

蛋白转印 与印迹检测 技术手册



助您获得发表级结果的技术与研究工具

目录

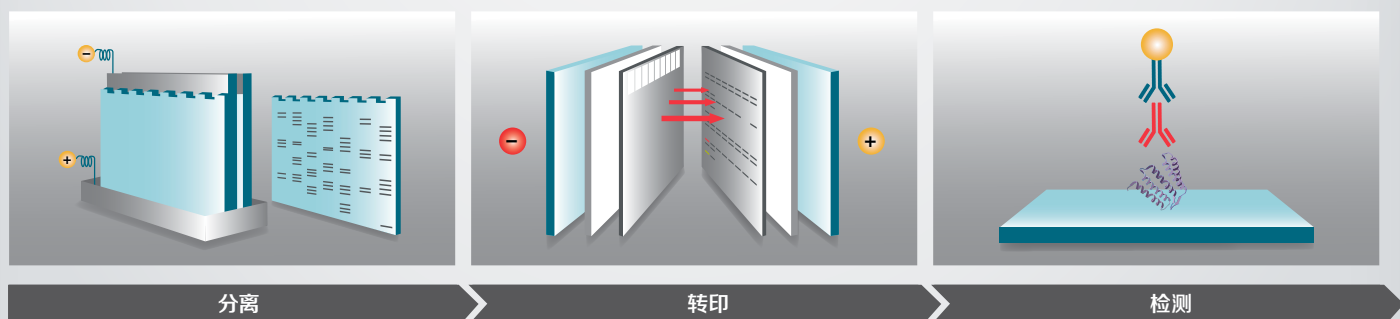
蛋白免疫印迹法概述	4
转印	5
蛋白免疫印迹转印方法简介	5
蛋白免疫印迹的转印系统	6
• 湿式转印 (槽式转印)	7
• 半干式转印	10
• 干式转印	13
转印前的注意事项	16
• 转印系统的选择	16
• 组装蛋白免疫印迹三明治	16
• PVDF 膜	17
• 滤纸	19
• 选择蛋白分子量标准的考虑因素	20
• 转印缓冲液	22
转印后	24
• 监测转印效率	24

检测	27
蛋白免疫印迹检测的注意事项	27
• 信噪比	27
• 直接检测法与间接检测法	27
• 手动与自动蛋白免疫印迹流程的比较	28
• 自动化处理系统	29
膜的封闭	32
膜的抗体孵育	34
• 抗体和抗体-酶偶联物的储存条件	38
• 膜的漂洗	40
检测方法概述	41
• 化学发光蛋白免疫印迹检测法	42
• 显色蛋白免疫印迹检测法	50
• 荧光蛋白免疫印迹检测法	56
• 化学发光和荧光检测的数据采集	58
• 蛋白免疫印迹检测的归一化和定量	63
检测后和信号增强	65
• 印迹剥离和再次检测	65
• 信号增强	69
特殊检测试剂	71
附录	72
• 常见问题排查指南	72
— 化学发光蛋白免疫印迹	72
— 荧光蛋白免疫印迹	74
• 快速参考方案和缓冲液配方	75
订购信息	76

蛋白免疫印迹法概述

蛋白免疫印迹法由 Towbin 等人^[1] 于 1979 年发明, 现在是广泛采用的基础蛋白分析手段。蛋白免疫印迹法也称作蛋白印迹法或Western blot。它使用抗体来识别经电泳分离并转印到膜上的特定蛋白质靶标。抗体-抗原相互作用的特异性使其能够在复杂的蛋白质混合物(例如, 细胞裂解液或组织裂解液)中检测到靶蛋白。蛋白免疫印迹法可用于目标蛋白的定性和半定量分析。

在本手册中, 您可以找到相关的信息, 为您的蛋白免疫印迹选择合适的蛋白质转印和检测方法。您也可以找到常见问题排查指南、操作视频、选择指南和缓冲液配方, 助您轻松获得理想结果。



了解关于所有产品的完整列表和更多信息, 请浏览

thermofisher.com/westernblot

转印

蛋白免疫印迹转印方法简介

将蛋白质从凝胶转印到膜上之所以很重要，原因有两个：在蛋白免疫印迹处理过程中，凝胶易碎，印迹膜则具有更好的处理能力，而且像抗体这样的大分子可更好地靶向膜上的蛋白质。一般来说，所有的电转印法都依赖于蛋白质的电泳迁移率，以将蛋白质移出凝胶。该技术将含蛋白质的聚丙烯酰胺凝胶与一张硝酸纤维素膜或PVDF膜或其他合适的蛋白质结合载体直接接触。然后，将凝胶和转印膜夹在两块电极之间，这两块电极通常被浸在导电溶液（转印缓冲液）中（图 1）。施加电场时，蛋白质会迁移出凝胶，然后紧紧附着在膜表面。所以转印后的膜可以体现凝胶中的蛋白条带迁移模式。要了解完整的工作流程，请参见图 2。电转印出现之前，最流行的蛋白质转印法是扩散转印法，平均需要 1.5-2 天时间。相比之下，现在常见的干式电转印平均时间不到 10 分钟。在本手册中，我们将只论述电转印，并将其称为转印或印迹。

为实现蛋白免疫印迹分析，有三种办法可以将蛋白质从SDS-PAGE 或非变性凝胶转印到硝酸纤维素膜或 PVDF 膜上：湿式转印（也称作电泳槽转印）、半干式转印和干式转印。本手册将重点介绍这三种技术和其他注意事项，助您提高蛋白质转印效率并获得更好的蛋白免疫印迹结果。



小知识

西雅图 Fred Hutchinson 癌症研究中心 Tobert Nowinski 实验室的 W. Neal Burnette 是第一个创造“蛋白免疫印迹” (western blotting) 这一术语的人。该术语是为了纪念 DNA 印迹 (blotting) 的命名者 Edwin Southern，也引用了 Nowinski 实验室的位置，即西 (West) 海岸。

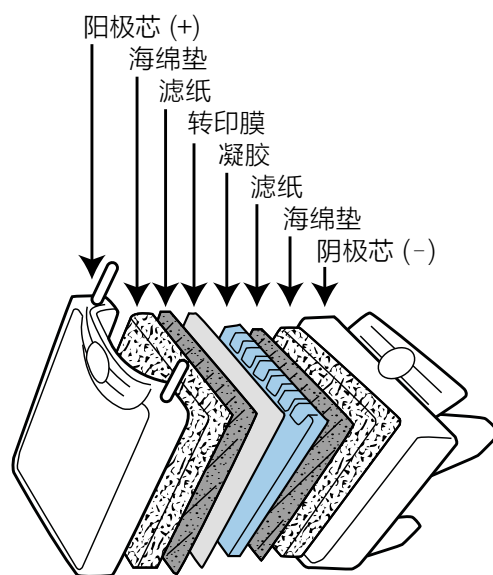


图 1. 蛋白免疫印迹电转印将蛋白质从凝胶转印到膜上。虽然该图展示的是常见的湿式转印设置，但许多原理也适用于半干式和干式的蛋白质转印方法。

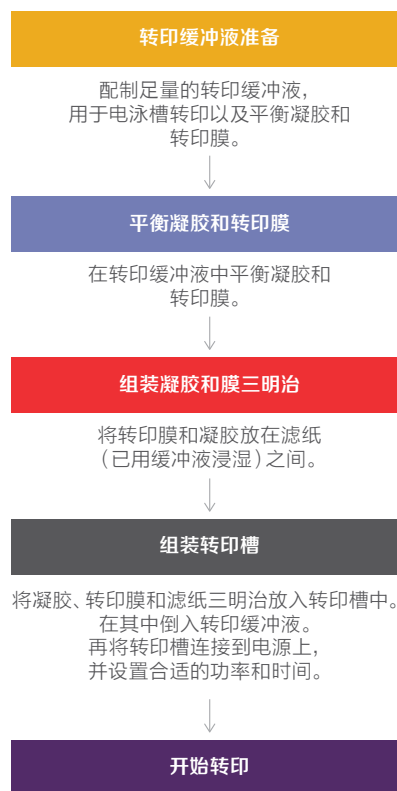


图 2. 蛋白免疫印迹工作流程：蛋白质的电泳槽转印

蛋白免疫印迹的转印系统

所有新式蛋白免疫印迹转印法都依赖于蛋白质的电泳迁移率。当电场施加在转印三明治或膜组上时，蛋白质会移出聚丙烯酰胺凝胶并转印到硝酸纤维素膜或 PVDF 膜上，从而在印迹膜上复制凝胶中的蛋白分离模式。湿式、半干式和干式转印法是常用的电转印法。这些方法之间的主要区别在于缓冲液用量和转印速度。在传统的湿式转印系统中，将滤纸-转印膜-凝胶三明治浸没在含有转印缓冲液的电泳槽里。电流通过缓冲液驱动蛋白质从凝胶转印到膜上。对于半干式转

印，转印膜和凝胶夹在浸有转印缓冲液的滤纸间。这种湿润的滤纸作为缓冲液池，以支持转印。在电场力作用下，驱动电荷穿过滤纸，将蛋白质从凝胶转印到膜上。在干式转印系统中，转印膜-凝胶三明治放置在含有离子的特殊凝胶基质之间。施加电流时，这些离子开始移动，从而将蛋白质从蛋白凝胶转移到膜上。在表 1 中，我们为所提供的每种转印系统进行了总结。

表 1. Invitrogen™ 转印系统的特点。

湿式转印			半干式转印	干式转印
				
Mini Blot 小型转印模块	XCell II 转印模块	SureLock Tandem 中型转印模块	Power Blotter 半干式快 速转印系统	iBlot 2 凝胶转印装置
处理量： 每个模块可转印 1 块小型凝胶；每个电泳槽可容纳 1-2 个模块	处理量： 最多 2 个小型凝胶	处理量： 每个模块可转印 1 块中型凝胶；每个电泳槽可容纳 1-2 个模块	处理量： 1-4 块小型凝胶或 1-2 块中型凝胶	处理量： 1-2 块小型凝胶或 1 块中型凝胶
转印时间： 60 分钟	转印时间： 60-120 分钟	转印时间： 30 分钟	转印时间： 7-10 分钟	转印时间： 7 分钟
转印区域： 9 x 9 cm	转印区域： 9 x 9 cm	转印区域： 9.2 x 14.4 cm	转印区域： 10 x 18 cm 或 21 x 22.5 cm	转印区域： 8.5 x 13.5 cm
转印缓冲液用量： 每个模块 220 mL	转印缓冲液用量： 200 mL	转印缓冲液用量： 每个模块 300 mL	转印缓冲液用量： 预剪裁膜和滤纸：50–100 mL；预组装转印膜组：不需要缓冲液	转印缓冲液用量： 不需要缓冲液
电源： 外部	电源： 外部	电源： 外部	电源： 内置	电源： 内置
所需装置： Mini Gel Tank	所需装置： XCell SureLock Mini-Cell	所需装置： SureLock Tandem Midi Gel Tank	独立转印系统，不限电泳槽	独立转印系统，不限电泳槽

湿式转印（槽式转印）

湿式（电泳槽）转印系统是最常用的转印系统，半干式和干式转印技术是在传统的湿式（电泳槽）转印技术上改进的。在这种方法中，首先在转印缓冲液中平衡凝胶。然后将凝胶放入转印三明治（滤纸-凝胶-转印膜-滤纸）中，用垫子垫住，并用支撑格栅压在一起。将组装好的凝胶三明治垂直放置在不锈钢/铂丝电极之间的槽中，并在槽中注入转印缓冲液（图 3）。

可以使用常规转膜条件进行多块凝胶的电转印，在恒定电流（0.1-1 A）或电压（5-30 V）下，湿转可快至30分钟完成，也可过夜湿转。转印时通常使用冰袋或在 4°C 下进行，以减少发热的影响。

在湿式转印中，低分子量蛋白质的转印效率通常高于高分子量蛋白质，对于 14-116 kDa 的蛋白质，转印效率通常为 80-100%^[2]。转印效率会随着转印时间的增加而提高。然而，随着转印时间的增加以及使用较大孔径（0.45 μm）的膜时，蛋白质完全穿过膜的风险会增加，特别是分子量较低（<30 kDa）的蛋白质。

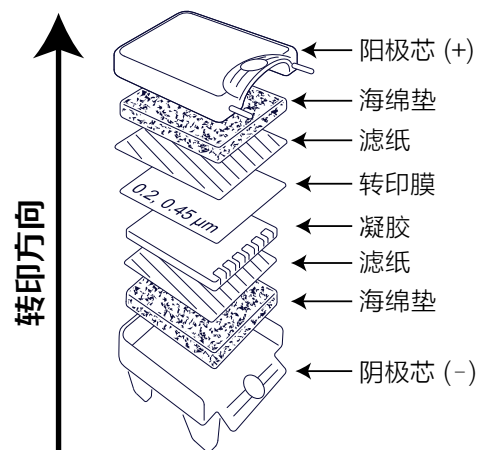


图 3.用于蛋白免疫印迹的电泳槽（湿式）转印装置中的凝胶-转印膜三明治组装细节。常见的蛋白免疫印迹仪器的组装示意图，包括凝胶和转印膜的位置，以及蛋白质相对于电极位置的转印方向。



小知识

在许多情况下，转印缓冲液中的甲醇可使用乙醇替代，而不影响转印效率。

Mini Blot Module小型转印模块

防漏液且节省缓冲液的湿转系统

Invitrogen™ Mini Blot 是一款快速的小型湿转模块，专用于 Minii Gel Tank 小型电泳槽，旨在使您的蛋白免疫印迹操作简单方便。电泳槽的每个槽室能容纳一个 Mini Blot 模块，即 Mini Gel Tank 电泳槽可并排容纳两个湿转模块。流畅且易用的设计使模块的使用更加方便，并且单次湿转所需的甲醇转印缓冲液用量都显著少于其他湿转系统。在建议条件和恒定电压下，蛋白质通常能在30-60分钟内转印到硝酸纤维素膜或 PVDF 膜上(图 4)。

特点:

- **通用模块设计** — 湿转模块可放置在电泳槽的任一槽室中, 简化转印设备的组装
- **独特胶条密封** — 有助于防止漏液, 避免组装蛋白湿转模块时一片狼藉
- **更省缓冲液** — 每次转印只需 220mL甲醇转印缓冲液, 可节省缓冲液和处置的成本
- **标准的60分钟转印方案** — 加速蛋白质免疫印迹实验进程, 帮助你更快获取结果
- **耐用的电极和钢板** — 实现高效可靠的蛋白免疫印迹转印

观看操作视频:

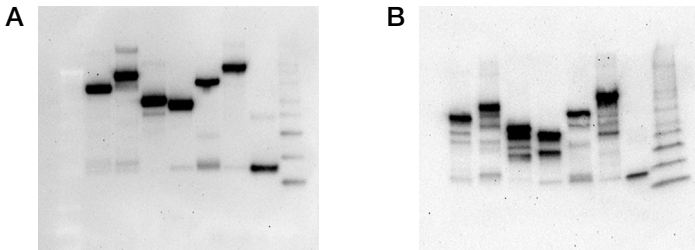
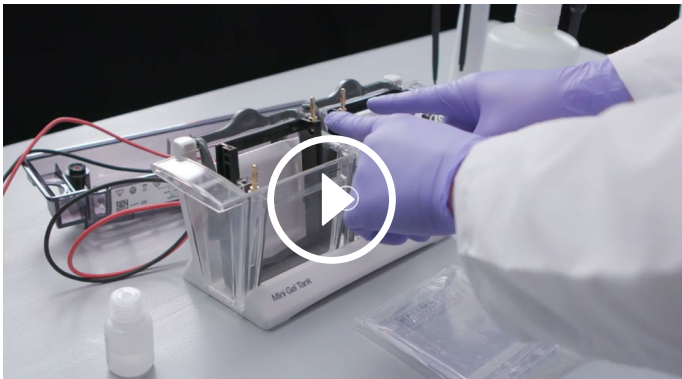


图 4.使用 Bolt Bis-Tris Plus 凝胶系统进行电泳, 然后使用 Mini Blot 模块进行湿式转印, 得到的蛋白免疫印迹的结果显示, 条带锐利且蛋白完整不降解, 而 Bio-Rad™ TGX™ 预制胶的蛋白免疫印迹展示出多种低分子量的降解产物。在 (A) Bolt Bis-Tris Plus 预制胶和 (B) Bio-Rad TGX Tris-甘氨酸预制胶上分析了与癌症有关的蛋白激酶 (IKKB、HCK、EPHB3、MAPK14、FLT1 和 DDR2)。根据每个制造商的方案制备蛋白质样品, 并进行电泳。纯化激酶 (每个 50 ng) 作为 GST 融合蛋白, 与 MagicMark XP 蛋白标准品和纯化重组 GST 一起, 上样到 Bolt 4-12% 预制胶和 Bio- Rad TGX 4-20% 预制胶上。使用 Bolt 预制胶和 Mini Blot 模块或在 Bio-Rad 转印系统进行转印。最后使用 GST 抗体和 Invitrogen™ WesternBreeze™ 化学发光试剂盒进行印迹检测。

