),它们均可用于化学发光免疫印迹检测,具备不同的灵敏度水平,可依据靶蛋白丰度、包含靶蛋白的样品浓度、所需的灵敏度和检测仪器进行选择。

表1 Thermo Scientific Pierce ECL和SuperSignal系列化学发光底物

	Pierce™ ECL substrate	Pierce ECL™ Plus substrate	SuperSignal™ West Pico PLUS substrate	SuperSignal™ West Dura substrate	SuperSignal™ West Femto substrate
检测灵敏度	低至中皮克	低皮克	高飞克	中飞克	低飞克
信号持续时间	0.5-2 小时	5 小时	6-24 小时	24 小时	8小时
检测方法	X 光胶片、CCD 成像仪	X 光胶片、CCD 成像仪、荧光成像仪	X 光胶片、CCD 成像仪	X 光胶片、CCD 成像仪	X 光胶片、CCD 成像仪
适用情形	靶点丰度较高,样本充足,底物适合日常使用	靶点丰度较低,样本有限,适合化学荧光检测	靶点丰度较低,样本有限,需要较入门级ECL底物更高的灵敏度	靶点丰度较低,样本有限,适合CCD成像仪采集图像	靶点丰度极低,样本最珍贵,需要最高的检测灵敏度
产品优势	低成本;从其他入门级ECL底物轻松切换	最佳检测灵活性,可提供化学荧光检测方案	超值之选:满足绝大部分常规免疫印迹检测的需求	最长信号持续时间	最高检测灵敏度

你知道吗?

面对多种化学发光底物, 要从那款用起? 试一试 SuperSignal West Pico Plus 化学发光底物吧 (货号 34580), 这是最通用的 Western blot 底物, 能应对大部分蛋白样品。

一. 信号采集

尽管免疫印迹功能强大且应用广泛, 但对难以捕捉的化学发光信号的采集经常令人沮丧。由于免疫印迹包括一系列相关联的技术, 需要大量技巧, 因此可能导致信号采集失败的因素有很多。有这么多的变量(表2), 印迹问题的疑难排除就好比是大海捞针。经典的实验方案通常不适用于特殊样本的检测。例如, 一抗可能无法识别变性状态的固定化抗原。尽管使用非变性条件可以使蛋白质保持天然状态, 但这会增加靶点分子量测定的难度。此外, 极大的或疏水性蛋白质通常无法高效地转移至膜上。因此通常需要调整 Towbin 最初的实验方案, 以确保对靶点的成功检测。这可能需要使用不同的间接检测试剂, 或直标一抗用于直接检测。有时候甚至无需转移, 可以在凝胶上直接完成检测。

表2. 影响免疫印迹结果的因素

因素	可变特性
目的抗原	构象、稳定性、可用的表位
聚丙烯酰胺凝胶	制造商、聚丙烯酰胺百分比、储存条件和时间、批次
印迹膜	制造商、类型、批次
一抗	特异性、效价、亲和力、孵育时间和温度
HRP 标记物	酶活化水平和活性、种属来源、浓度
封闭缓冲液	类型、浓度、交叉反应性
漂洗液	缓冲液、体积、漂洗时长、频率
底物	灵敏度、生产批次、储存条件和时间
检测方法	膜存放时间、成像仪器制造商、曝光时间

二. 信号强度和持续时间

当所有免疫印迹的影响因素都达到最佳条件时, 化学发光信号可持续6-24 小时。这具体取决于使用的特定底物, 以及体系中的酶-底物的比例。尽管印迹膜上的底物量是相对恒定的, 但酶的量取决于加入量及其他因素(表2)。免疫印迹体系中过多的酶标记物(比如二抗)是引起信号变化、高背景、信号持续时间短和灵敏度较低的首要原因。

信号发射曲线缓慢衰减(图1)是理想的状态, 说明系统的各组分已经过优化, 可以获得重复性好的结果。信号迅速衰减则可能会导致偏差、低灵敏度以及信号无法采集。持久的信号可以最大程度地降低由转印效率、不同底物批次和其他因素引起的差异性。

HRP与鲁米诺的氧化反应过程中生成的自由基可与HRP结合, 导致酶不能再与底物相互作用。体系中大量的HRP可以生成大量自由基, 提高了HRP失活的概率。自由基还会损伤抗原、抗体和膜, 抑制重新检测的有效性。

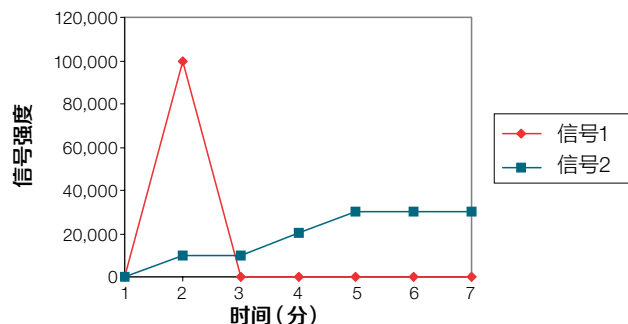


图1. 信号发射曲线示例。当免疫印迹体系中存在过多酶时, 会在加入底物后迅速达到信号输出峰值, 并迅速耗尽底物(信号1)。在理想系统中, 信号发射强度会在加入底物约5分钟后达到峰值, 并维持若干小时的平台期(信号2)。