规格	
转印模式	湿式
凝胶兼容性	NuPAGE Bis-Tris、Tris-乙酸、Tris-甘氨酸、Tricine 和 Bolt Bis-Tris Plus 预制胶; 使用 Invitrogen™ SureCast™ 系统制备的手灌胶
运行尺寸	垂直
通量	≤2 个转印模块/小型凝胶电泳槽; 1 块小型凝胶/转印模块
凝胶尺寸	小型 (8 x 8 cm)

推荐产品

建议将 Invitrogen™ PowerEase™ Touch 350W 电源、预剪裁硝酸纤维素膜或 PVDF 膜与 Mini Blot 转印模块一起使用。

了解更多信息, 请浏览 thermofisher.com/minigeltank



XCell II Blot 转印模块

将 XCell SureLock 和 XCell II Mini-Cell 搭配使用作为您的蛋白湿转装置

Invitrogen™ XCell II™ Blot转印模块可轻松地将蛋白质或核酸从小型凝胶转印到膜上。适用于Invitrogen™ XCell SureLock™ 和 XCell II™ Mini-Cell 系统,可放置在凝胶/缓冲液核心组件的位置。对于蛋白免疫印迹、DNA 印迹和 RNA 印迹的转膜仅需不到 200 mL 的缓冲液。坚固的镀铂钛和不锈钢电极可形成均匀的电场,无需使用夹具或铰链式凝胶支架。

特点:

- **节约经费** — 仅需 200 mL 的甲醇缓冲液,节省成本
- **灵活** — 可容纳最大为 8 x 8 cm 的凝胶
- **坚固的电极和钢板** — 实现高效可靠的蛋白免疫印迹转印

规格	
转印模式	湿式
凝胶兼容性	NuPAGE Bis-Tris 和 Tris-乙酸、Bolt Bis-Tris Plus、Novex Tris-甘氨酸、Novex TBE 和 Novex TBE-Urea 小型预制胶; 使用 SureCast 系统制备的手灌胶
运行方向	垂直
通量	最多 2 块小型凝胶
凝胶尺寸	小型 (8 x 8 cm)

推荐产品

推荐将 XCell II Blot 转印模块与PowerEase Touch 350W 电源、预剪裁硝酸纤维素膜或 PVDF 膜一起使用。



SureLock Tandem 中型转印模块

Invitrogen™ SureLock™ Tandem 中型电泳槽设计独特、方便可靠,能对高性能 Invitrogen™ 中型预制胶进行凝胶电泳和蛋白质转印。在该电泳槽中搭配使用 SureLock Tandem 中型转印模块时,能在30分钟内完成高效的室温湿式转印,以供下游进行蛋白免疫印迹分析。该电泳槽能容纳两个转印模块,从而同时进行一块或两块中型凝胶的转印。SureLock Tandem Midi Blot 模块设计独特,比其他中型湿式转印系统使用的转印缓冲液要少得多(每次转印仅需约 300mL)。这种低缓冲液用量需求可减少有害的含甲醇废液量。

特点:

- **2 合 1 中型凝胶电泳和转印槽** — 无需为蛋白转印购买单独的湿转槽
- **两个独立槽室** — 运行 1 块或 2 块凝胶的电泳或转印时,每块凝胶所需的缓冲液用量更少,最大程度降低缓冲液成本 and 废液处理成本
- **使用快速转印方案实现最佳性能** — 室温下可于30分钟内高效完成转印; 无需预冷缓冲液和繁琐的冰浴处理

规格	
转印模式	湿式
凝胶兼容性	NuPAGE Bis-Tris、NuPAGE Tris-乙酸和 Novex Tris-甘氨酸 Plus 中型预制胶
运行方向	垂直
通量	2 个转印模块/中型电泳槽; 1 块中型凝胶/转印模块
凝胶尺寸	中型 (8 x 13 cm)

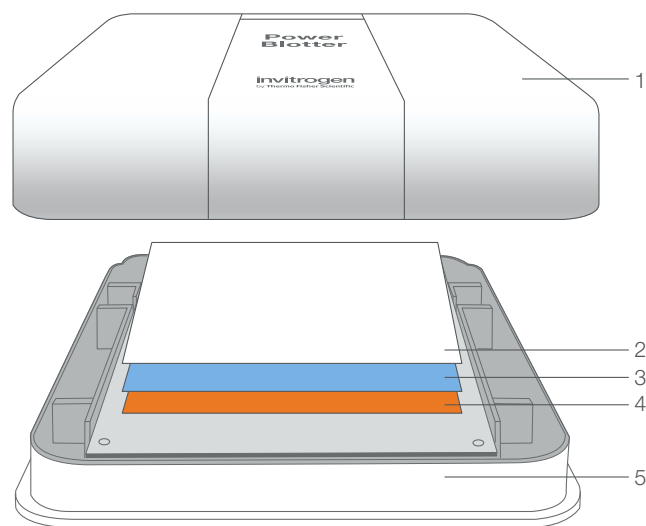
观看关于 SureLock Tandem 中型电泳槽和转印模块的操作视频, 请点击[此处](#)。

了解更多信息, 请浏览 thermofisher.com/wettransfer

半干式转印

随着我们对转印速度的要求越来越高, 半干式转印也应运而生。在半干式蛋白质转印系统中, 转印三明治被水平放置在两个电极板之间(图5)。使用这种方法提高转印速度的关键是使用穿过凝胶的电流替代围绕凝胶的电流, 并最大限度的提高电流。转印过程中使用的缓冲液量仅限于转印三明治中包含的缓冲液量。因此, 转印膜和滤纸要按照凝胶的尺寸切割, 不能有突出部分, 而且凝胶和滤纸要在转印缓冲液中完全平衡。此外, 在某些半干式转印装置中使用特厚滤纸(约3 mm厚), 因为这些滤纸可以容纳更多的转印缓冲液。

可以使用甲醇当做转印缓冲液, 但不应加入其他有机溶剂(包括芳香烃类、氯化烃类和丙酮), 以免损坏电极板。快速转印的半干式技术使用更高离子强度的转印缓冲液和高电流电源, 将转印时间缩短到10分钟以内。这时, 电流保持恒定, 电压限制在最大 25 V。半干式装置可以恒定的电流(0.1- 约 0.4 A)或电压(10-25 V)进行 30-60分钟的传统 Towbin 缓冲液转印。



- 1 阴极
- 2 转印凝胶层(阴极)
- 3 凝胶
- 4 转印凝胶层(阳极), 转印膜在上面
- 5 阳极

图 5.半干式电转印。滤纸-凝胶-转印膜-滤纸结构的转印三明治被水平放置在两个电极板之间, 用于半干式转印。预浸泡的滤纸作为离子池, 以加快转印。



小知识

在转印缓冲液中添加SDS会提高转印过程中的相对电流、功率和温度, 还可能影响抗体对某些蛋白质的识别。

Power Blotter 系统

在10分钟内高效完成半干式转印

精心设计的Invitrogen™ Power Blotter和 Power Blotter XL系统, 能在7-10分钟内将蛋白质从聚丙烯酰胺凝胶快速转印到硝酸纤维素膜或PVDF 膜上(图 6)。Power Blotter 具有经过优化的集成电源, 可实现稳定且高效的蛋白质转印。

特点:

- **高效** — 与传统的半干式或湿式转印法相比, 能高效地转印分子量范围较宽的蛋白质(图 7)
- **快速** — 与Invitrogen™ Power Blotter 预组装转印膜组或 Invitrogen™ Power Blotter 1-Step转印缓冲液一起使用时, 可在7-10分钟内完成转印
- **集成式电源** — 可在基座和卡匣之间无缝操作; 无需外部电源
- **触摸屏和预编程序** — 使用预设转印程序或自定义转印程序, 方便快捷
- **灵活** — 使用Power Blotter系统转印1-2 块小型凝胶或1块中型胶; 使用Power Blotter XL系统转印1-4块小型胶或1-2块中型凝胶
- **通用性** — 与 Power Blotter 预组装转印膜组和 Invitrogen™ Pierce™ 1-Step 转印缓冲液搭配, 用于快速转印, 或与 Towbin 转印缓冲液搭配, 用于传统半干式转印



Power Blotter 系统和 Power Blotter XL 系统使用方便, 都具有彩色 LCD 触摸屏界面, 并针对不同数量和大小凝胶和蛋白分子量提供预设转印程序。触摸屏编程功能便于自定义快速创建、保存和运行转印程序。这两个系统在与 Power Blotter 预组装转印膜组一起使用时都能在7分钟内完成高效的转印, 或与 Power Blotter 1-Step 转印缓冲液一起使用时在10分钟内完成转印。对于传统缓冲液, 使用这些仪器也可以满足30-60分钟标准半干式转印方案。



图 6. Power Blotter 系统规格。每个系统都包括 Power Blotter基座和 Power Blotter卡匣或 Power Blotter XL卡匣。基座和卡匣也可单独提供。

规格	
转印模式	半干式
凝胶兼容性	变性或非变性聚丙烯酰胺凝胶, 手灌胶或预制胶
运行方向	水平
通量	使用Power Blotter系统时, 最多2块小型凝胶或1块中型凝胶; 使用Power Blotter XL系统时, 最多4块小型凝胶和2块中型凝胶
凝胶尺寸	小型 (8 x 8 cm), 中型 (8 x 13 cm)



观看Power Blotter的使用方法, 请浏览
thermofisher.com/powerblotter

Power Blotter系统为较宽分子量范围的蛋白质提供了高转印效率		
装置和耗材	Power Blotter 系统搭配Power Blotter 预组装转印膜组	Power Blotter系统搭配Power Blotter预剪裁膜和滤纸, 以及Power Blotter 1-Step 转印缓冲液
转印时间	7-10分钟	7-10分钟
转印效率		

图 7.Power Blotter 预组装转印膜组或 Power Blotter预剪裁膜和滤纸高效地转印高、中、低分子量的蛋白质。对几个靶标 (KLH、EGFR、Hsp90、PDI 和亲环素B蛋白质) 进行蛋白免疫印迹分析, 方法是含KLH对照的Hela细胞裂解物进行梯度稀释后 (从每孔7.5 g HeLa稀释液、7.5 g KLH对照开始, 2:3梯度稀释) 上样到Bolt 4-12% Bis-Tris Plus 凝胶上。使用 Power Blotter 预组装转印膜组 (左, 货号 PB5310; PB3310) 或 Power Blotter 预剪裁膜和滤纸膜组 (右, 货号 PB9320; PB7320) 在7分钟内完成蛋白质转印, 并用靶特异性一抗和荧光标记二抗进行孵育。在 Invitrogen™ iBright™ 成像系统上使用自动曝光采集图像。

了解更多信息, 请浏览 thermofisher.com/powerblotter

干式转印

干式转印法使用含有创新性成分的转印三明治，替代传统的转印缓冲液。使用含有缓冲液的独特缓冲凝胶基质（转印膜组）代替缓冲液或浸湿的滤纸（图 8）。凝胶基质中的高离子密度有助于实现蛋白质快速转印。在干式转印过程中，铜阳极不会因为水电解而生成氧气，这与湿式和半干式技术不同。没有氧气产生，印迹就不容易失真。通常情况下，通过缩短电极之间的距离、施加高场强和大电流来缩短转印时间。与湿式转印或半干式转印不同，干式转印仅需极少的组装转印三明治的时间，这不仅大大提高了转印速度，而且也大大缩短了投入的总时间。



小知识

使用纯度不高的甲醇代替分析纯甲醇会增加转印缓冲液的电导率，导致较差的蛋白质转印结果。

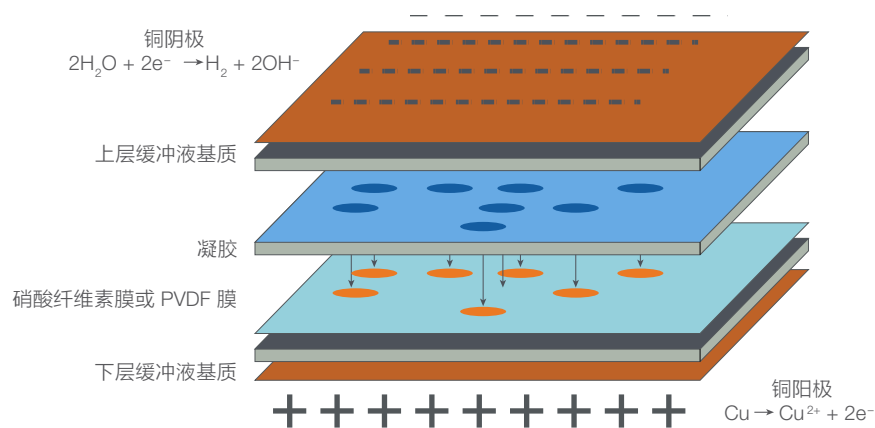


图 8.用 Invitrogen™ iBlot™ 2 转印膜组进行干式蛋白免疫印迹转印的示意图。

iBlot 2凝胶转印装置

7分钟内完成蛋白免疫印迹转印，无需转印缓冲液

Invitrogen™ iBlot™ 2凝胶转印装置能将蛋白质从小型凝胶、中型凝胶和Invitrogen™ E-PAGE™ 凝胶中通过干式电转印到硝酸纤维素膜或PVDF膜上，以进行蛋白免疫印迹检测。iBlot 2系统具有卓越的转印效率、便利性和速度，产生清晰的条带，且条带保持锐利笔直（图 9）。凝胶基质中的缓冲液（与电泳槽或浸湿的滤纸不同）能使蛋白质快速转印到硝酸纤维素膜或PVDF膜上。缩短电极之间的距离，以及施加高场强和大电流，将运行时间缩短到7分钟（表 2）。使用iBlot 2系统，无需预备缓冲液，预处理凝胶，预浸泡滤纸，也无需在转印后清理。

特点：

- **精心设计，快速转印** — 缩短电极之间的距离，施加高场强和大电流，将转印时间缩短到 7 分钟
- **准备和清理工作极少** — 转印膜组简化了转印装置的组装和拆卸
- **使用方便** — 具有触摸屏界面、预编程序和优化的转印方案，以及小型转印和中型转印（一次1个中型印迹或最多2个小型印迹）的即用型转印膜组

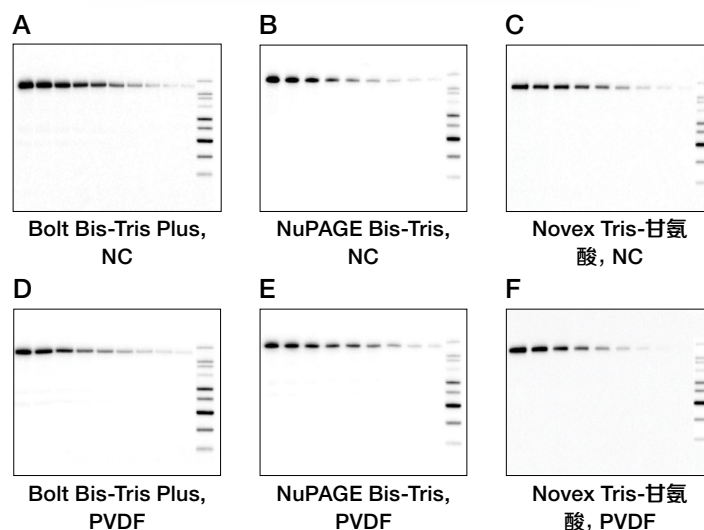


图 9. iBlot 2快速转印装置处理的膜在不同蛋白质凝胶类型以及硝酸纤维素膜（NC）和PVDF膜间显示出了一致的转印效果。A431细胞的总细胞提取物分别从 Invitrogen™ Bolt™ 4-12% Bis-Tris预制胶、Invitrogen™ NuPAGE™ 4-20% Bis-Tris预制胶和Invitrogen™ Novex™ 4-20% Tris-乙酸预制胶转印到NC膜（A-C）或PVDF膜（D-F）上。

观看操作视频：



了解更多信息和观看视频，请浏览 thermofisher.com/iblot

表 2.使用iBlot 2凝胶转印装置转印蛋白质所需时间与其他转印法的比较。

	iBlot 2 凝胶转印装置	传统的半干式转印	湿式转印
制备缓冲液	0分钟	30分钟	30分钟
凝胶浸入转印缓冲液	0分钟	20分钟	0分钟
组装三明治	2分钟	10分钟	10分钟
转印	7分钟	45–90分钟	1–3小时
清洁	0分钟	10分钟	10分钟
总耗时	9分钟	1小时55分钟–2小时40分钟	1小时50分钟–3小时50分钟
iBlot 2 凝胶转印装置节省的时间	/	1小时45分钟– 2小时30分钟	1小时40分钟– 3小时40分钟

规格	
转印模式	干式
凝胶兼容性	NuPAGE Bis-Tris及Tris-乙酸、 Bolt Bis-Tris Plus、 Novex Tris-甘氨酸和 E-PAGE预制胶
运行方向	水平
通量	最多2块小型凝胶或1块中型凝胶
凝胶尺寸	小型(8 x 8 cm), 中型(8 x 13 cm)

推荐产品

我们建议将iBlot 2转印膜组与iBlot 2凝胶转印装置配套使用。这些仪器兼容硝酸纤维素膜或PVDF膜，以及常规或小型凝胶。



小知识

硝酸纤维素膜最初用于过滤颗粒物，例如细菌，现在则常用于在Western和Southern印迹中作为结合大分子的载体。包括蛋白质在内的大分子通过疏水相互作用与硝酸纤维素膜结合。