三. 直接和间接方法

直接检测法使用的是直标一抗。由于无需加入二抗进行孵育，该方法所需的时间短于传统的免疫印迹方法，此外还可避免二抗交叉反应产生的背景信号。直接检测还可以实现多个靶点的同时检测。但是，标记一抗有时会对其免疫活性具有副作用，即便是在最理想的情况下，直标一抗也无法实现信号扩增。因此，直接方法的灵敏度一般低于间接方法，仅适用于靶点丰度相对较高的情况。另一种选择是使用生物素化一抗，这是一种既可扩增信号且无需二抗的间接检测方法。使用生物素化试剂进行标记一般会使每个抗体分子获得多个生物素化基团。每个生物素化基团能够与酶标亲和素、链霉亲和素或 Thermo Scientific NeutrAvidin™ 中性亲和素 (货号31000) 相互作用。这些酶可以催化相应底物的转化以实现信号的扩增。一般使用亲和素结合物替代二抗，其最佳摩尔浓度与二抗相当。相比HRP (分子量40kDa) 或者AP (分子量140kDa)，生物素的分子量较低 (通常小于2kDa)，可减少空间位阻，一抗可获得更好的功能体现。

四. Far-Western 方法

有时靶向特定抗原的抗体不适用于免疫印迹分析或者仅仅是无法获取。如果可以提供与靶蛋白结合的分子作为探针，则仍可以进行印迹检测。该类型的应用被称为Far-Western blot，常用于蛋白质:蛋白质相互作用的检测或分析。这种方法存在大量可变因素，涉及前面提到的所有策略。类似于一抗，所用的标记结合蛋白通常在体外翻译反应中使用³⁵S标记。将探针生物素化并使用亲和素或亲和素样结合物进行检测是另一种方法，它对于信号放大具有附加效应。必须小心确保探针没有过度标记，以免影响其与靶点相互作用的能力。此外，可以在细菌中表达带有标签的重组探针，如GST、HA、c-Myc或FLAG，通过靶向特定标签的标签抗体进行检测。与其他印迹应用一样，Far-Western 方法适用于膜或凝胶的检测。

优化指南

每个免疫印迹系统都需要进行优化以获得稳定理想的结果。影响信号强度和持续时间的因素有很多，而每一种都有其优化策略。以下内容就是关于几种常见因素的讨论。指南文末的实验操作包含了针对优化步骤的详细介绍与建议。

一. 印迹膜

膜成分基本不会影响HRP-鲁米诺的相互作用及后续的信号生成。但是，硝酸纤维素和PVDF膜在蛋白质结合特性方面确实存在差异。一般而言，PVDF膜与蛋白质的结合能力更强，具有较高的拉伸强度和极佳的操作特性。但是，PVDF膜的疏水性更高，难以浸润，有时会导致较高的背景信号。由于不同生产厂家的PVDF膜性能存在差异，科研工作者需要在已经证实的系统中进行优化。为获得最佳结果，可在使用珍贵的样本或抗体之前，先根据实验经验检测印迹膜。考虑到不同批次的膜可能存在批间差异，使用新批次的印迹膜之前进行检测会有所帮助。

二. 蛋白转印

不同蛋白质的转印效率差异巨大。在不同条件下，蛋白质的凝胶迁移能力及其与膜结合的倾向存在差异。转印效率取决于诸多因素，如凝胶组分、凝胶与膜的接触、电极位置、转印持续时间、蛋白质大小和组成、场强、缓冲体系以及是否存在去污剂。在低离子强度缓冲液和低电流条件下，大多数蛋白质可以实现最佳转印效果。然而，快速转印则需要高离子强度，可在高电流条件下进行。转印后可使用免疫印迹兼容型或可逆的染料进行膜染色，以评估转移效率。

三. 封闭缓冲液

适用于免疫印迹的封闭试剂种类很多。因为没有一种封闭试剂适用于所有系统，必须根据实验效果来选择。最佳的封闭缓冲液可最大程度地提高信噪比，且不会与系统的抗体或靶点反应。例如，使用亲和素/生物素系统时，使用5%脱脂牛奶作为封闭试剂会导致高背景，因为牛奶含有大量内源性生物素，可与亲和素结合。此外，牛奶中含有磷酸酶，可能会导致蛋白样品脱磷酸化，从而影响磷酸化蛋白的检测。当改变底物、抗体或靶点时，如果封闭缓冲液不是最适合于新的体系，也可能导致信号降低或背景升高。

一些体系可通过向封闭缓冲液中加入表面活性剂(如Thermo Scientific™ Tween™ 20) 达到更理想的效果。表面活性剂可以阻止封闭试剂与靶点的非特异性结合，从而最大程度地降低背景。但是，加入过多的表面活性剂也会对封闭效果造成影响。通常，去污剂的最终浓度为0.05%；但是并非所有系统均需要加入表面活性剂进行优化。我们推荐使用杂质含量较低的高品质去污剂。比如Thermo Scientific™ Tween™ 20 Surface-Amps去垢剂(货号28230)，此去垢剂不含过氧化物和醛酮类，会大大降低这些杂质对检测结果的影响。Thermo Scientific™ StartingBlock™ T20 PBS封闭缓冲液(货号37579) 或者TBS封闭缓冲液 (货号37543) 含有0.05%的Tween 20去垢剂。