转印前的注意事项

转印系统的选择

在选择转印方法时, 便利性、速度、灵活性和通量是重要的考虑因素。虽然实验室目前拥有的装置可能很方便, 但仍需考虑是否有其他方法优化转印的准备工作和减少步骤。配有即用型耗材的干式转印系统可提供极大的便利, 它们只需很少的时间去准备和清理。关于转印速度, 湿式转印系统通常最慢, 其次是半干式转印系统 (使用Towbin缓冲液), 干式转印系统最快。然而, 有了专门为半干式系统设计的转印缓冲液, 其速度就可以与干式转印系统的速度相媲美。湿式 (电泳槽) 系统有多种容量和设计, 通常在通量方面能提供最大的灵活性, 但应将此特性与转印速度相权衡。与使用较慢的湿式 (电泳槽) 转印系统相比, 使用快速的半干式或干式转印系统能够完成相同通量 (或更多) 的转印。

在转印效率方面, 大多数新式转印系统能高效转印常规分子量范围的蛋白质。大多数新式半干式系统和干式系统能为特定的分子量范围 (包括高分子量和低分子量) 提供预编程序的优化方法。无论使用哪种系统, 在转印非常高或非常低分子量的蛋白质时往往需要进一步优化。然而, 由于湿式转印的灵活性 (例如, 可以轻易切换不同孔径的转印膜, 转印缓冲液的配方也可以调整), 在转印非常高或非常低分子量的蛋白质时, 湿式转印是一个很好的切入点。有关 Invitrogen 转印系统特点的摘要, 请参见第6页的表 1。

组装蛋白免疫印迹转印三明治

电泳分离蛋白质后, 蛋白免疫印迹流程的下一步是组装“转印三明治”。对于湿式和半干式转印装置, 转印三明治通常由滤纸-凝胶-转印膜-滤纸排列组成, 其中滤纸有助于转印缓冲液的渗透。市面上有些商业化的湿式和半干式转印装置, 配有预剪裁膜和滤纸的预组装转印膜组, 需要将聚丙烯酰胺凝胶插入其中。

干式转印装置无需浸透转印缓冲液的滤纸。其含有缓冲液的独特凝胶基质转印膜组, 无需电泳槽和浸湿的滤纸。

选择蛋白免疫印迹膜

在蛋白免疫印迹法中, 最常见的固相载体是硝酸纤维素膜 (NC膜)、PVDF膜和尼龙膜。以下特点使这些膜适用于蛋白质转印:

- 表面积: 体积比大
- 结合力高
- 固定化蛋白质的储存时间长
- 使用简单
- 可通过优化获得低背景、高信号和更好的重现性

蛋白免疫印迹膜通常为片状或卷状, 厚度一般为100 μ m, 常见的孔径为0.1、0.2或 0.45 μ m。大多数蛋白质可以使用孔径为0.45 μ m 的膜顺利转印, 而低分子量的蛋白质或肽段 (<20 kDa) 通常选择孔径为0.1 μ m或0.2 μ m的膜。有些转印仪器配有预组装的转印膜和转印滤纸。

了解更多信息, 请浏览 [thermofisher.com/transfer](https://www.thermofisher.com/transfer)

PVDF膜

PVDF膜是蛋白免疫印迹应用、氨基酸分析、微量蛋白质 (低至10pmol) 测序的理想选择。PVDF膜高度疏水, 在浸入转印缓冲液之前, 必须用甲醇或乙醇预先润湿。PVDF膜能以很高的亲和力与蛋白质结合, 这种结合可能是通过偶极作用和疏水作用发生的, 并能比其他膜更好地保留吸附的蛋白质。PVDF也比硝酸纤维素的机械强度高, 可以在不损失灵敏度或增加背景的情况下剥离并重新检测。

我们提供各种PVDF膜, 满足您的常规转印需求。各种产品的比较, 请参见表 4。

特点:

- **高品质** — 专为蛋白质转印和蛋白免疫印迹的应用而制造的PVDF膜; 比其他市售的PVDF膜更不易脱色
- **经久耐用** — PVDF能与大多数有机溶剂、酸和弱碱兼容; 不像硝酸纤维素那样易裂或易碎
- **多种选择** — 可提供0.2 μm和0.45 μm孔径的膜; 可提供预剪裁的片状膜和卷膜、即用型膜组或特定装置的专用膜产品
- **兼容性广** — 与化学发光检测、显色检测和荧光蛋白免疫印迹检测兼容

我们提供的0.2μm的PVDF膜在蛋白免疫印迹、氨基酸分析和蛋白质测序应用中表现良好, 而 0.45μm的PVDF膜则适合需要高灵敏度和低背景的蛋白免疫印迹应用。

表 4.Thermo Scientific™ 和Invitrogen™ PVDF膜。

膜尺寸	孔径			
	0.2 μm		0.45 μm	
	配有滤纸的膜	仅有膜	配有滤纸的膜	仅有膜
小型	PVDF膜/滤纸三明治, 0.2 μm, 8.3 x 7.3 cm (货号 LC2002)	低荧光PVDF转印膜, 0.2 μm, 7 x 8.4 cm (货号 22860)	Invitrolon™ PVDF膜/滤纸三明治, 0.45 μm, 8.3 x 7.3 cm (货号 LC2005)	PVDF转印膜, 0.45 μm, 10 x 10 cm (货号 88585)
中型	/	/	Invitrolon™ PVDF膜/滤纸三明治, 0.45 μm, 8.5 x 13.5 cm (货号 LC2007) SureLock Tandem 中型预剪裁膜和滤纸, 0.45 μm, PVDF, 8.6 x 14 cm (货号 STM2006)	/
卷膜	/	PVDF转印膜, 0.2 μm, 26.5 cm x 3.75 m (货号 88520)	/	PVDF转印膜, 0.45 μm, 26.5 cm x 3.75 m (货号 88518)

表 5.用于iBlot凝胶转印装置的转印膜组。

膜类型	小型 (8 x 8 cm)	中型 (13 x 8.3 cm)
硝酸纤维素	iBlot 2 转印膜组, 硝酸纤维素膜, 小型 (货号 IB23002)	iBlot 2 转印膜组, 硝酸纤维素膜, 中型 (货号 IB23001)
PVDF	iBlot 2 转印膜组, PVDF膜, 小型 (货号 IB24002)	iBlot 2 转印膜组, PVDF膜, 中型 (货号 IB24001)

表 6.用于Power Blotter系统的转印膜组和配有滤纸的预剪裁膜。

膜类型	小型		中型 (2 块小型或 1 块中型)	
	预组装膜组	配有滤纸的膜	预组装膜组	配有滤纸的膜
硝酸纤维素	Power Blotter 预组装转印膜组, 硝酸纤维素膜, 小型 (货号 PB3210)	Power Blotter 预剪裁膜和滤纸, 硝酸纤维素膜, 小型 (货号 PB7220)	Power Blotter 预组装 转印膜组, 硝酸纤维素膜, 中型 (货号 PB3310)	Power Blotter 预剪裁膜和滤纸, 硝酸纤维素膜, 中型 (货号 PB7320)
PVDF	Power Blotter 预组装转印膜组, PVDF膜, 小型 (货号 PB5210)	Power Blotter 预剪裁膜和滤纸, PVDF膜, 小型 (货号 PB9220)	Power Blotter 预组装 转印膜组, PVDF膜, 中型 (货号 PB5310)	Power Blotter 预剪裁膜和滤纸, PVDF膜, 中型 (货号 PB9320)

转印膜组

硝酸纤维素膜和PVDF膜可作为预组装的膜组，用于 Invitrogen™ iBlot™ 干转装置和 Invitrogen™ Power Blotter 系统 (表 5 和表 6)。Power Blotter 系统也与配有滤纸的预剪裁膜兼容 (表 6)。

低荧光转印膜

要消除背景荧光的主要来源，我们建议使用自发荧光低的膜，包括硝酸纤维素或专用的低荧光 PVDF 膜 (表 7 和图 10)。所有Invitrogen™ iBlot™ 2 和 Power Blotter PVDF预组装膜组都配备了低荧光PVDF膜，以用于荧光蛋白免疫印迹应用。

表 7.用于荧光蛋白免疫印迹应用的 PVDF 膜。

	小型
低荧光 PVDF 膜	低荧光 PVDF 转印膜, 0.2 μm, 7 x 8.4 cm (货号 22860)

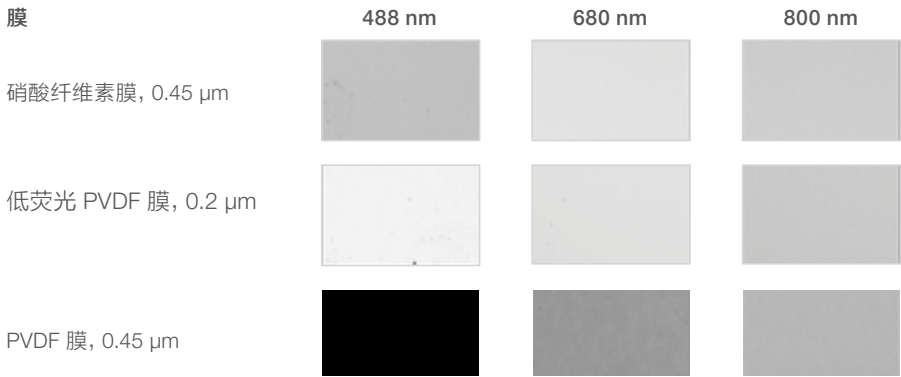


图 10.常用膜的背景荧光。



了解更多信息, 请浏览 thermofisher.com/membranes

滤纸

在湿式转印法和半干式转印法中，滤纸是转印三明治的重要组成部分。在组装转印三明治之前，滤纸需要先在转印缓冲液中浸湿。滤纸有助于转印缓冲液渗透到凝胶中，以帮助蛋白质从凝胶转印到膜上。干式电转印不需要使用滤纸。

滤纸应该采用优质材料，这样在蛋白免疫印迹的检测步骤中才不会产生可能的背景问题。在某些转印系统中，还应考虑滤纸的厚度。例如，在半干式转印中，滤纸的厚度会影响到实际有多少缓冲液可用于转印。较厚的滤纸通常可容纳更多的转印缓冲液。当使用转印装置时，要遵循厂家建议的滤纸厚度。

Pierce蛋白免疫印迹滤纸

Thermo Scientific™ Pierce™ 蛋白免疫印迹滤纸是预剪裁好的棉片，用于蛋白质的湿式或半干式转印，将蛋白质从聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 转印到PVDF膜、硝酸纤维素膜或其他膜上 (表 8)。Pierce蛋白免疫印迹滤纸适用于乙醇或其他常用于蛋白质和核酸转印的有机溶剂。

特点:

- **高品质** — 采用清洁棉纤维素纤维纸，以无添加剂的超纯水生产，能最大程度地减少背景信号和假信号
- **使用方便** — 多种尺寸的预剪裁滤纸片，适用于大多数小型凝胶、电泳槽转印卡匣和半干式印迹装置
- **经过验证** — 经测试可用于多种蛋白质转印法，包括湿式转印和半干法转印
- **两种厚度** — 标准厚度的滤纸用于传统转印；加厚的滤纸用于高容量转印或替代多张滤纸

表 8.预剪裁滤纸。

厚度	小型	中型	特殊尺寸
0.83 mm	蛋白免疫印迹滤纸， 7 cm x 8.4 cm (货号 84783)	蛋白免疫印迹滤纸， 8 cm x 13.5 cm (货号 84784)	蛋白免疫印迹滤纸， 8 cm x 10.5 cm (货号 88600)
2.5 mm	蛋白免疫印迹滤纸，超厚， 7 cm x 8.4 cm (货号 88605) 印迹滤纸，2.5 mm 厚， 7.5 cm x 8.4 cm (货号 LC2010)	蛋白免疫印迹滤纸，超厚， 8 cm x 13.5 cm (货号 88615) 印迹滤纸，2.5 mm 厚， 8.6 cm x 13.5 cm (货号 LC2008)	蛋白免疫印迹滤纸，超厚， 8.5 cm x 9 cm (货号 88610) 蛋白免疫印迹滤纸，超厚， 20 cm x 20 cm (货号 88620)



小知识

在转印缓冲液中加入 0.05% SDS 有助于高分子量蛋白质的转印。

了解更多信息, 请浏览 thermofisher.com/filterpaper

选择蛋白分子量标准的考虑因素

通常，在凝胶电泳过程中加入蛋白分子量标准或蛋白标准品，是用于电泳分离后（如果不进行蛋白免疫印迹）或检测步骤后（进行蛋白免疫印迹时）的蛋白质分子量估算（大小）。蛋白分子量标准也可用于监测转印效率，但只能定性。这时，推荐选择预染的蛋白分子量标准（表9），因为它们在膜上可见。

为蛋白免疫印迹设计的专用蛋白分子量标准（表9），可实现直接在蛋白免疫印迹上估算蛋白质分子量，或通过使用多种印迹检测系统（例如，化学发光、荧光或显色）间接地估计蛋白质分子量，简单又方便。这种蛋白Marker是具有IgG结合位点的重组蛋白，IgG结合位点与用于检测靶蛋白的一抗或二抗结合，使蛋白免疫印迹上的蛋白标准品可见。

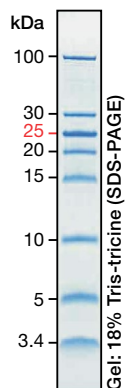


小知识

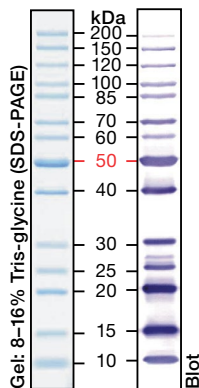
使用[交互式蛋白分子量标准选择工具](#)，为您的应用和凝胶体系找到最合适的蛋白分子量标准。

表 9.蛋白分子量标准选择指南

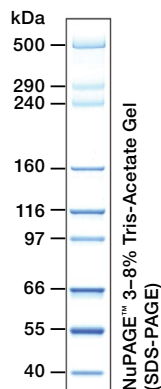
	分子量范围	产品	条带数量	范围
非预染	低	PageRuler 非预染低分子量范围蛋白分子量标准	8	3.4–100 kDa
	宽	PageRuler 非预染蛋白分子量标准	14	10–200 kDa
	高	HiMark 非预染蛋白标准品	9	40–500 kDa
预染	低	PageRuler 预染蛋白分子量标准	10	10–170 kDa
	宽	PageRuler Plus 预染蛋白分子量标准	9	10–250 kDa
	高	HiMark 预染蛋白标准品	9	30–460 kDa
多色预染	低	Spectra 多色低分子量范围蛋白分子量标准	6	1.7–40 kDa
	宽	Spectra 多色宽范围蛋白分子量标准	10	10–260 kDa
	高	Spectra 多色高分子量范围蛋白分子量标准	8	40–300 kDa
蛋白免疫印迹	宽	iBright 预染蛋白分子量标准	10	11–250 kDa
		MagicMark XP 蛋白标准品	9	20–220 kDa
特殊	宽	IEF Marker 3–10	13	pI 3–10



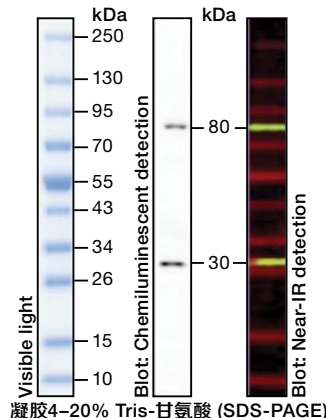
Thermo Scientific™
PageRuler™ 非预染
低分子量范围蛋白分子
量标准
货号 26632



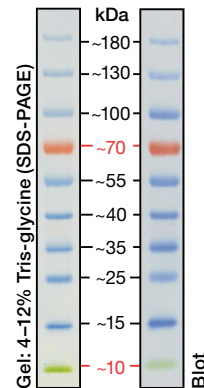
Thermo Scientific™
PageRuler™
非预染蛋白分子量标准
货号 26614



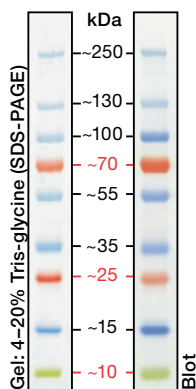
Invitrogen™ HiMark™ 非预染
蛋白标准品
货号 LC5688



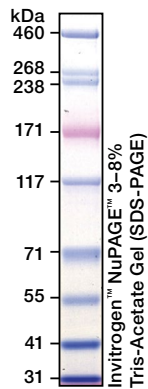
Invitrogen™ iBright™ 预染
蛋白分子量标准
货号 LC5615



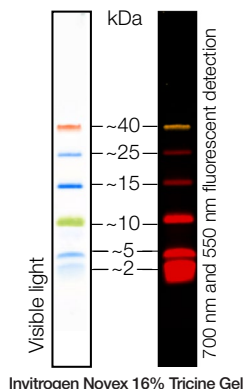
Thermo Scientific™
PageRuler™
预染 蛋白分子量标准
货号 26616