四. 抗体

蛋白质免疫印迹通常利用可识别复杂蛋白质混合物中的特定蛋白质或表位的一抗来检测封闭的膜。一抗的选择取决于待测的特定抗原及可用的抗体。还必须注意，并非所有的一抗都适用于蛋白质免疫印迹。因此，只有已经过验证适用于该应用领域抗体才可选用。通常，最终使用标记的二抗检测目标抗原 (间接检测)。可用于蛋白质免疫印迹检测的标记二抗种类众多。二抗的选择取决于一抗的动物种属(宿主种属)或与一抗连接的标签(如生物素、多个组氨酸(6xHis)、血凝素(HA)等)。例如，如果一抗是未标记的小鼠单克隆(IgG或IgM) 抗体，则二抗必须是来源于非小鼠宿主的抗小鼠IgG或抗小鼠IgM抗体。

你知道吗？

我们的Invitrogen™ 抗体已经过全面验证*，无需使用者再筛选多种抗体找出适合的那支。我们提供的数万种抗体覆盖50多个研究领域，确保适用于标示的应用和种属。

此外，我们还提供各种高品质的标记和未标记二抗，可用于一抗的荧光、比色和化学发光检测，适用于蛋白质免疫印迹及其他诸多领域。

如需了解更多信息，请登录

thermofisher.com/antibodies

* “验证”或其他类似含义的词仅涉及需要进行功能测试以确认抗体适用于标示研究技术的供研究使用的抗体。不保证产品经过临床或诊断使用验证。

不仅一抗与抗原的亲合力至关重要，一抗和二抗的浓度也会对信号的生成产生深远的影响。印迹膜上捕获的信号过强可能是由于一抗或二抗(或两者兼有)浓度过高引起的。通常尽量降低一抗的浓度会更有帮助，因为这会促进靶点特异性的结合和低背景。如果由于高背景或抗体结合力低导致信号不足，则可使用增强剂产品进行预处理，以提高蛋白质免疫印迹的信号。Thermo Scientific™ SuperSignal™ 蛋白质免疫印迹信号增强剂 (货号46640) 有助于提升目的蛋白的检测。它是包含膜处理试剂和一抗稀释液的双组分系统，可提高信号强度和灵敏度，从而优化系统的信噪比(图2)。

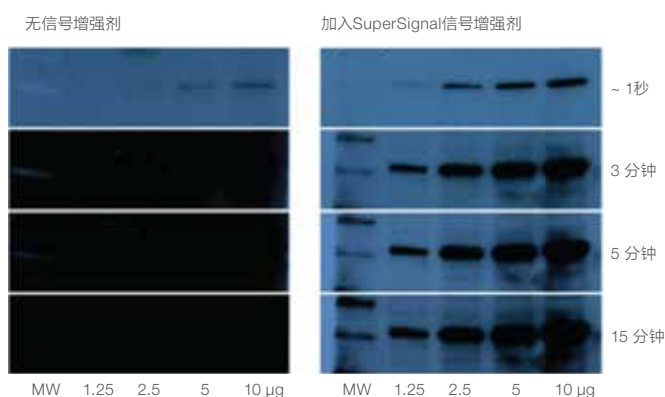


图2. SuperSignal蛋白质免疫印迹信号增强剂可降低背景，实现低丰度靶点的检测。将K562细胞裂解物上样至Tris-甘氨酸SDS-PAGE凝胶，每个泳道分别为1.25、2.5、5和10 µg。(左) 电泳后，将蛋白质转印至硝酸纤维素膜(货号: 88013)上，使用Thermo Scientific™ SuperBlock™ 封闭缓冲液(货号: 37535)封闭膜。使用1 µg/mL的小鼠ERK 1-抗(货号: MA1-13041)检测印迹，然后使用0.08 µg/mL的HRP标记山羊抗小鼠IgG(货号: 31430)二抗检测。使用Thermo Scientific™ Pierce™ ECL底物(货号: 32209)进行检测。一抗和标记二抗均在封闭缓冲液中稀释。(右) 除使用SuperSignal蛋白质免疫印迹信号增强剂外，该实验方案与上述实验方案相同。使用抗原预处理溶液预先处理膜10分钟，用水冲洗，随后使用封闭缓冲液孵育。在一抗稀释液中稀释一抗，然后检测膜。

如果在印迹膜上无法捕获足够的信号，建议剥离印迹膜上的所有检测试剂，用相同浓度的不同一抗或不同浓度的该抗体重新检测。这通常可以节约珍贵的样本和时间；但剥离不充分会使活性HRP残留在印迹膜上，生成干扰信号。要检测剥离的印迹膜上是否有活性HRP残留，可以重新加入底物后检测信号。如果有大量的非活性HRP分子未被去除，则重新检测时也会抑制一抗与靶点的结合。剥离并重新检测印迹膜是获取特定系统的信息并保护珍贵样本的高效方法。

五. 检测方法

传统方法常使用胶片检测免疫印迹化学发光信号。胶片无需昂贵的设备，可提供极佳的灵敏度。遗憾的是，每张胶片只能使用一次，在判断曝光时长是否合适前必须进行显影。预实验和失误(例如使用多张胶片)通常在所难免。为了掌握信号与背景之间的平衡，一般都需要按照不同的时长曝光多次。如果胶片过曝了，信号可能会被背景掩盖，或是相近的条带模糊一团。这时可以使用Thermo Scientific Pierce胶片背景消除剂(货号21065)等试剂来“挽救”过曝的胶片(图3)。

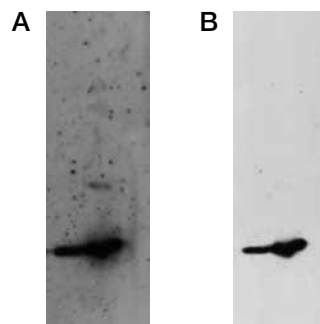


图3. 使用4-20%的SDS-PAGE凝胶分离人TNFα然后转移至硝酸纤维素膜上。封闭后，使用小鼠抗人TNFα和山羊抗小鼠HRP抗体分析印迹，然后使用SuperSignal West Dura底物检测。胶片曝光30秒后，形成大量背景斑点(A)。然后使用Pierce背景消除液处理胶片2分钟，可去除斑点和条带的过度曝光(B)。

电荷耦合器件(CCD)成像系统现在常用于化学发光检测。这类成像仪与附带的分析软件,比如Invitrogen™ iBright CL1000智能成像系统(货号A32749),能够调整背景信号,进行光密度测定。成像系统相比胶片检测具有优势:较大的动态范围和简便的成像控制可实现理想的图像记录,且不存在高背景或高信号强度影响数据的问题。此外,优化的成像时间可以避免条带信号饱和,并能够观察到微小的强度变化。相比之下,胶片的动态范围更小,条带信号会迅速达到饱和。当信号强度较高时,胶片的低动态范围、容易迅速达到饱和的特性以及曝光控制的限制因素经常会导致图像的过度曝光。

常见问题指南

一. 无信号

初次曝光时无法采集信号表示免疫印迹体系需要优化。信号缺失通常是由系统中HRP过多引起的。当未检测到信号时,减少酶结合物的用量似乎是违反直觉的;但为了成功采集信号,酶和底物之间必须保持正确的平衡。酶对底物的氧化作用是不可逆的,因此一旦底物被氧化,便无法再与酶反应来生成光线。由于酶活性的存在,底物成为限制因素,一旦耗尽就会导致信号输出的衰减。很少情况下,信号缺失是由活性酶量的不足引起的。免疫印迹体系中的许多因素都会引起酶量过多或过少。

要生成可以采集的信号,需要调整体系参数。为了获得重复性好的结果,可以配制新凝胶、减少加样量或滴定抗体。当优化抗体浓度时,可对印迹膜进行两次成像:一次是在底物孵育后立即成像,第二次是在孵育底物后间隔一段时间成像(如1小时)。两次检测可提供关于最佳酶浓度的信息,有助于优化参数。比如一开始即产生了信号,但是1个小时或者其他合理时间段后信号消失,有可能HRP的使用量过高。

此外,如果初次曝光未能采集信号,进行第二次底物孵育可能会生成信号(若足够量的HRP失活的同时保持部分有活性)。剥离印迹膜上的所有检测试剂并重新检测可以节省宝贵的样本,同时优化参数。重新孵育底物并剥离印迹膜只能恢复部分体系信息。如果需要印迹膜之间有较好的一致性,则在每次实验时必须使用相同的条件,遵循相同的操作步骤。

二. 信号迅速衰减

当生成的信号快速衰减时,也需要优化免疫印迹体系(如上节所述)。好消息是已经获得了信号,表示现在的体系正在接近最佳印迹条件。有时尽管所有参数均相同,某个系统的信号衰减速率仍较正常情况更快。在全面优化的体系中可以将出现此类结果的概率降至最低。可获取成功但非最理想结果的体系易受到流程中轻微变化的影响,如转印效率,储存和操作过程中的样本与抗体活性的变化。

三. 新的底物无法产生信号

有时候仅仅是特定系统中使用的底物瓶子或批次改变,便无法采集信号。一般情况下这是由未经全面优化的免疫印迹体系引起的。免疫印迹底物本身存在差异。许多制造商将底物的灵敏度差异控制在微小范围内,底物之间会存在批次间的轻微差异。在全面优化的印迹系统中,底物灵敏度的差异以及其他变量通常可忽略或无法察觉。