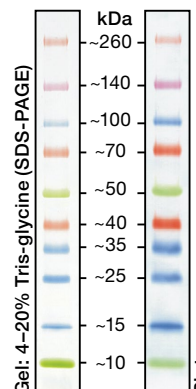
Thermo Scientific™
PageRuler™ Plus
预染蛋白分子量标准
货号 26619



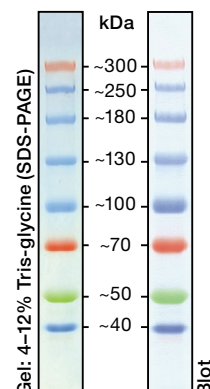
Invitrogen™ HiMark™ 预染
蛋白标准品
货号 LC5699



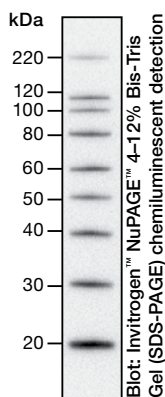
Thermo Scientific™
Spectra™ 多色低分子
量蛋白分子量标准
货号 26628



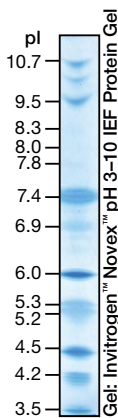
Thermo Scientific™
Spectra™ 多色宽范围蛋白分
子量标准
货号 26634



Thermo Scientific™
Spectra™ 多色高分子量
蛋白分子量标准
货号 26625



Invitrogen™ MagicMark™
XP Western 蛋白标准品
货号 LC5602



Invitrogen™ IEF Marker
3-10
货号 39212-01



了解关于蛋白分子量标准的更多信息,
请参阅蛋白质凝胶电泳技术手册:
thermofisher.com/pagehandbook 或
thermofisher.com/proteinladders

转印缓冲液

Towbin缓冲液体系 (25 mM Tris-HCl, pH 8.3, 192 mM 甘氨酸, 20% (v/v) 甲醇)^[1] 和 CAPS缓冲液体系 (10 mM CAPS, pH 10.5, 10% (v/v) 甲醇) 是常用于蛋白免疫印迹的缓冲液。然而, 转印缓冲液的最终选择可能取决于转印装置, 一般会在该装置的使用手册中注明。

在大多数实验中, 蛋白免疫印迹转印缓冲液不应加入SDS, 因为它们会加大蛋白质带的负电荷并使蛋白完全穿过膜, 而不是与膜结合。通常, SDS-PAGE凝胶中残留的与蛋白质结合的SDS足以有效地将其从凝胶转印到膜上。对于容易沉淀的蛋白质, 可能需要添加低浓度的 SDS (<0.01%)。应该注意的是, 将SDS添加到转印缓冲液中可能需要优化其他转印参数 (例如, 时间、电流), 以防止蛋白质穿过膜。

转印缓冲液中的甲醇有助于从SDS-PAGE凝胶中的蛋白质上剥离SDS, 从而提高它们结合膜的能力。然而, 甲醇会使下游的酶失活, 并会使凝胶和转印膜收缩, 这可能会增加在甲醇中溶解度差的大分子量蛋白质 (>150 kDa) 的转印时间。不过, 在没有甲醇的情况下, 蛋白质凝胶在低离子强度的缓冲液中可能会膨胀, 因此建议提前将凝胶预膨胀30分钟-1小时, 以防止条带失真。

可以选择高离子强度的缓冲溶液提高半干式转印法的转印速度。这些缓冲液与合适的恒定高电流电源 (1.5-5.0A) 结合使用时, 蛋白质转印时间将加速到10分钟以内。

我们提供多种即用型缓冲液, 可用于标准的湿式转印系统、传统半干式转印系统和快速半干式转印系统 (表 10)。

表 10.转印缓冲液选择指南

湿式转印		
蛋白质样品	凝胶体系	转印缓冲液
宽分子量范围 (6-400 kDa)	Bolt Bis-Tris Plus	Bolt 转印缓冲液 还原型样品: Bolt 抗氧化剂
宽分子量范围 (6-400 kDa)	NuPAGE Bis-Tris	NuPAGE 转印缓冲液 还原型样品: NuPAGE 抗氧化剂
高分子量范围 (40–500 kDa)	NuPAGE Tris-乙酸	
宽分子量范围 (6-400 kDa)	Novex Tris-甘氨酸	Novex Tris-甘氨酸转印缓冲液
低分子量范围 (2.5–40 kDa)	Novex Tricine	
半干式转印		
Power Blotter 1-Step 转印缓冲液(5X)		



小知识

在转印缓冲液中加入20%甲醇或乙醇可以提高低分子量蛋白质的转印效率。

了解更多信息, 请浏览 thermofisher.com/transferbuffer

Bolt 转印缓冲液(20X)

Invitrogen™ Bolt™ 转印缓冲液(20X)专为将蛋白质从Invitrogen™ Bolt™ Bis-Tris Plus 凝胶转印到膜上进行蛋白免疫印迹而优化。在加入 10% 的甲醇后, Bolt 转印缓冲液可与Invitrogen™ Mini Blot 模块或XCell™ II Blot 模块一起用于湿式转印。它还可以与Invitrogen™ Bolt™ 抗氧化剂一起使用, 以提高还原型蛋白质转印到膜上的效率。

NuPAGE 转印缓冲液 (20X)

Invitrogen™ NuPAGE™ 转印缓冲液(20X)是将蛋白质从Invitrogen™ NuPAGE™ Bis-Tris 凝胶和Invitrogen™ NuPAGE™ Tris-乙酸凝胶转印到膜上进行蛋白免疫印迹的最佳缓冲液。NuPAGE 转印缓冲液可与Mini Blot模块、XCell II Blot模块或SureLock Tandem Midi Blot模块一起用于湿式转印。它还可以与Invitrogen™ NuPAGE™ 抗氧化剂一起使用, 以提高还原型蛋白质转印到膜上的效率。

BupH Tris-甘氨酸缓冲液干粉包

每包Thermo Scientific™ BupH™ Tris-甘氨酸缓冲液干粉包溶解于400mL去离子水和100mL甲醇中时, 可制成500mL缓冲液, 含25mM Tris、192mM甘氨酸, pH值约为8。

Pierce 10X Tris-甘氨酸缓冲液

Thermo Scientific™ Pierce™ 10X Tris-甘氨酸缓冲液是一种节省空间的储备溶液, 是快速制备用于蛋白免疫印迹的标准Tris-甘氨酸 (pH 8.5) 转印缓冲液的理想选择。使用前只需用水或20%甲醇稀释。

Novex Tris-甘氨酸转印缓冲液(25X)

Invitrogen™ Novex™ Tris-甘氨酸转印缓冲液 (25X) 针对使用Tris-甘氨酸凝胶的蛋白免疫印迹转印应用进行了优化。该缓冲液是用高纯度溶液制成的, 并经过了严格的质量控制。浓缩的缓冲液在使用前需要用去离子水进行简单稀释。

Pierce 10X 蛋白免疫印迹转印缓冲液 (无甲醇)

Thermo Scientific™ Pierce™ 10X 蛋白免疫印迹转印缓冲液 (无甲醇), 无需冷却或添加甲醇。只需用水稀释至 1X 工作液, 即可直接在电泳槽或传统的半干式转印中使用。

Power Blotter 1-Step 转印缓冲液

Invitrogen™ Power Blotter 1-Step™ 转印缓冲液设计用于蛋白质的快速半干式转印, 搭配 Power Blotter 转印系统可快速将蛋白质从聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 转印到硝酸纤维素膜或PVDF膜上。高离子强度的缓冲液加上高电流电源, 当与兼容系统 (例如, Power Blotter系统) 一起使用时, 可以在7-10分钟内完成蛋白质的转印。转印效率与传统的蛋白免疫印迹转印方式相当。



小知识

瑞士巴塞尔的Harry Towbin团队第一次描述了蛋白质电转印到膜上并使用二抗检测蛋白。他在1979年描述的方法最接近我们现在所知的蛋白免疫印迹法。

转印后

蛋白质转印过程完成后, 会将膜从转印三明治中取出来, 以准备进行转印后的膜处理。在将宝贵的时间和检测试剂投入到蛋白免疫印迹处理和检测之前, 需要谨慎地评估转印步骤的效率。如果需要提高灵敏度, 在印迹膜与封闭缓冲液一起孵育之前, 可以在这个阶段使用信号增强剂。

监测转印效率

不同的蛋白质迁移出凝胶的能力及在特定条件下不同的膜结合能力, 使不同蛋白质之间的转印效率可能会有很大差异。转印效率取决于多种因素, 如凝胶的成分、凝胶与转印膜的接触、电极的位置、转印时间、场强和去垢剂的存在, 以及目标蛋白的大小和结构。

一些研究人员可能会使用预染蛋白分子量标准来评估转印效率。还有一些研究人员可能会对凝胶进行染色, 以确认蛋白质已经移出凝胶。然而, 这些方法并不是最可靠的, 因为它们不一定能揭示出蛋白质是如何有效地转印到膜上的。监测转印效率的一个更好的方法是用染料 (例如, 丽春红或酰胺黑10B) 对膜上的总蛋白进行染色。由于染料可能会干扰抗体的结合和检测, 所以易于去除的蛋白质染料是理想之选。丽春红染料是应用最广的试剂, 用于对膜上的蛋白质进行可逆性染色, 但它的灵敏度有限, 成像效果不佳, 而且褪色很快, 使记录变得困难。

市面上有更优秀的替代品可在硝酸纤维素膜或 PVDF 膜上对蛋白质进行染色, 这些替代品能轻松成像, 并且在去除前不会褪色。这些染料还可以检测膜上低纳克级的蛋白质。凝胶转印后, No-Stain 蛋白质标记试剂 (第 67 页) 也可用于总蛋白标记。它以共价方式标记蛋白质, 在进行蛋白免疫印迹定量实验时, 可以用来归一化蛋白质样品的上样差异。

Pierce可逆蛋白质染色试剂盒

丽春红的理想替代品, 可用于硝酸纤维素膜或PVDF膜

Thermo Scientific™ Pierce™ 可逆蛋白质染色试剂盒适用于硝酸纤维素膜或PVDF膜, 作为丽春红染料的替代品, 它染色迅速, 灵敏度更高, 是检测蛋白质转印效率的理想试剂(图 11 和 12)。这种方法的检测下限是25-50 ng/条带(灵敏度至少是传统丽春红染色的5倍)。其染色方案简单快速, 可产生不褪色的翠蓝色条带, 能轻松成像, 便于记录。该染料可以在不到15分钟内轻松洗掉。接下来的蛋白免疫印迹检测不会受到影响, 因为该染料不会造成蛋白质的改变, 并会被完全去除。经处理的转印膜不会干扰使用辣根过氧化物酶(HRP) 和碱性磷酸酶(AP) 底物的传统化学发光检测或显色检测。此外, 该染料与从膜上切除和洗脱的蛋白的N端测序分析相兼容。

特点:

- **优于丽春红** — 更灵敏, 更容易记录, 更持久(脱色前)(表 11)
- **灵敏** — 亲和力高, 总蛋白染色; 检测的下限更低, 为25-50 ng/条带
- **特异性** — 只检测蛋白质; 不与其他电泳成分或样品成分结合或相互作用
- **快速** — 染色时间不到 5分钟(硝酸纤维素膜)或不到30分钟(PVDF膜); 可在15分钟内完全洗去染料
- **稳定** — 各成分在室温下储存, 可节省冰箱空间, 并省去平衡步骤

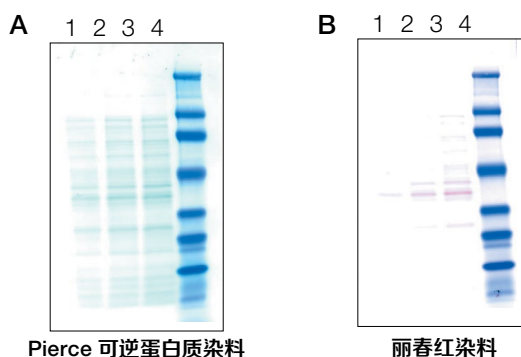


图 11. Pierce可逆蛋白质染料和丽春红染料: 含有过表达 GST 蛋白的细菌裂解液在硝酸纤维素膜上的染色比较。 上样量逐渐增加的裂解液在两块4-20% Tris-甘氨酸聚丙烯酰胺凝胶上分离, 并转印到硝酸纤维素膜上。(A)一块印迹用Pierce可逆蛋白质染料染色30秒, 并根据方案脱色。(B)另一块印迹用 0.1% 丽春红染料染色5分钟, 并脱色。用Pierce可逆蛋白质染料染色得到的印迹显示出了出色的信号。GST裂解液上样量: 泳道 1: 5 μ L, 泳道 2: 10 μ L, 泳道 3: 15 μ L, 泳道 4: 10 μ L 蛋白分子量标准。

了解更多信息, 请浏览 thermofisher.com/proteinstains

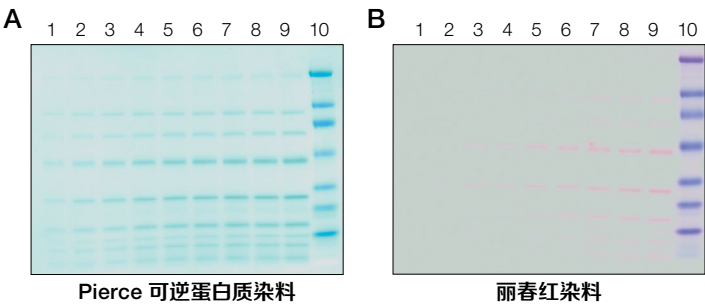


图 12.Pierce 可逆蛋白质染料与丽春红染料在PVDF膜上的比较。将非预染蛋白 Marker (即蛋白分子量标准) 连续稀释 (泳道 1-9), 上样到两块 4-20% Tris-甘氨酸 SDS-聚丙烯酰胺凝胶中, 并转印到 PVDF膜上。(A) 一块印迹用Pierce可逆蛋白质染料染色1分钟, 并根据方案脱色。(B) 另一块印迹用0.1%丽春红染料在5%醋酸中染色5分钟, 并按照操作方案脱色。泳道 10: 蛋白分子量标准。

表 11.Pierce 可逆蛋白质染料与丽春红染料的比较。

Pierce 可逆蛋白质染料	丽春红染料
• 结合紧密, 灵敏度较高的常用蛋白质染料	• 结合较弱, 灵敏度较低的常规蛋白质染料
• 检测下限: 25–50 ng	• 检测下限: 250 ng
• 翠蓝色条带, 成像容易	• 红色条带, 成像较难
• 翠蓝色条带不会随着时间的推移而褪色, 但可以逆转	• 染色的条带在数小时内就会褪色
• 通常的染色时间: 60秒	• 通常的染色时间: 5分钟
• 能用 pH 值低的缓冲液快速去除背景	• 难以彻底脱色



小知识

Harry Towbin 在1979年提到的Towbin 缓冲液仍是最广泛使用的、用于蛋白免疫印迹的湿式转印缓冲液。

检测

蛋白免疫印迹检测的注意事项

蛋白免疫印迹法以一种方便、灵活的方式检测细胞或组织中的特定蛋白质。蛋白免疫印迹法也可以实现蛋白定量，且灵敏度较高。有多种检测技术包括化学发光、荧光或显色技术可供选择，可以根据实验需求和现有仪器进行选择。我们认为在进行蛋白免疫印迹之前需要考虑以下几个关键因素。

信噪比

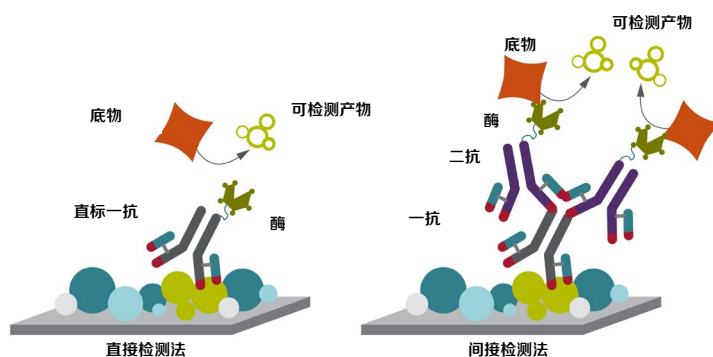
信噪比是目标信号与背景噪声或非相关信号水平的比值；比值越高，结果越好。在蛋白免疫印迹法中，信号是目标蛋白条带的密度；噪声是背景的密度。在蛋白免疫印迹应用中，优化信噪比往往较提高系统的灵敏度更重要。如果信号不能与噪声明显区分，系统的灵敏度再高也没有意义。要了解关于蛋白免疫印迹优化方法的更多信息，请参见第 75 页。

直接检测法和间接检测法

识别目标蛋白的抗体被称为一抗。如果通过酶或荧光基团对该抗体进行了标记，那么直接检测靶标成为可能。通常，一抗不进行标记以用于直接检测，而代之以对二抗进行可检测标签的标记，并用于与靶标结合的一抗杂交，这样就能间接地检测到靶标。与直接检测法相比，使用二抗进行间接检测需要更多步骤，但与使用直接标记的一抗相比，它具有明显的优势（图 13）。

间接检测法可以通过信号放大（多个二抗分子与单个一抗结合时）来提高灵敏度。此外，特定二抗可以识别大多数一抗（同型抗体和同类靶标），使其成为比单独标记的一抗更加通用的试剂。