四. 膜上出现褐色或黄色条带

当HRP被氧化或失活时会变为褐色。一定量的酶结合物中始终存在一部分被氧化的酶结合物。在优化的体系中,被氧化的HRP的量极少,无法在印迹膜上观察出来。出现黄色或褐色条带说明存在大量的HRP,因此被氧化和失活的部分变得可见。生成黄色条带的印迹系统需要大幅减少酶结合物的用量来进行优化。此外,局部区域HRP过量将会在底物存在的情况下生成过多的自由基。这些自由基可以灭活HRP并破坏抗体、靶点和膜,抑制重新检测的有效性。

五. 条带或整个印迹膜在暗室中发光

如果经过底物孵育后,条带或整个印迹可以发光,则表示系统中存在过量HRP。这种情况表示HRP标记二抗需要稀释,一抗也可能需要稀释。免疫印迹体系中的许多因素都会引起酶量过多。如果整个印迹膜发光,除了优化封闭和洗涤条件,还需要优化样品,一抗和二抗稀释度。

六. 假带/空带

蛋白质条带呈光晕状、条带中央无信号或者在黑暗的背景下整个条带呈白色, 通常被称为假带。这表示白色区域的底物被耗尽。假带效应的最常见原因是凝胶上的靶蛋白量过多, 以及二抗浓度过高。

七. 高背景

高背景信号是由于封闭不充分、抗体与封闭缓冲液交叉反应或酶结合物用量过多引起的。研究人员有时认为, 特定的底物会产生背景或提高背景。在酶不存在的情况下, 底物本身不会产生信号。当使用灵敏度更高的底物时, 如果不调整体系以适应底物灵敏度, 则通常会产生高背景。使用最佳的抗体浓度可以促进靶点特异性的结合, 并降低背景。

使用化学发光底物进行印迹和剥离的通用实验方案

本节将深入介绍免疫印迹、抗体剥离和实验优化的操作方案。本指南虽然未覆盖免疫印迹实验中所有可能发生的情况, 但可作为了解该技术的操作方法、限制因素和应用前景的概述。

我们为免疫印迹实验提供种类丰富的蛋白预制胶、电泳缓冲液、封闭和洗涤缓冲液、一抗和二抗、化学发光底物、胶片、成像系统和相关免疫印迹辅助试剂与仪器。请浏览最后一页的相关产品列表, 或登录 www.thermofisher.com/western 了解更多信息。

一. 常规免疫印迹实验方案

1. 利用凝胶电泳分离样本中的蛋白质。
2. 配制转印缓冲液: 将Tris-甘氨酸转印缓冲液溶解于400 mL 超纯水和100 mL 甲醇中 (25 mM Tris、192 mM甘氨酸, pH 8.0、20%甲醇)。在4°C下使用并保存转印缓冲液。
3. 制备凝胶“三明治”(图4)用于湿式转印。对于半干式转印, 在阳极和阴极之间以相同的顺序制备三明治。

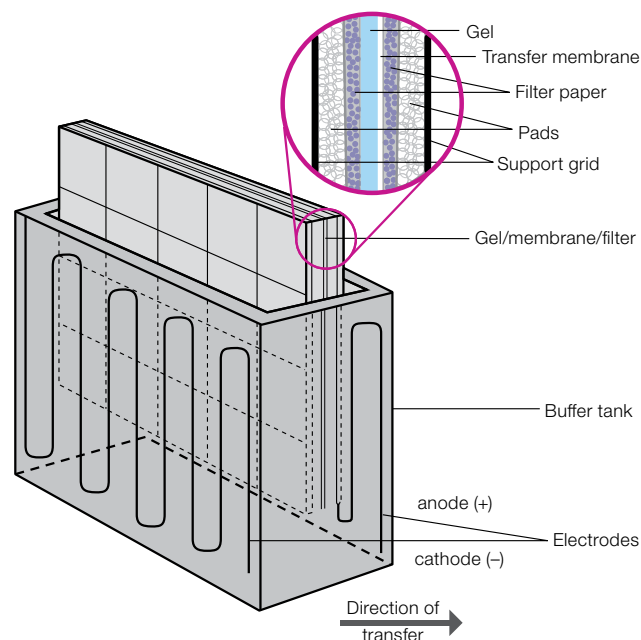


图4.电转设置方法

- 将蛋白质从凝胶转移至膜上。对于湿式转印, 使用适用于 8x10cm 凝胶的小型转印装置, 40 V 转印90分钟, 使缓冲液温度保持在4°C。对于半干式转印, 使用15V转印90分钟。
- 取下膜, 室温下使用封闭缓冲液孵育20-60分钟, 以封闭非特异性结合位点。
- 使用含10%封闭液的一抗溶液(参见表3)孵育印迹膜, 孵育 1 小时。如果需要, 可以2-8°C过夜孵育印迹膜。
- 使用含0.05% Tween-20 的Tris缓冲液(TBS)、磷酸盐缓冲液(PBS)或其他生理洗涤缓冲液漂洗膜3次, 每次5分钟。如果使用直标一抗, 则跳至第10步。
- 使用含10% 封闭液的酶标二抗 (参见表4) 孵育印迹膜, 室温孵育1小时。
- 在漂洗缓冲液中漂洗膜5次, 每次5分钟, 去除未结合的抗体。进行酶标二抗孵育后, 必须彻底漂洗膜。
- 配制底物。使用足够体积以确保印迹膜被底物完全浸湿, 且不会变干 (0.1 mL/cm²)。
- 使用Pierce ECL 底物孵育印迹膜1 分钟, 使用SuperSignal 底物则孵育5分钟。
- 从底物中取出印迹膜, 将其置于塑料膜保护装置上。塑料片保护装置可以很好地发挥作用, 但也可以使用保鲜膜。去除印迹膜与膜保护装置表面之间的全部气泡。

- 通过胶片曝光或CCD 成像系统对印迹膜进行成像。

你知道吗?

- 使用我们的Invitrogen™ iBlot 2干式转印系统或Power Blotter快速半干转印系统, 你可以在10分钟内完成转印步骤。如需了解更多信息, 请登录thermofisher.com/transfer
- 所有封闭、抗体孵育和漂洗步骤均可自动化操作。使用我们的Invitrogen™ iBind™ 和iBind™ Flex全自动蛋白质免疫印迹处理系统。如需了解更多信息, 请登录 thermofisher.com/ibind

二. 抗体剥离实验方案

- 配制剥离缓冲液。推荐从下列剥离缓冲液中选择使用:
 - Thermo Scientific Restore™ 抗体剥离缓冲液 (货号21059)
 - Thermo Scientific Restore™ Plus 加强型抗体剥离缓冲液 (货号46428)
 - 0.1 M 甘氨酸•HCl (pH 2.5-3.0)
 - 50 mM Tris•HCl (pH 7)、2% 十二烷基硫酸钠 (SDS)、50 mM 二硫苏糖醇 (DTT)
- 将需要剥离的印迹膜置于剥离缓冲液中。使用足够体积的缓冲液, 以确保印迹膜完全浸湿(8x10cm印迹膜需要约20mL 的缓冲液)。

表3.使用Thermo Scientific™ 化学发光底物时建议的一抗浓度

底物	Pierce ECL	Pierce ECL Plus	SuperSignal West Pico PLUS	SuperSignal West Dura	SuperSignal West Femto
推荐的一抗稀释度	1:1,000	1:1,000	1:1,000	1:5,000	1:5,000

表4.使用Thermo Scientific™ 化学发光底物时建议的二抗浓度

底物	Pierce ECL	Pierce ECL Plus	SuperSignal West Pico PLUS	SuperSignal West Dura	SuperSignal West Femto
推荐的二抗稀释度	1:1,000–1:15,000	1:25,000–1:200,000	1:20,000–1:100,000	1:50,000–1:250,000	1:100,000–1:500,000

3. 室温孵育5-15分钟。优化孵育时间和温度是获得最佳结果的关键。有时需要孵育至少15分钟,并在37°C下进行。如果使用低pH的甘氨酸缓冲液,则需在70°C下孵育30分钟。
4. 从剥离缓冲液中取出印迹膜,使用漂洗缓冲液(含0.05% Tween-20 的PBS/TBS或其他生理缓冲液)漂洗。
5. 如需检测酶标二抗和一抗是否彻底去除,可进行下列检测。如果检测到信号,则重复步骤2-4,再次剥离5-15分钟或提高温度至37°C。优化剥离时间和温度可确保抗体全部去除,同时防止破坏抗原。
 - 要检测酶标二抗是否彻底去除,可直接使用底物孵育膜后对印迹膜进行成像。胶片曝光5分钟后,如果未检测到信号,则表示已成功从膜上去除了酶标二抗。
 - 要检测一抗是否彻底去除,可使用酶标二抗孵育膜,然后使用漂洗缓冲液漂洗。加入底物孵育后对印迹膜进行成像。胶片曝光5分钟后,如果未检测到信号,则表示已成功从膜上去除了一抗。
6. 确定抗体完全剥离后,开始第二次检测。一般而言,印迹膜可以剥离并重复检测多次,但可能需要更长的曝光时间或更灵敏的底物。如果抗原不稳定,重新检测可能会导致信号减弱。如果你需要通过检测看家基因表达的蛋白,对样本上样量进行均一化,建议首次曝光时先检测目标蛋白,以防印迹剥离后信号减弱。

化学发光免疫印迹的优化方案

一. 抗原浓度的优化

1. 在SDS-PAGE样本缓冲液中配制不同浓度的蛋白样本,并检测各种样本浓度。样本浓度需要在所用底物的检测范围内。
2. 将相同体积的各个浓度样本上样至凝胶,进行电泳分离。将样本转印至膜上。
3. 使用标准的封闭试剂封闭膜,使用一抗和酶标二抗进行孵育。如果不确定最佳稀释比例,则根据底物的灵敏度使用中间范围的稀释度。