以上检测方法和试剂类别很多。然而，每个方法都依赖于特异性探针（例如一抗），直接或间接通过可检测的标签实现检测。在本手册中，讨论的大多数方法都是间接检测，因为它是目前最通用的检测方法。



优点:

- 更快，因为只使用了一个抗体
- 不用担心二抗发生交叉反应

缺点:

- 标记位点可能会影响一抗的免疫反应性
- 如果一抗对靶蛋白的特异性不高，或者抗体与封闭蛋白发生交叉反应，则可能出现高背景。
- 标记的一抗价格昂贵
- 一抗标签选择灵活性低
- 信号放大率小

优点:

- 二抗可以放大信号
- 有多种标记的二抗可供选择
- 一种二抗通常适用于多种一抗
- 使用标记的二抗不影响一抗的免疫反应性
- 可通过改变二抗来改变检测方法

缺点:

- 二抗可能会因为交叉反应而产生非特异性信号
- 与直接检测法相比，需要更多操作步骤

图 13.直接和间接蛋白免疫印迹检测方法的比较。

手动与自动蛋白免疫印迹流程比较

过去, 在数据可视化之前, 检测蛋白免疫印迹需要一系列手动步骤, 单独看许多步骤时间都很短, 但总体上需要大量的手动操作时间。现在, 已经有仪器可以将其中一些步骤自动化, 大大减少了手动操作。

手动操作和自动化有三个相同的基本步骤: 封闭膜、用一抗和二抗进行孵育, 膜漂洗 (图 14)。

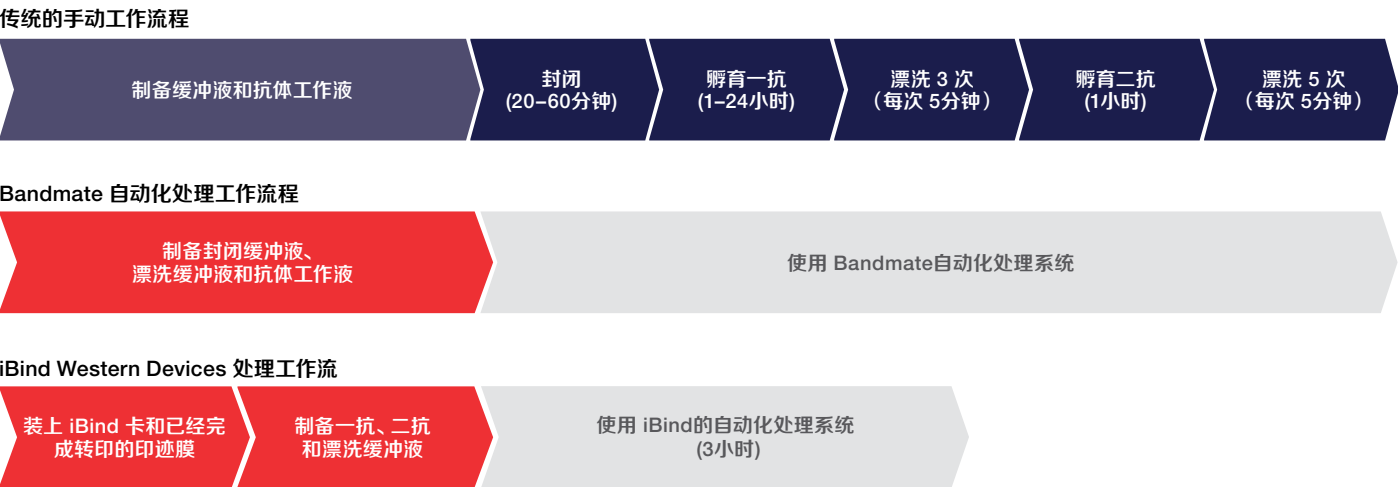


图 14.传统手动与自动蛋白免疫印迹工作流程的比较。传统的手动蛋白免疫印迹工作流程需要 10 多个动手步骤, 至少 4 h 才能进入最终检测。使用 Invitrogen™ Bandmate™ 自动蛋白免疫印迹处理系统或 Invitrogen™ iBind™ 或 iBind™ Flex Western Device 进行自动蛋白免疫印迹处理, 只需 15-30 分钟的装配时间, 在进入最终检测之前, 没有额外的动手步骤。

自动处理系统

iBind 蛋白免疫印迹处理系统

iBind 蛋白免疫印迹处理系统无需插电即可自动进行抗体孵育。传统的手动操作过程包括多次制备和更换抗体工作液与漂洗液, 历时数小时。相比之下, iBind 蛋白免疫印迹处理系统在程序开始时就制备好所有溶液并加到仪器中(图 15)。随后通过顺序侧流 (sequential lateral flow, SLF) 技术自动且不间断地释放溶液和抗体使其流动到膜上, 即简单的毛细管运作, 无需外部电源。

有两种 iBind 蛋白免疫印迹处理系统: Invitrogen™ iBind™ 蛋白免疫印迹系统, 一次可容纳一个小型印迹膜, Invitrogen™ iBind™ Flex蛋白免疫印迹系统, 一次可容纳一个中型印迹膜、两个小型印迹膜, 或最多六个垂直剪裁的膜条。表 12 对这两种系统进行了比较。

特点:

- **灵活** — 可根据您的通量要求挑选合适的系统; 在相同或不同的条件下, 可处理 1 块小型或中型印迹膜、2块小型印迹膜或 6 条垂直剪裁的膜条
- **加样即走** — 系统采用顺序侧流技术对印迹进行处理, 无需电源、摇床、托盘或计时器
- **重现性** — 减少手动操作的误差, 提高批次间的一致性
- **灵敏性** — 对于许多单克隆和多克隆抗体, iBind 处理系统能提供比手动法更高的灵敏度 (图 16)

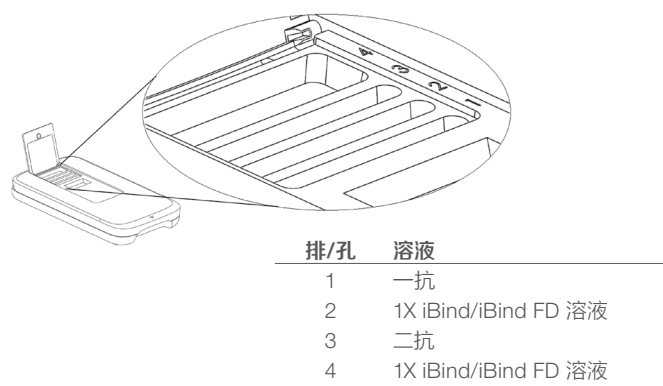
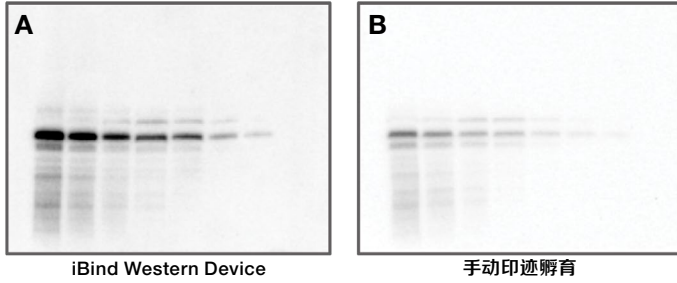


图 15.iBind 蛋白免疫印迹处理系统的上样孔。

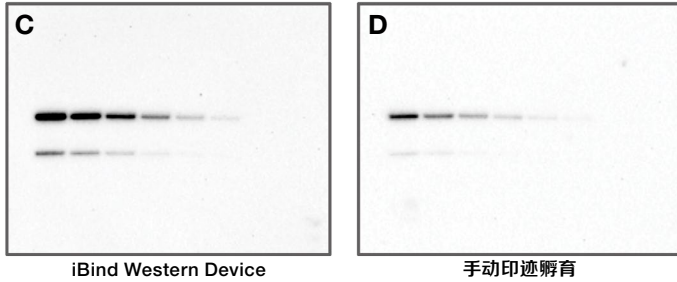
表 12.iBind 蛋白免疫印迹处理系统的特点。

	iBind 蛋白免疫印迹系统	iBind Flex 蛋白免疫印迹系统
		
单块小型印迹膜 (8 x 8 cm)	是	是
两块小型印迹膜 (8 x 8 cm)	否	是
中型印迹膜 (13 x 8 cm)	否	是
垂直剪裁膜条 (最多 6 块)	否	是

Phospho-AKT



CREB



观看 iBind 仪器的操作方法, 请浏览 thermofisher.com/ibind

图 16.与手动处理的蛋白免疫印迹相比, 在 iBind 仪器上处理的蛋白免疫印迹显示出卓越的灵敏度。(A 和 B) 将蛋白免疫印迹膜 (从左到右: 上样 30 μ g–500 ng 细胞裂解液) 和磷酸化 AKT 抗体在 iBind 仪器上处理, 或使用抗体制造商指定的标准手动蛋白免疫印迹处理方案进行处理 (磷酸化 AKT [pT308] (C31E5E) 单克隆一抗; HRP 标记的抗兔二抗)。用 iBind 处理印迹, 可以从 500 ng 细胞裂解液中检测到磷酸化 AKT, 而手动处理印迹, 检测靶标的下限为 4 μ g 细胞裂解液。(C 和 D) 将来源于细胞裂解液 (表达 CREB) 的蛋白免疫印迹膜 (从左到右: 上样 30 μ g–1 μ g 细胞裂解液) 在 iBind 上处理, 或使用抗体制造商指定的标准手动蛋白免疫印迹处理方案进行处理 (多克隆 CREB 一抗; HRP 标记的抗兔二抗)。用 iBind 处理印迹, 可从 6 μ g 细胞裂解液中检测到 CREB, 而手动处理印迹, 检测到 CREB 需 10 μ g 细胞裂解液。以上所有的印迹膜, 使用 Bolt Bis-Tris Plus 小型凝胶分离蛋白质, 并使用 iBlot 干式转印系统转印到 PVDF 膜上。

Bandmate 自动化蛋白免疫印迹处理系统

Invitrogen™ Bandmate™ 自动化蛋白免疫印迹处理系统是可编程的抗体孵育装置，它可以自动完成蛋白免疫印迹处理中繁琐的手动封闭、漂洗和抗体孵育步骤。使用优化的印迹处理试剂和方案，可以轻松处理多达 2 个中型印迹膜或 4 个小型印迹膜，从而为其他重要任务腾出时间。

特点:

- **自动运行** — 只需准备封闭液、漂洗液和抗体溶液，加入机器中，选择程序，然后便可以放心地离开
- **无需优化** — 与传统蛋白质免疫印迹方案配合使用，无需再次优化，也不需要专用试剂 (图 17)；提供预编程方案，也可依据具体情况自行编程
- **抗体回收** — 如有必要，可使用收集管回收抗体，以供在日后的实验中重复使用

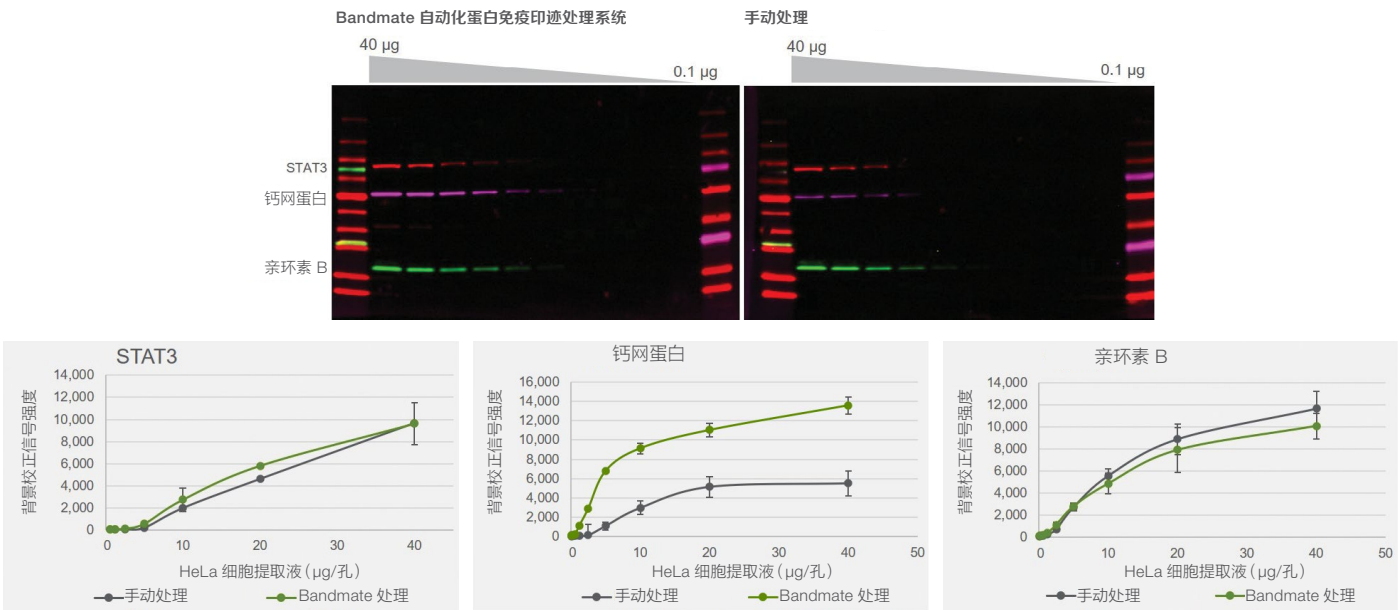


图 17. Bandmate 自动化蛋白免疫印迹处理系统与手动处理 (在托盘和摇床平台上进行抗体孵育和漂洗步骤) 小型印迹膜的比较。与手动处理的印迹相比，Bandmate 系统处理的印迹膜在多个探测靶标上显示出相当或更高的强度水平。

了解更多信息和观看相关视频，请浏览 thermofisher.com/bandmate

膜的封闭

蛋白免疫印迹法中使用的膜对蛋白质有很高的亲和力。在转印后, 为了防止检测抗体的非特异性结合, 必须封闭膜表面上剩余的结合位点。

多种封闭液 (牛奶、常规血清或高度纯化蛋白质) 可用于封闭膜上的自由位点。封闭这些自由位点后, 背景干扰减少而信噪比得到很好的改善。封闭液用量不足会导致背景噪声过大, 信噪比降低, 而封闭液浓度过高可能会阻止抗体-靶蛋白的相互作用或抑制标记酶, 再次导致信噪比降低。封闭缓冲液的最佳选择通常取决于缓冲液体系。确定合适的封闭缓冲液可以帮助提高系统的信噪比。有时, 当从一种底物切换到另一种底物时, 同样的封闭缓冲液会导致信号减弱或背景增加 (图 18 和图 19)。

例如, 对于使用碱性磷酸酶偶联物的应用, 应选择 Tris-缓冲液 (Tris-buffered saline, TBS) 中的封闭缓冲液, 因为磷酸盐缓冲液 (phosphate-buffered saline, PBS) 会干扰碱性磷酸酶的活性。同样, 在使用亲和素-生物素检测系统时, 应避免使用牛奶作为封闭试剂。使用您的系统结合各种封闭缓冲液进行测试有助于获得最佳结果。



图 18. Thermo Scientific™ StartingBlock™ 封闭缓冲液、Pierce™ Clear Milk 封闭缓冲液和 5% 脱脂奶封闭缓冲液比较。 制备连续稀释的 HeLa 裂解液, 用 SDS-PAGE 分离, 并转印到膜上以检测 IRAK1 和 Bcl-xL。根据产品说明, 用相应的封闭缓冲液来封闭膜。之后分别与 Invitrogen™ IRAK1 一抗 (货号 700025) 和 Bcl-xL 一抗 (货号 PA5-17805) 一起孵育, 然后使用稀释的 Invitrogen™ HRP 标记山羊抗兔 IgG 二抗 (货号 32460)。将印迹膜与 SuperSignal West Atto 极敏底物 (货号 A38555) 一起孵育。最后使用 Invitrogen™ iBright™ 成像仪采集曝光 12 秒的图像。

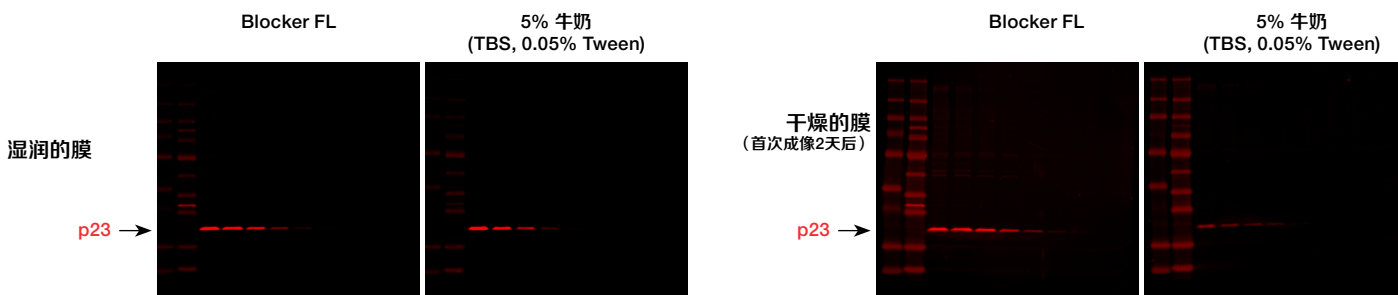


图 19. Thermo Scientific™ Blocker™ FL 荧光封闭缓冲液和 5% 脱脂奶封闭缓冲液比较。 蛋白免疫印迹的过程是: 上样梯度稀释的 A431 细胞裂解液 (15 mg, 梯度稀释 3 倍), 并在 Invitrogen™ Novex™ 4-20% Tris-甘氨酸 Plus 中型凝胶 (货号 WXP42012BOX) 上进行电泳。前 2 个泳道上样 5 µL PageRuler 预染蛋白分子量标准 (货号 26616) 和 3 µL iBright 预染蛋白分子量标准 (货号 LC5615)。使用 Power Blotter 系统 (货号 22834) 将蛋白质转印到硝酸纤维素膜上。用 1X Blocker FL 荧光封闭缓冲液 (货号 37565), 或用含 5% 脱脂奶和 0.05% Tween 20 去垢剂的 TBS 将膜封闭, 时长 30 分钟。