4. 漂洗膜并加入底物,对印迹膜进行成像。

二. 膜封闭的优化

1. 电泳分离蛋白质样本并转印至膜上,或按“信号采集”一节所述将蛋白质样本点布于膜上。
2. 根据设定的检测条件数目,将膜剪裁为膜条。使用下列组合检测每种封闭液:
 - 封闭液 + 一抗 + 酶标二抗 + 底物
 - 封闭液 + 酶标二抗 + 底物
 - 封闭液 + 底物
3. 将膜条置于各种封闭试剂中,确保膜条完全浸于溶液内。室温下摇晃孵育各膜条1小时。
4. 加入含有10%(v/v)封闭试剂的一抗至对应的组内。将其他组的膜条保留在封闭液中直至开始检测。如果不确定最佳稀释比例,则根据底物的灵敏度使用中间范围的稀释度。
5. 除“封闭液+底物”组外,其他组都加入含有10%(v/v)封闭试剂的酶标二抗溶液,如果不确定最佳稀释比例,则根据底物的灵敏度使用中间范围的稀释度。
6. 漂洗膜并加入底物,对印迹膜进行成像。

三. 一抗浓度的优化

1. 电泳分离蛋白质样本,转印至膜上。或者按“抗原浓度的优化”一节所述,将蛋白质样本点布于膜上。使用适当的封闭试剂封闭膜。根据待检测的一抗稀释液数目,将膜剪裁为膜条。
2. 使用含10%封闭试剂(v/v)的漂洗缓冲液制备一抗稀释液,加至膜条上。室温下孵育1小时。
3. 洗涤膜条,加入酶标二抗室温孵育1小时。再次洗涤,使用适当的底物激发信号。通过胶片曝光或CCD成像系统检测信号。

四. 膜漂洗的优化

1. 使用漂洗缓冲液,如含0.05%Tween-20的PBS或TBS或其

他生理缓冲液。

2. 一抗孵育后漂洗膜至少3次, 每次5分钟, 酶结合物孵育后漂洗至少5次, 每次5分钟。
3. 如果最后检测显示非特异性背景, 则使用更大体积的漂洗缓冲液或增加漂洗次数和时间。如果仍未改善, 则可能是其他步骤存在问题。

五. 酶标二抗浓度的优化

测定新免疫印迹体系的最佳浓度时, 一个简单的实验有助于避免信号变化导致的失败。

1. 在三个 (或更多) 凝胶孔中加入相同量的目的蛋白。
2. 电泳分离蛋白质样本, 转移至膜上。封闭非特异性结合位点, 使用一抗检测。
3. 洗涤后, 从印迹膜上切下包含靶蛋白的膜条。
4. 使用不同浓度的酶标二抗检测各膜条。例如, 对于 SuperSignal West Pico PLUS 底物, 使用 1:40 K、1:60 K 和 1:80 K 的稀释度(从1 mg/ml 储存溶液)。室温摇晃孵育膜条1小时。
5. 冲洗膜条并加入底物。底物孵育后, 对膜条进行成像。
6. 等待1-2小时后再次对膜条进行成像。
7. 评估结果。例如, 如果第二次曝光使用1:80K稀释可以获得信号, 而其他两个信号很微弱, 则1:80K稀释度最接近

最佳条件。但是如果1:40K稀释可以获得很强的信号, 而其他两个信号很微弱, 则浓度更高的稀释度更接近最佳条件。

六. 检测方法的优化

1. 电泳分离蛋白质样本, 并转移至膜上或按“抗原浓度优化”章节所述将蛋白质样本点布于膜上。
2. 封闭非特异性结合位点并使用一抗和含有10%封闭剂 (v/v)的酶结合物进行检测。
3. 如果抗体浓度未经过优化, 则选择中间范围的数值。每次孵育后洗涤膜。
4. 根据设定的底物曝光条件数目, 从膜上切下膜条。配制底物工作液待用。
5. 按照底物说明书, 使用底物孵育膜条一段时间。
6. 用镊子从底物中取出膜条, 轻拍边缘使之位于纸巾上, 去除多余的底物。
7. 将膜条置于塑料盖上, 使用不同的时长对印迹膜进行成像。选择信号清晰且背景较低的时间点。

引用文献

1. Bers G and Garfin D (1985) Protein and nucleic acid blotting and immunobiochemical detection. *Biotechniques* 3:276-88.
2. Bjerrum OJ , Heegaard NHH, editors (1988) *Handbook of Immunoblotting of Proteins*. Volume 1. Technical Descriptions: CRC Press, Boca Raton.
3. Bollag DM et al., editors (1996) *Protein Methods*. Second Edition. New York (NY) Wiley-Liss, Inc.
4. Einarson MB. and Orlinick JR (2002) Identification of protein-protein interactions with glutathione-S-transferase fusion proteins. In: Golemis E (editor), *Protein-Protein Interactions*. Cold Spring Harbor Laboratory Press pp37-57.
5. Gallagher S (1996) Immunoblot Detection. In: *Current Protocols in Protein Science*. New York: John Wiley and Sons, Inc. pp.10.10.1-10.10.11.
6. Gershoni J (1988) Protein blotting. *Meth Biochem Anal* 33:1-58.
7. Gershoni JM, Palade GE (1983) Protein blotting: principles and applications. *Anal Biochem* 131:1-15.
8. Gershoni JM, Palade GE (1982) Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to a positively charged membrane filter. *Anal Biochem* 124:396-405.
9. Hall RA (2004) Studying protein-protein interactions via blot overlay or Far Western blot. *Methods Mol Biol* 261:167-74.
10. Harlow E, Lane D (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*. New York (NY) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
11. Malik VS, Lillehoj EP (1994) *Antibody Techniques*. San Diego (CA) Academic Press, Inc.
12. Ramlau J (1987) Use of secondary antibodies for visualization of bound primary reagents in blotting procedures. *Electrophoresis* 8:398-402.
13. Spinola SM, Cannon JG (1985) Different blocking agents cause variation in the immunologic detection of proteins transferred to nitrocellulose membranes. *J Immunol Meth* 81:161.
14. Towbin H, Gordon, J (1984) Immunoblotting and dot immunoblotting – Current status and outlook. *J Immunol Meth* 72:313-40.
15. Towbin H et al. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:4350-4354.
16. Ursitti JA. et al. (1995).Electroblotting from Polyacrylamide Gels. In: *Current Protocols in Protein Science*. New York (NY) pp. 10.7.1-10.7.14. John Wiley and Sons, Inc.
17. Young PR (1989) An improved method for the detection of peroxidase conjugated antibodies on immunoblots. *J Virol Meth* 24:227-236.

订购信息

产品	规格	货号
蛋白质电泳		
Mini Gel Tank and Blot Module 套餐	1套	NW2000
PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa	10 x 250 μL	26617
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa	10 x 250 μL	26620
NuPAGE Bis-Tris中性pH预制胶	多种	多种
NativePAGE Bis-Tris 非变性预制胶	多种	多种
PowerEase™ 300W 电源 (230 VAC)	1台	PS0301

如需查看其他产品, 请登录 thermofisher.com/proteinelectrophoresis

蛋白质转印

小型湿转模块	1个	B1000
PVDF膜, 0.45 μm, 26.5 cm x 3.75 m	1卷	88518
Pierce一步法转印缓冲液	200 mL	84742
iBlot 2干式转印设备	1台	IB21001
Power Blotter系统	1台系统	PB0012
Power Blotter XL系统	1台系统	PB0013

如需查看其他产品, 请登录 thermofisher.com/proteintransfer

封闭缓冲液

SuperBlock (PBS) 封闭缓冲液	1 L	37515
SuperBlock (TBS) 封闭缓冲液	1 L	37535
SuperBlock T20 (PBS) 封闭缓冲液	1 L	37516
SuperBlock T20 (TBS) 封闭缓冲液	1 L	37536
SuperBlock (PBS) 封闭缓冲液——印迹	1 L	37517
SuperBlock (TBS) 封闭缓冲液——印迹	1 L	37537
Pierce无蛋白 (PBS) 封闭缓冲液	1 L	37572
Pierce无蛋白 (TBS) 封闭缓冲液	1 L	37570
Pierce无蛋白T20 (PBS) 封闭缓冲液	1 L	37573
Pierce无蛋白T20 (TBS) 封闭缓冲液	1 L	37571
StartingBlock (PBS) 封闭缓冲液	1 L	37538
StartingBlock (TBS) 封闭缓冲液	1 L	37542
StartingBlock T20 (PBS) 封闭缓冲液	1 L	37539
StartingBlock T20 (TBS) 封闭缓冲液	1 L	37543
Pierce快速封闭缓冲液	500 mL	37575

如需查看其他产品, 请登录 thermofisher.com/blockingbuffers

产品	规格	货号
自动化蛋白质免疫印迹处理系统		
iBind Flex蛋白质免疫印迹处理系统套装	1 kit	SLF2000S
iBind蛋白质免疫印迹处理系统套装	1 kit	SLF1000S

如需查看其他产品, 请登录 thermofisher.com/ibindflex

化学发光底物

Pierce ECL蛋白质免疫印迹底物	500 mL	32106
Pierce ECL Plus蛋白质免疫印迹底物	100 mL	32132
SuperSignal West Pico Plus化学发光底物	500 mL	34580
SuperSignal West Dura化学发光底物	200 mL	34076
SuperSignal West Femto最高灵敏度化学发光底物	200 mL	34096

如需查看其他产品, 请登录 thermofisher.com/chemisubstrates

CCD成像系统

iBright CL1000成像系统	1台	A32749
iBright FL1000成像系统	1台	A32752

如需查看其他产品, 请登录 thermofisher.com/ibright

剥离缓冲液

Restore抗体剥离缓冲液	500 mL	21059
Restore PLUS加强型抗体剥离缓冲液	500 mL	46430

如需查看其他产品, 请登录 thermofisher.com/strippingbuffers

X光胶片

CL-XPosure胶片, 13 x 18 cm	100张	34090
--------------------------	------	-------

如需查看其他产品, 请登录 thermofisher.com/film

抗体

Invitrogen一抗和二抗, 用于蛋白质免疫印迹分析	多种	多种
------------------------------	----	----

如需了解更多信息, 请登录 thermofisher.com/antibodies

了解更多信息, 请登录 thermofisher.com/western



赛默飞
官方微信



赛默飞
生命科学官方微信

免费服务电话: 800 820 8982/400 820 8982

信息咨询邮箱: cnbidmarketing@thermofisher.com

ThermoFisher
SCIENTIFIC