没有一种封闭剂是适合所有情况的，因为每个抗体-靶标对都有独一无二的性质。因此，我们提供多种缓冲液以满足您不同的蛋白免疫印迹实验需求。请将表 13 作为参考，为实验选择合适的封闭缓冲液。

表 13.封闭缓冲液选择指南

选用情形	Thermo Scientific™ 产品	封闭剂	亮点	使用情形	可用规格
优化一种新式蛋白免疫印迹系统时	StartingBlock™ 封闭缓冲液	无血清和生物素的单一纯化蛋白	- 在多种抗体和抗体组合中表现良好 - 与链酶亲和素系统兼容 - 封闭时间不到 15 分钟	- 具有中高丰度的蛋白质或抗体亲和力较强时 - 当前封闭缓冲液的背景很高 - 剥离和再次检测蛋白免疫印迹	PBS TBS PBST TBST
进行荧光蛋白免疫印迹检测时	Blocker™ FL 荧光封闭缓冲液 (10X)	单一纯化蛋白	- 封闭多余的非特异性结合位点，帮助减少背景荧光 - 适用于硝酸纤维素膜和低荧光PVDF膜 - 无去垢剂 15-30分钟内完成封闭	干燥荧光印迹的成像和储存	10X 浓缩液
自制的牛奶缓冲液有高背景时	Blocker™ 酪蛋白	纯化酪蛋白	- 在蛋白免疫印迹应用中高效替代自制的牛奶封闭缓冲液 - 与血清或牛奶溶液相比，单一蛋白封闭缓冲液与检测成分发生交叉反应的可能更小	当脱脂奶出现高背景时使用	PBS TBS
靶向磷酸化蛋白时	Blocker™ 牛血清白蛋白	纯化牛血清白蛋白(BSA)	10% 高品质牛血清白蛋白溶液 - 与血清或牛奶溶液相比，单一纯化蛋白质与检测成分发生交叉反应的可能更小	- 靶向磷酸化蛋白时使用 - 适合将重复使用的抗体存储在封闭液中使用	10X 浓缩液
需要不含蛋白质的封闭液时	Pierce™ 无蛋白封闭缓冲液	无蛋白封闭复合物	- 有助于减少或消除含蛋白成分的封闭液引起的交叉反应 - 设计用于蛋白样品和抗体的结合需要去除检测系统中所有可能的外源动物蛋白，以避免交叉反应或所需探针功能的失效。	当基于蛋白质的封闭液导致高背景时使用	PBS TBS PBST TBST



小知识

在检测磷酸化蛋白靶标时，不应用牛奶作为封闭缓冲液，因为牛奶含有的酪蛋白是一种磷酸化蛋白，会导致高背景。

了解更多信息, 请浏览 thermofisher.com/blockingbuffers

膜的抗体孵育

大多数蛋白免疫印迹分析法依赖于靶标特异的探针, 这些探针可通过化学标签或标记检测, 从而测定生物样品中的特定蛋白。抗体是最常见的探针类型, 因为它们对特定蛋白质的亲和力使其能够在复杂的样品 (例如, 用细胞或组织制备的裂解液) 中“找到”并检测它们。然而, 抗体本身就是蛋白质, 它们不能在检测系统中被特异性地检测出来, 所以它们一般通过添加标签实现可视化 (一抗标记偶联物) 或与标记的二抗结合使用。

不同类型的化学标记或标签可以偶联到抗体上, 实现检测最常见的标签是酶和荧光基团。试剂和仪器的快速发展使这些技术的用途更加广泛和强大。基于酶标签 (例如, AP和HRP) 的化学发光是蛋白免疫印迹法中最常见的检测方法。然而, 荧光技术在蛋白免疫印迹检测中的应用正在迅速发展。

一抗的孵育

一抗的选择将取决于要检测的靶蛋白和针对该蛋白的可用抗体。很多一抗可以从市面上买到。

多克隆抗体和单克隆抗体都能很好地用于蛋白免疫印迹法。多克隆抗体的生产成本较低, 耗时较短, 而且它们通常对抗原有很高的亲和力。单克隆抗体的价值在于其特异性、纯度和一致性好, 从而产生的背景较低。粗制的抗体制剂, 如血清或腹水, 有时也用于蛋白免疫印迹法, 但其中的杂质可能会增加背景。重组抗体是指获取抗体可变区的DNA序列, 然后在表达系统中生产的抗体。重组抗体批次间的一致性和结果重现性好。要获得高特异性的抗体, 可以使用固定化的靶标分子来纯化抗体。

一抗的特异性

获得抗体后, 需要确定它是否对其靶标有特异性。在蛋白免疫印迹中, 非特异性结合可能会产生多个条带, 从而给数据解读带来挑战。可以采用不同类型的特异性测试 (基于靶标生物学, 详见 thermofisher.com/antibodyvalidation) 来确定抗体特异性。

Invitrogen 一抗

我们提供超过十万种高质量抗体, 广泛适用于流式细胞术、免疫组织化学 (IHC)、免疫荧光 (IF)、免疫细胞化学 (ICC)、蛋白免疫印迹、酶联免疫吸附 (ELISA) 等应用。为了帮助确保更优的抗体结果, Invitrogen抗体要经过一套严格的两步抗体验证方法进行进一步验证*, 包括靶点特异性确认和功能应用验证。通过抗体页面的搜索工具、参考文献、数据图像、公开数据, 比较功能, 轻松找到您需要的抗体。更多信息查询thermofisher.com/antibodies。

* “验证” (或任何其它类似说法) 一词的使用仅指研究使用的抗体, 这些抗体经过功能测试以确认该抗体可用于所述研究技术。它并不能确保验证产品可用于临床用途或诊断用途。

了解更多信息, 请浏览 thermofisher.com/antibodies

二抗的孵育

二抗通过与一抗（已直接与靶蛋白结合）结合来检测靶蛋白。绝大多数一抗均来源于少数几个物种，而且大多数是IgG，这使得为大多数应用和检测系统提供即用型的标记二抗相对容易。二抗可以是多克隆的、单克隆的或重组的。它们有不同的缓冲液配方和形式，例如冻干或溶液形式。在蛋白免疫印迹中，通常在室温的封闭缓冲液中孵育二抗1小时。如果需要，也可以延长孵育时间。

当使用高灵敏度的底物时，通常将二抗稀释至工作浓度，范围从用于荧光蛋白免疫印迹的1:500，到采用化学发光检测法检测高丰度蛋白并结合高敏底物时的1:500,000。荧光检测和化学发光检测的最佳稀释度差别很大。化学发光检测的最佳稀释度取决于多个实验因素，例如蛋白靶标丰度、一抗的选择，以及化学发光底物的选择（最重要）。由于酶促化学发光信号放大，酶偶联二抗的稀释度通常较高。我们提供多种标记二抗用于蛋白免疫印迹法。标签包括用于化学发光检测和显色检测的辣根过氧化物酶(HRP)和碱性磷酸酶 (AP)，用于信号放大的多聚HRP和生物素偶联物，以及用于荧光蛋白免疫印迹的Invitrogen™ Alexa Fluor™ 和Alexa FluorPlus 二抗。

二抗的特异性

二抗是用来自不同物种的抗体对宿主动物进行免疫而产生的。例如，可以将特定纯化的小鼠抗体注射到小鼠以外的动物中来产生抗小鼠抗体。山羊、驴、绵羊、鸡和兔是获取二抗最常用的宿主物种，有时也用其他物种。最常见的二抗类型是针对来自目标物种的免疫球蛋白集群产生的二抗。例如，用纯化小鼠IgG对山羊进行免疫，会产生山羊抗小鼠IgG抗体，该抗体将与小鼠IgG的所有类型相结合，包括重链和轻链（H+L）及小鼠IgG片段，以及任何其他具有同一保守结构域的分子（例如，IgM与IgG具有相同的 kappa 轻链）结合。相反，只用小鼠 IgG1 抗体对山羊进行免疫，只会产生抗小鼠 IgG1 抗体和抗含有同一保守结构域分子的特异性抗体。

由于许多免疫球蛋白区域的结构高度保守，因此必须对特定类别的二抗进行亲和纯化和交叉吸附，以实现与其他免疫球蛋白的最小交叉反应。使用上述示例，固定化小鼠IgG1抗体将被用来亲和纯化所有与小鼠IgG1结合的山羊抗体。然后，这些抗小鼠IgG1抗体将通过一个或多个含有小鼠IgG2a、IgG2b、IgG3、IgM以及其他同型抗体的色谱柱来进一步纯化，以去除任何与非IgG1发生同型交叉反应的抗体。此外，二抗还可以通过含有固定化血清蛋白的色谱柱来进一步纯化，这些血清蛋白来自免疫宿主以外的物种。这种交叉吸附的方法（通常在产品名称中被称为“交叉吸附”）是额外的纯化步骤，一般用于以下情况：使用来自多个物种的一抗时，以及被检测样品中可能存在免疫球蛋白或其他血清蛋白时（表 14）。

表 14.目标物种的常用缩写。

目标物种	缩写	目标物种	缩写
牛	Bv	人	Hu
狗	Ca	马	Eq
鸡	Ck	猴	Nhp
驴	Do	小鼠	Ms
猫	Fe	兔	Rb
山羊	Gt	大鼠	Rt
豚鼠	GP	绵羊	Ov
仓鼠	Hm	猪	Po

酶标记法检测：碱性磷酸酶(AP)和辣根过氧化物酶 (HRP)
酶标记是最常用的二抗标签，广泛应用于蛋白免疫印迹。酶通过其活性生成可检测的信号：即与特定的化学底物反应生成有色产物或化学发光产物。AP和HRP作为化学发光蛋白质检测的标签，是使用最广泛的两种酶。这两种酶与大多数显色底物和化学发光底物兼容（参见第 41-57 页）。

AP催化底物分子中磷酸基团的水解,生成有色产物或化学发光产物,或释放出光(作为反应的副产物)。AP在碱性(pH 8–10)条件下具有最佳酶活性并可以被氰化物、砷酸盐、无机磷酸盐和二价阳离子螯合剂(例如,EDTA)抑制。作为蛋白免疫印迹的标签,AP比其他酶具有明显的优势。因为它的反应速率始终保持线性,所以只要延长反应时间,就可以提高检测灵敏度。

HRP催化过氧化氢对底物的氧化,生成有色产物或化学发光产物,或释放出光(作为反应的副产物)。HRP在近中性条件下作用最强并可以被氰化物、硫化物和叠氮化物抑制。就酶和抗体的特定活性而言,抗体-HRP偶联物要优于抗体-AP偶联物。此外,其高转换率、良好的稳定性、低成本和广泛的底物来源使HRP成为大多数应用的首选酶。由于HRP酶的体积相对较小,可以通过使用多聚-HRP标记二抗进一步提高灵敏度,并且无需使用ABC型放大系统,后者需要使用生物素化的二抗,以及链霉亲和素-HRP偶联物。而链霉亲和素-HRP可能与样品中生物素化的蛋白质非特异性结合,从而干扰靶蛋白的特异性检测。

荧光标签检测

过去,荧光基团标记二抗和其他探针被用于少数细胞生物学分析,例如流式细胞术(FC)、细胞分选和使用荧光显微镜的免疫组织化学(IHC),但现在它们正在向蛋白免疫印迹的应用扩展。在蛋白免疫印迹法中,与使用酶标记相比,因为没有底物显影步骤,使用荧光基团标记二抗需要的步骤更少。虽然操作步骤较少,但荧光检测需要能够捕获荧光信号的成像仪,而且灵敏度可能低于经过优化的酶化学发光系统。尽管不像酶检测法那样灵敏,荧光检测法减少了化学废液的产生,并具有实现多重检测的优势(利用多种荧光标记抗体在同一印迹上检测多种蛋白质,而无需像化学发光那样剥离并重新检测印迹)。

对多重检测技术的需求不断增长,推动了许多新荧光染料和偶联化学技术的发展,使创新型荧光染料标记二抗(如Alexa Fluor Plus 二抗)的开发成为可能。这些新的荧光二抗比传统的荧光基团标记二抗更明亮、光稳定性更好,并由更广泛的非重叠光谱组成。再加上数字成像仪的进步,我们有更充足的理由优先考虑选择基于荧光基团的检测方法而不是化学发光检测。

生物素结合蛋白作为探针

生物素和亲和素或链霉亲和素蛋白之间的高度特异亲和作用是许多检测和亲和纯化方法的基础。生物素的分子量非常小(244 Da),所以它与抗体或其他探针的共价连接基本不会影响后者的功能。它作为标签存在于探针上,可以用亲和素、链霉亲和素或 Thermo Scientific™ NeutrAvidin™ 中性亲和素进行高效和特异的检测。生物素结合蛋白有酶标记和荧光基团标记的纯化形式,可以应用在多种检测系统中。

亲和素和链霉亲和素都与生物素有非常强的特异性结合。然而,每种蛋白质在某些检测中都有其局限性。亲和素是糖基化的,可能会导致非特异性凝集素结合。链霉亲和素含有 RYD 基序,这是一种细菌识别序列,可能会与某些样品成分结合导致背景升高。另一种选择是使用 NeutrAvidin 中性亲和素,它是一种独有的去糖基化的亲和素,能避免天然亲和素和链霉亲和素的缺点。

了解更多信息,请浏览 thermofisher.com/secondaryantibodies

二抗的选择

选择合适的二抗是蛋白免疫印迹检测过程中的一个关键步骤。需要对实验的需求进行仔细评估。在选择二抗的过程中,下面的逐步考虑是很有用的。

1

确定一抗的来源。

- 示例 1: 小鼠单克隆 IgG1
- 示例 2: 兔重组 IgG

2

为二抗选择适当的宿主物种和靶标反应性。

- 示例 1 可选二抗: 山羊抗小鼠 IgG1
- 示例 2 可选二抗: 山羊抗兔 IgG

3

考虑二抗的交叉反应性或特异性问题。

- 交叉吸附: 用于多重标记应用或使用含有内源性抗体的样品时
- 特异性: 能与一抗的特异片段、类别或亚型结合

4

检测方法。

- 标记: 选择符合所选检测方法的酶, 标签或荧光基团

5

考虑二抗的供应要求。

- 储存状态: 例如无菌液或冻干粉, 保存在PBS或 Tris 缓冲液中

6

请浏览 thermofisher.com/secondaries 获取更多信息

抗体和抗体-酶偶联物的储存条件

抗体工作液（用于蛋白免疫印迹）通常用1mg/mL的储存液开始稀释，稀释比从1:100到1:500,000。在4°C下，1mg/mL的储存液通常可以储存数天至数周，而不会有明显的活性损失。然而，为了增加稳定性，可以加入50%的甘油或乙二醇在-20°C下储存抗体。或者，将抗体分装成工作浓度的小份后于-20°C储存以避免反复冻融。可以添加抗菌剂（例如，叠氮化钠或硫柳汞）抑制微生物生长。

一般来说，抗体偶联物最好保存在-20°C下，并加入甘油或乙二醇使最终浓度为50%。尽管一些酶偶联物可以在没有冷冻保护剂的情况下于-20°C储存，但需要分装成单次用量后保存，避免反复冻融；AP偶联物对冷冻特别敏感。如果在-20°C下用甘油或乙二醇储存，偶联物通常在1-2年内保持良好活性。然而，冷冻保护剂中的污染物可能会影响酶的活性，且很少有研究人员采取措施来确保所使用的冷冻保护剂的纯度。无论是未标记抗体还是标记抗体，都最好参考制造商的建议，了解具体的储存条件。

乙二醇

Thermo Scientific™乙二醇为抗体-酶偶联物提供了特殊的防冻保护和储存稳定性，因为它去除了传统甘油储备溶液中常见的杂质。50%(w/v)的水溶液与纯化蛋白样品（例如，一抗）等量混合后，在冷冻储存期间(-20°C)，混合物可稳定保持液体状态。

特点：

- 经过特殊纯化处理以去除杂质（例如，醛类、过氧化物、铁和紫外吸收烃类）
- 适用于酶的储存，无需担心酶活性损失
- 可以稳定保存数月

Guardian 过氧化物酶偶联物稳定剂/稀释剂

在长期储存时, Thermo Scientific™ Guardian™ 过氧化物酶偶联稳定剂/稀释剂可在超低浓度下维持HRP标记抗体和其他蛋白质的功能完整性和活性。可将常用的1mg/mL抗体和链霉素亲和素过氧化物酶偶联物稀释多达100,000倍并在4°C 储存。Guardian 溶液允许可预先制备的1X工作浓度 HRP 偶联物在4°C 下存储12个月或室温下保存6个月。对于印迹应用, 通常建议制备10X浓度的储存液, 以在实验中使用可能含封闭成分的检测缓冲液稀释十倍后使用。

特点:

- **保留 HRP 活性** — 可以在室温下储存 6 个月 (1:1,000 稀释) 或在 4°C 下储存 12 个月, HRP 活性无明显下降
- **方便** — 将即用型稀释液 (稀释比从1:1,000 到1:100,000) 储存在冰箱中, 无需分装或冷冻, 即可以维持酶的活性
- **检测兼容性好** — 只需加入常用的封闭缓冲液, 就可以为基于HRP的ELISA 系统制备理想的稀释液, 或以1:1000 储备溶液的形式将HRP 偶联物储存起来以用于蛋白质免疫印迹, 使用前加入检测缓冲液稀释
- **优异的稳定性** — 随着时间的推移, HRP的活性能稳定保持 (图 20)

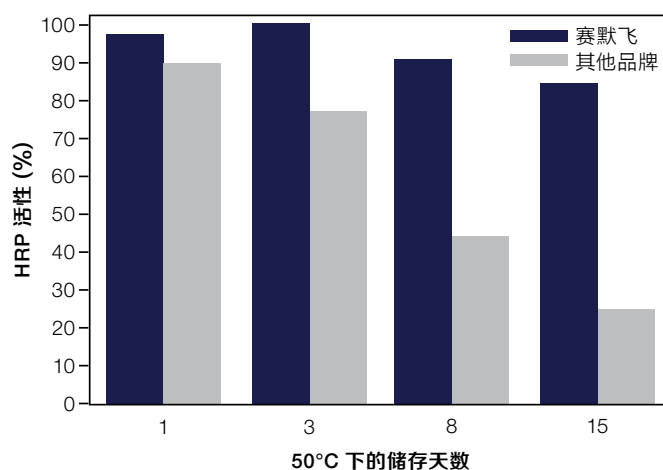


图 20.使用 Guardian 过氧化物酶偶联稳定剂/稀释剂, HRP 偶联物的稳定性更好。将链霉素亲和素-HRP (1 mg/mL)按1:1,000 稀释到 Guardian 稳定剂/稀释剂 (“本公司”) 或另一家供应商的 HRP 稳定剂 (“其他公司”) 中, 并储存在 50°C 下。在不同的时间点, 用 Thermo Scientific™ SuperBlock™ (PBS) 封闭缓冲液将 HRP 偶联物按1:5,000,000稀释并在预包被了生物素化 BSA 的白色孔板中孵育 1 h。然后用 200μL PBST 漂洗孔板 3 次。将 Thermo Scientific™ SuperSignal™ ELISA Femto 底物 (100 μL) 加入到孔板中, 孵育 1分钟, 然后在分光光度计中测定。每个时间点的样品都与对照组 (即未以稀释形式储存的 HRP 偶联物) 进行比较。酶在 50°C 下储存 2 周相当于在 4°C 下储存 12 个月。



小知识

封闭缓冲液中添加去垢剂 (如 Tween 20 表面活性剂) 可以减少背景, 但过多的去垢剂会影响封闭效果。通常终浓度为0.05%的吐温效果不错, 但可能需要根据具体应用进行优化。

膜的漂洗

像其他免疫试验流程一样，蛋白免疫印迹法包括一系列抗体孵育、漂洗等步骤。漂洗步骤是必要的，可以去除未结合或弱结合的试剂，并降低背景，提高信噪比。漂洗不充分会产生高背景，而过度的漂洗可能会导致抗体或靶蛋白从印迹膜上洗脱，从而导致灵敏度下降。与蛋白免疫印迹法的其他步骤一样，可以使用多种缓冲液（表 15）。偶尔，也会在生理缓冲液中进行漂洗，例如，不含任何添加剂的 Tris 缓冲液 (TBS) 或磷酸盐缓冲液 (PBS)。更常见的是，在缓冲液中加入去垢剂（如0.05% Tween 20），帮助去除非特异性结合。另一种常见的方法是使用稀释的封闭缓冲液，同时添加一些去垢剂，帮助减少背景。

虽然市面上有商业化的去垢剂，许多实验室也有使用，但去垢剂的纯度和稳定性的确没有得到广泛重视。去垢剂在生产过程中往往含有微量杂质。其中一些杂质，特别是大多数非离子去垢剂中的过氧化物，会破坏蛋白质的活性。此外，暴露在空气或紫外线中时，某些去垢剂容易氧化，导致它们失效。我们提供多种高纯度、过氧化物含量低的去垢剂，包装在充填了氮气的透明玻璃瓶中。Thermo Scientific™ Surfact-Amps™ 去垢剂为所有需要去垢剂的应用提供了卓越的便利性、质量和一致性。常用于蛋白免疫印迹的需要去垢剂的剂包括 Tween 20 和 NP-40 去垢剂溶液。

BupH 磷酸盐缓冲盐水干粉包 (PBS)

每包 Thermo Scientific™ BupH™ 磷酸盐缓冲液干粉包用 500 mL 水溶解，可制成含 0.1M 磷酸钠、0.15M NaCl，pH 为 7.2 的缓冲液（40包干粉可制备20 L）。

BupH Tris 缓冲盐水干粉包 (TBS)

每包 Thermo Scientific™ BupH™ Tris 缓冲液用 500 mL 水溶解时，可制成含 25 mM Tris、0.15M NaCl，pH 为 7.2 的缓冲液。（10 包干粉可制备 5 L；40 包干粉可制备 20 L）。

Tween 20 Surfact-Amps 去垢剂溶液

Thermo Scientific™ Tween™ 20 Surfact-Amps™ 去垢剂溶液是一种高度纯化的 Tween 20 去垢剂，为 10% 的稳定稀释液 (w/v) 形式，包装在玻璃安瓿或非浸出 HDPE 瓶中的氮气下，确保其稳定性，并消除过氧化物和降解产物的积聚。

表 15.漂洗缓冲液选择指南

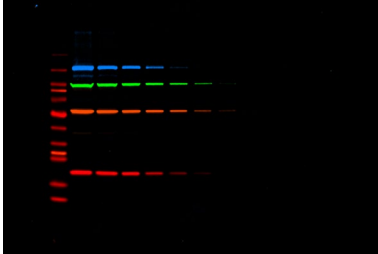
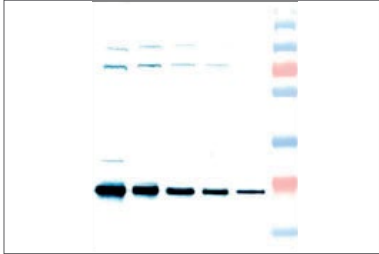
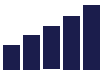
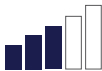
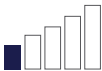
	TBS	PBS	TBST	PBST
配方	干粉和浓缩液： 25 mM Tris 150 mM NaCl - pH 7.2	干粉： 100 mM Na3PO4 150 mM NaCl - pH 7.2 浓缩液： 10 mM Na3PO4 150 mM NaCl - pH 7.5	25 mM Tris 150 mM NaCl 0.05% Tween 20 去垢剂 - pH 7.5	10 mM Na3PO4 150 mM NaCl 0.05% Tween 20 去垢剂 - pH 7.5
干粉包	货号28376 (40 包) 货号28379 (10 包)	货号28372 (40 包)	/	/
浓缩液	货号28358 (500 mL)	货号28348 (500 mL)	货号28360 (500 mL)	货号28352 (500 mL)
应用	- 酶联免疫吸附测定法 (ELISA)、蛋白免疫印迹法和其他免疫测定法 - 与 HRP、AP 或荧光检测系统一起使用	- 酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 蛋白免疫印迹法和其他免疫测定法 - 交联、生物素化和荧光标记反应等需要无胺的缓冲液时 - 与 HRP 或荧光检测系统一起使用	- 酶联免疫吸附测定法 (ELISA)、蛋白免疫印迹法和其他免疫测定法 - 与 HRP 或 AP 检测系统一起使用；经封闭步骤后，可用于荧光检测系统	- 酶联免疫吸附测定法 (ELISA)、蛋白免疫印迹法和其他免疫测定法 - 与 HRP 检测系统一起使用；经封闭步骤后，可用于荧光检测系统

了解更多信息，请浏览 thermofisher.com/westernbuffers

检测方法概述

常用的免疫印迹检测方法包括化学发光检测、荧光检测或显色检测，您可以根据实验需求和已有设备选择其一（表 16）。

表 16.蛋白免疫印迹检测方法的比较。

			
	化学发光检测法	荧光检测法	显色检测法
主要优点	极高灵敏度	同时检测多个靶标	无需仪器即可轻松可视化印迹
技术概述	增强型化学发光 (ECL) HRP 和 AP 底物实现皮克到飞克级的检测水平	使用一抗和荧光基团标记二抗组合，在同一印迹上同时检测多种蛋白质	使用显色检测试剂直接可视化靶蛋白
信号源	酶促反应的间接信号	荧光基团的直接信号	酶促反应的间接信号
信号持续时间	短暂（几小时）	长（数周至数月）	长（数周至数月）
灵敏度	 优异	 良好	 有限，最适合高丰度的蛋白质
一致性	不同印迹之间可能存在差异，可以通过使用信号稳定持久的底物来减少差异	不同印迹之间的重现性高	不同印迹之间可能存在差异
检测	X 光胶片和成像仪	成像仪：能够激发荧光基团并检测随后的发射光	目测，无需仪器
其他注意事项	- 可以对印迹剥离并重新检测 - 可以进行长时间的曝光，因为不需要激发光源来捕捉信号	- 需要注意避免荧光污染 - 随着多重检测靶点数量的增加（避免抗体交叉反应），抗体的选择越来越有难度	- 无法剥离和重新检测印迹 - 对高丰度蛋白质，以及当成像或胶片采集系统不可用时的最好选择

化学发光蛋白免疫印迹检测

由于灵敏度高且可通过胶片或数字成像系统灵活检测，化学发光成为了许多实验室进行免疫印迹实验的首选检测方法。化学发光底物很受欢迎，因为它们相比其他检测方法有以下几个优点：

- 可以重新检测印迹以优化检测，或检测另一种靶标
- 能够检测和定量宽范围的蛋白质浓度
- 相比其他检测方法，它的灵敏度最高

不同的是，化学发光底物的信号持续时间短，只在酶-底物反应发生时存在（图 21）。这与产生稳定有色产物的显色底物相反，因为这些有色沉淀物在酶-底物反应结束后仍留在膜上。在化学发光蛋白免疫印迹上，底物是反应中的限制性试剂，当它被耗尽时，信号的生成会减少并最终消失。经过优化的实验体系能产生持续数小时的稳定输出信号，从而实现一致且灵敏的蛋白质检测。我们提供各种各样的化学发光底物，有不同的规格和灵敏度。

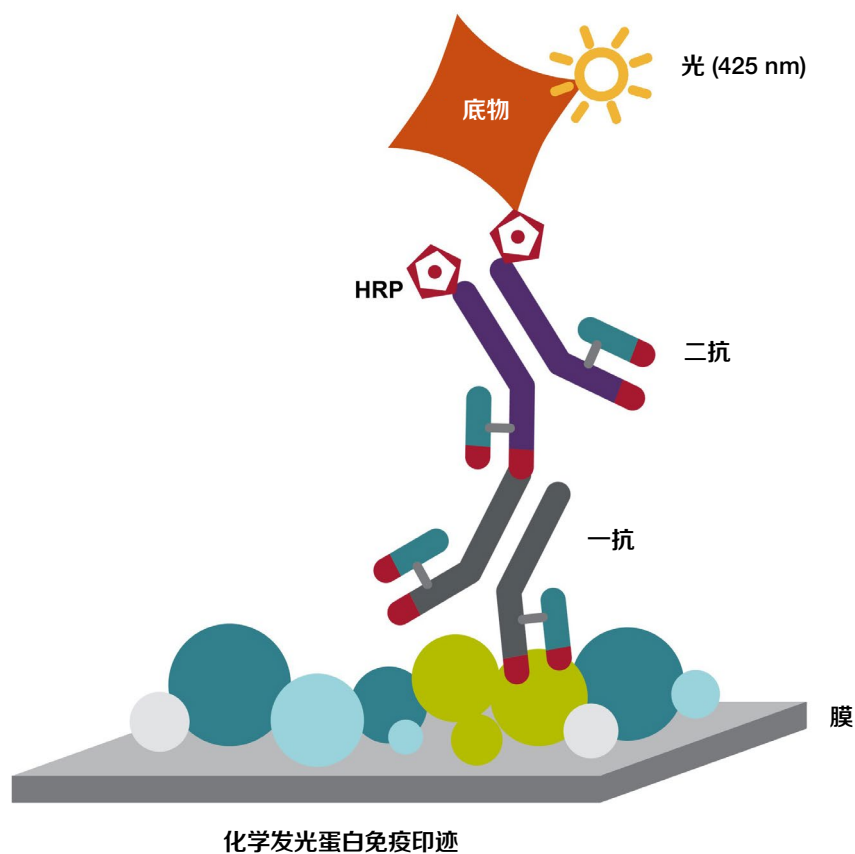


图 21.化学发光蛋白免疫印迹检测过程中酶-底物反应的概览。

化学发光底物

化学发光蛋白免疫印迹法中底物的选择是由所选的报告酶决定的。具体来说，鲁米诺和吖啶酯是化学发光辣根过氧化物酶 (HRP) 底物。对于采用碱性磷酸酶 (AP) 的化学发光检测，有基于吖啶的底物和基于1,2-二氧环丁烷的底物可供选择(图 22)。HRP 底物通常比 AP 底物具有更高的灵敏度和缓冲液兼容性(表 17)。

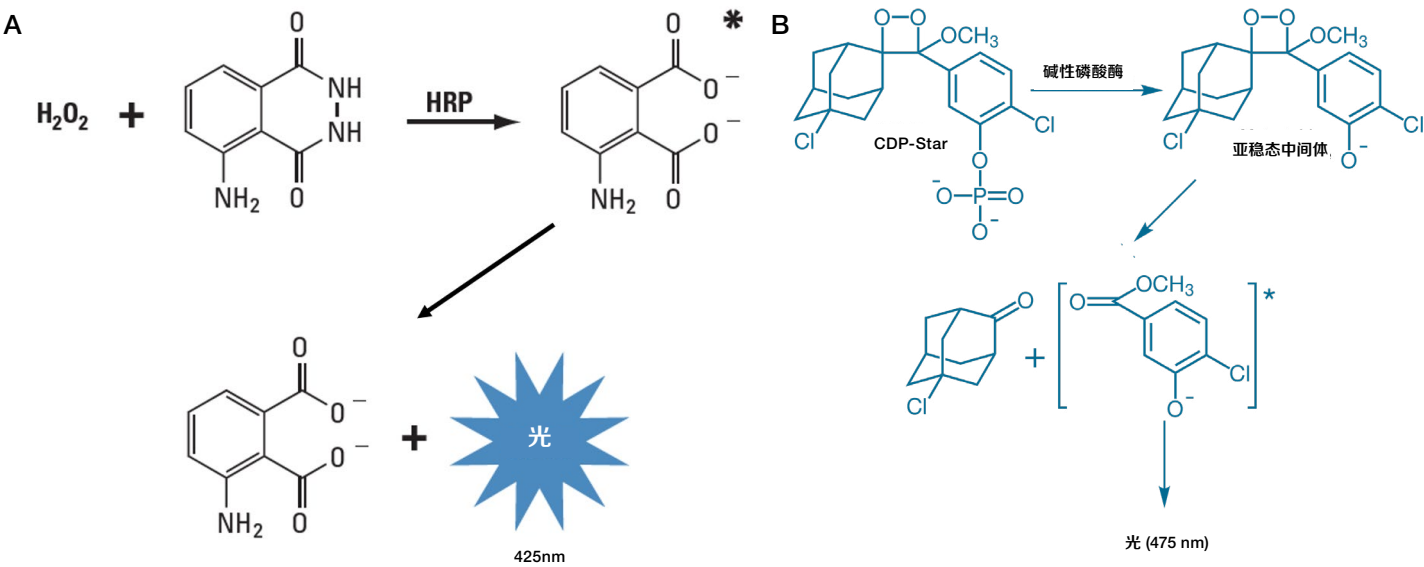


图 22.鲁米诺和 Invitrogen™ CDP-Star™ 底物的化学发光反应。(A) 化学发光是化学反应的一种特性，其副产物是发光。鲁米诺是使用最广泛的化学发光试剂之一。过氧化物氧化鲁米诺导致生成了一种叫做 3-氨基邻苯二甲酸的激发态产物。这种产物通过释放光子衰减到较低能量的状态。(B) CDP- Star 底物与 AP 的化学发光反应。CDP-Star 底物被 AP 去磷酸化，生成亚稳定的二氧环丁烷酚盐阴离子中间体，该中间体分解并发出最大强度的光，波长为 475 nm。发光只发生在酶-底物反应期间。

表 17.HRP 底物和 AP 底物在蛋白免疫印迹检测中的比较。

	HRP 底物	AP 底物
灵敏度		
	飞克级灵敏度	皮克级灵敏度
信号产生	即时	逐渐增加, 在约 30-60 分钟时信号达到峰值
信号持续时间	最长 24 小时	24-96 小时
注意事项	兼容常见的缓冲液 (如 TBS 和 PBS)	与磷酸盐缓冲液不兼容
何时使用	与HRP标记抗体或探针一起使用	与AP标记抗体或探针一起使用

化学发光 HRP 底物

HRP化学发光底物通常是由稳定型过氧化物溶液和增强型鲁米诺溶液组成的双组份系统。在大多数情况下, 需要将两种组分混合在一起使用。当与结合了HRP标记抗体 (或其他探针) 的印迹一起孵育时, 化学反应会生成 425 nm 的光信号, 可被 X 光胶片或用于检测化学发光的成像仪采集。尽管 X 光胶片可提供定性和半定量的数据, 并可以用来确认靶蛋白的存在, 但蛋白免疫印迹成像仪具有能进行定量分析、即

时图像处理, 具有更高灵敏度、更高分辨率和比胶片更宽的动态范围等优点。HRP化学发光底物的选择应基于目标靶蛋白的丰度、含靶蛋白的样品丰度、抗体的质量, 灵敏度以及可用于检测仪器的类型 (表 18 和19)。

表 18.Thermo Scientific™ HRP化学发光底物的特性比较。

	SuperSignal West Pico PLUS 化学发光底物	SuperSignal West Dura 持久性底物	SuperSignal West Atto 极敏底物
检测水平	低皮克级到高飞克级	中飞克级	低飞克级到高阿克级
建议抗体稀释度	1°: 1:1,000–1:5,000 2°: 1:10,000–1:100,000	1°: 1:1,000–1:50,000 2°: 1:50,000–1:250,000	1°: 1:1,000–1:5,000 2°: 1:100,000–1:250,000
优点	与其他入门级 ECL 底物相比, 灵敏度和强度更佳, 信号持续时间更长	灵敏度高, 持续时间长, 线性度好, 可灵敏定量	用于 HRP 检测的最高敏感度底物, 具有高信噪比
何时使用	日常进行蛋白免疫印迹时; 实验体系还未优化时的新靶标检测	需要对靶标进行定量或需要长信号持续时间时	靶标丰度很低或样本量有限
货号	34580	34075	A38555

表 19.为您的应用选择合适的HRP 底物。

实验条件						
样品	靶蛋白	抗体	建议底物	一抗	二抗	注意事项
样品充足	靶蛋白丰度未知	抗体质量未知	SuperSignal West Pico PLUS 化学发光底物	1:1,000	1:100,000	如果没有看到条带, 可以漂洗印迹并使用 SuperSignal West Atto 底物重新成像。
样品充足	靶蛋白丰度低	抗体质量差	SuperSignal West Atto 极敏化学发光底物	1:1,000	1:100,000	
样品充足	靶蛋白丰度低	抗体质量好	SuperSignal West Atto 极敏化学发光底物	1:2,000	1:250,000	
样品充足	靶蛋白丰度低	抗体质量有限	SuperSignal West Atto 极敏化学发光底物	1:5,000	1:100,000	假设常规一抗用量是 1:1,000
样品充足	靶蛋白充足	抗体质量有限	SuperSignal West Atto 极敏化学发光底物	1:20,000	1:250,000	假设常规一抗用量是 1:1,000
样品有限	靶蛋白充足	抗体质量好	SuperSignal West Pico PLUS 化学发光底物	1:1,000	1:100,000	或者适当减少上样量, 在相同的抗体浓度下使用 SuperSignal West Atto 底物。
样品有限	靶蛋白丰度未知	抗体质量未知	SuperSignal West Pico PLUS 化学发光底物	1:1,000	1:100,000	如果没有看到条带, 可以漂洗印迹并使用 SuperSignal West Atto 底物重新成像。
样品有限	靶蛋白丰度低	抗体质量好	SuperSignal West Atto 极敏化学发光底物	1:1,000	1:250,000	
样品有限	靶蛋白丰度低	抗体质量差	SuperSignal West Atto 极敏化学发光底物	1:1,000	1:100,000	

化学发光 AP 底物

多种 AP 蛋白免疫印迹检测底物可作为常用的 HRP 底物的替代品。AP检测系统反应速率保持线性, 通过延长反应时间可提高检测灵敏度。AP 的活性不受抗菌剂 (例如, 叠氮钠或硫柳汞) 的影响, 因此它可以在无菌环境中长期储存。在 pH 9.0-9.6 的范围内, 酶活性最佳; 它们能被二价阳离子激活, 因此与磷酸盐缓冲液和二价阳离子螯合剂 (例如, EDTA)

不兼容。对于基于AP的蛋白免疫印迹检测, 我们提供CDP-Star底物, 它的检测灵敏度达皮克级, 并能与传统的 X 光胶片和蛋白免疫印迹成像仪兼容 (表 20)。您可从单独的底物、Invitrogen™ Novex™ AP 化学发光底物或包含您所需的所有溶液的完整试剂盒 (例如, Invitrogen™ WesternBreeze™ 化学发光试剂盒) 中进行选择。

表 20. Invitrogen™ AP化学发光底物的特性比较。

	Novex AP 化学发光底物 (CDP-Star)	CDP-Star 底物 (0.25 mM 即用型, 含 Nitro-Block-II 增强剂)	CSPD 底物 (0.25 mM 即用型)	CSPD 底物 (0.25 mM 即用型, 含 Nitro-Block 增强剂)
检测限	中皮克级到低皮克级	中皮克级到低皮克级	高皮克级	高皮克级
曝光时间范围	1秒-15分钟	1秒-15分钟	2分钟-2小时	2分钟-2小时
建议转印膜	PVDF 膜, 尼龙膜	硝酸纤维素膜, PVDF 膜	PVDF 膜, 尼龙膜	硝酸纤维素膜, PVDF 膜
货号	WP20002	T2218	T2142	T2217



小知识

当使用基于 AP 的蛋白免疫印迹检测时, 推荐使用Tris 缓冲液, 因为磷酸盐缓冲液 (例如, PBS) 可以作为碱性磷酸酶 (AP) 的底物, 从而干扰结果。

观看操作视频, 请点击[此处](#)。

了解更多信息, 请浏览 thermofisher.com/chemisubstrates

SuperSignal West Pico PLUS 化学发光底物

Thermo Scientific™ SuperSignal™ West Pico PLUS 化学发光底物是一种增强型化学发光 HRP 底物, 可通过蛋白免疫印迹分析进行低皮克级到高飞克级的蛋白质检测。发光强度与优越的持续时间相结合, 可以实现多次曝光, 更容易获得发表级的印迹图像。SuperSignal West Pico PLUS 底物与许多转印膜、封闭试剂和多种抗体稀释液兼容, 使其成为大多数蛋白免疫印迹应用的理想选择 (图 25-27)。

SuperSignal West Pico PLUS 化学发光底物的特点:

- **灵敏** — 皮克级到飞克级的灵敏度
- **稳定性** — 室温下, 工作液可稳定保持 8 小时; 试剂盒可稳定保存 1 年
- **兼容性** — 兼容硝酸纤维素膜和PVDF膜
- **信号持续时间** — 优化体系后可达 6 至 24 小时
- **一抗建议稀释比** — 1:1,000–1:5,000 (0.2–1.0 µg/mL)
- **二抗建议稀释比** — 1:20,000–100,000 (10–50 ng/mL)



SuperSignal West Pico PLUS				
Bio-Rad Clarity				
靶标:	β-Catenin	eIF4E	RSK2	Ezrin
分子量:	85 kDa	25 kDa	80 kDa	69 kDa
裂解液 (上样量):	HEK (4 µg)	HEK (4 µg)	HeLa (20 µg)	HeLa (20 µg)
转印膜:	PVDF	PVDF	硝酸纤维素	硝酸纤维素

图 26.SuperSignal West Pico PLUS 底物与另一种化学发光底物的性能比较。使用HEK293 或 HeLa 细胞裂解物的不同稀释液 (以 1:2 的比例连续稀释, 从上面括号中所示的量开始) 对靶标进行检测。经 SDS-PAGE 分离后, 使用 Power Blotter 系统和 Pierce 1-Step 转印缓冲液将蛋白质转印到 PVDF 膜或硝酸纤维素膜上。用 5% 脱脂奶粉 (溶解在 Thermo Scientific™ Pierce™ 20X TBS Tween™ 20 缓冲液中) 封闭转印膜, 并与抗β-连环蛋白、eIF4E、RSK2 或ezrin抗体一起孵育, 再用浓度为 20 ng/ml 的 Invitrogen™ 山羊抗小鼠 IgG (H+L) 二抗 (HRP 偶联物) 孵育。用 SuperSignal West Pico PLUS 或 Bio-Rad Clarity™ 底物孵育 5 分钟后, 进行化学发光检测和底物比较。用胶片捕获信号。

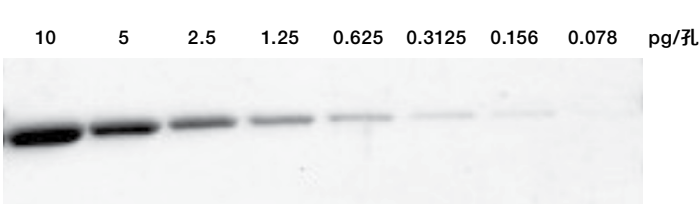


图 25.SuperSignal West Pico PLUS 可实现从低皮克级到高飞克级的检测。用电泳还原性样品缓冲液稀释TurboGFP-His-HA-Flag。泳道 1 上样10 pg 纯化蛋白质, 以 1:1 的比例连续稀释, 并以 10 µL/孔 的量上样。电泳后, 使用 Power Blotter 系统和 Pierce 1-Step 转印缓冲液将蛋白质转印到硝酸纤维素膜上。再用 SuperBlock 封闭缓冲液封闭转印膜。然后将转印膜与 1 µg/mL 抗 His 抗体一起孵育, 接着再与 100 ng/mL HRP 标记山羊抗鼠 IgG 一起孵育。SuperSignal West Pico PLUS 底物用于检测。在iBright 成像仪上捕获 30 s 的曝光, 并对图像进行反色和反差处理 (黑 = 55,000、白 = 65,535、γ = 1.0)。

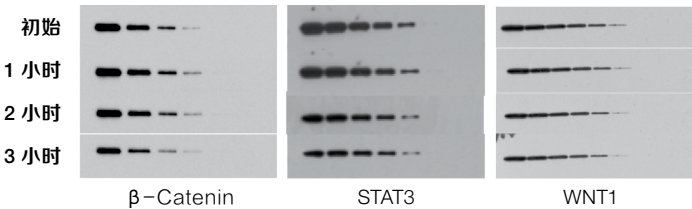


图 27.SuperSignal West Pico PLUS 底物可以在很长一段时间内保持高信号强度。使用 HEK293 或 HeLa 细胞裂解物的不同稀释液 (以 1:2 的比例连续稀释, 分别从 4 µg/孔或 20 µg/孔的量开始) 对靶标进行检测。经 SDS-PAGE 分离后, 使用 Power Blotter 系统和 Pierce 1-Step 转印缓冲液将蛋白质转印到 Thermo Scientific™ PVDF 膜或硝酸纤维素膜上。用 5% 脱脂奶粉 (溶解在 Thermo Scientific™ Pierce™ 20X TBS Tween™ 20 缓冲液中) 封闭转印膜, 并与 Invitrogen™ 抗 β-连环蛋白、STAT3 或 WNT1 抗体一起孵育, 再用浓度为 20 ng/ml 的山羊抗小鼠 IgG (H+L) 二抗 (HRP 偶联物) 孵育。用 SuperSignal West Pico PLUS 底物孵育 5 分钟后, 进行化学发光检测。加入底物后, 设置合适的时间, 用胶片捕获信号。

SuperSignal West Dura 持久性底物

Thermo Scientific™ SuperSignal™ West Dura 持久性底物是一种增强型化学发光 HRP 底物, 具有稳定的光输出, 适用于中飞克级的检测。它是定量蛋白免疫印迹的理想选择。

特点:

- **信号持续时间** — 可达 24 小时, 与常规的 ECL 底物相比, 发光持续时间要长 10 倍; 可以捕获多次曝光, 以获得发表级的印迹图像 (图 28 和图 29)
- **高灵敏度** — 可以检测中飞克级的靶蛋白
- **强度高** — 即时稳定的信号产生可通过胶片或冷 CCD 成像系统轻松检测
- **试剂稳定** — 工作溶液可在室温下稳定保存 24 小时, 试剂盒可稳定保存 1 年
- **节省抗体** — 兼容低抗体浓度

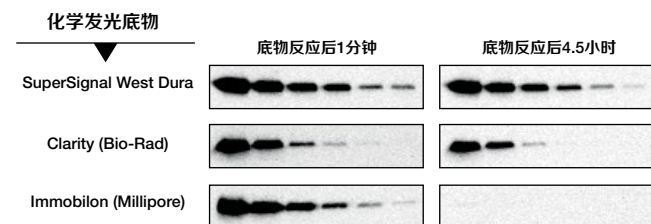


图 28.使用 SuperSignal West Dura 持久性底物, 灵敏度更好、信号持续时间更长。用还原性电泳缓冲液以 1:2 的比例连续稀释 A431 细胞裂解液, 并通过凝胶电泳进行分离。泳道 1 包含 5 μ g A431 裂解液。电泳后, 使用 Power Blotter 系统和 Pierce 1-Step 转印缓冲液将蛋白质转印到硝酸纤维素膜。用含 5% 牛奶的 TBST 缓冲液封闭转印膜。将转印膜先与 0.3 μ g/mL Invitrogen™ 小鼠 β -连环蛋白抗体一起孵育, 然后再与 20 ng/mL 山羊抗小鼠 IgG (HRP 偶联物) 一起孵育。根据各个制造商的使用说明, 将相同的印迹放在 SuperSignal West Dura 底物、Clarity™ Western ECL 底物或 Immobilon™ Western 化学发光 HRP 底物中孵育。在 iBright 成像仪上同时采集 30 s 曝光后的印迹, 设置如下: 黑 = 65,296、白 = 65,535、 γ = 1.0。

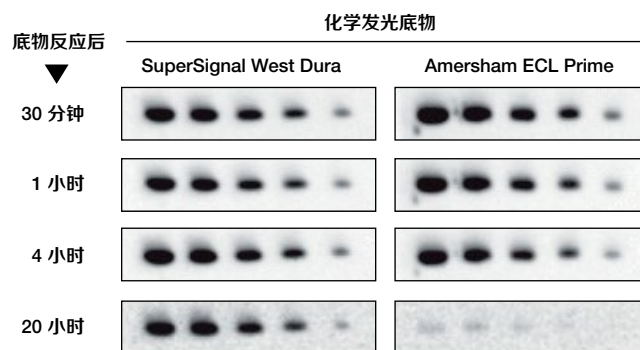


图 29.使用 SuperSignal West Dura 持久性底物, 信号持续时间更长。在硝酸纤维素膜上检测 HeLa 细胞裂解液中的 Hsp86。泳道 1 含有 10 μ g 总蛋白 (共 10 μ L/孔)。然后制备稀释液 (以 1:2 的比例连续稀释), 并以 10 μ L/孔上样 (通道 2-5)。电泳后, 转印到硝酸纤维素膜上, 用 StartingBlock (TBS) 封闭缓冲液封闭印迹, 再用 Invitrogen™ 兔抗 Hsp86 抗体 (稀释比 1:2,000) 孵育, 接着用 6.6 ng/mL 山羊抗兔 IgG HRP 二抗孵育。最后, 按照产品说明, 将相应印迹与 SuperSignal West Dura 底物或 Cytiva Amersham ECL Prime 蛋白免疫印迹检测试剂一起孵育。底物孵育后, 在不同时间点, 使用 CCD 成像仪采集成像。(每个时间点的两个印迹都使用相同的成像曝光参数。)



小知识

胶片上的背景斑点可能是由 HRP 二抗的聚合物导致的。可以用 0.2 μ m 的滤器过滤 HRP 二抗, 或者使用新的 HRP 来避免这个问题。

SuperSignal West Atto 极敏底物

Thermo Scientific™ SuperSignal™ West Atto 极敏底物是一种超灵敏的增强型 ECL 底物, 可通过使用 HRP 酶的蛋白免疫印迹分析实现高阿克隆级的蛋白质检测。与其他市售的高性能 HRP 底物相比, 它提供了更高水平的灵敏度和更高的信噪比 (图30)。它是检测低丰度靶标或珍贵样品 (需要最高灵敏度) 时的理想选择。

特点:

- **卓越的灵敏度** — 检测下限可达高阿克隆级
- **稳定性** — 工作溶液可在室温下稳定保存 24 小时, 试剂盒在 4°C 下可稳定保存一年
- **兼容性** — 兼容硝酸纤维素膜或 PVDF 膜
- **信号持续时间** — 最长可达 6 小时
- **一抗建议稀释比** — 1:1,000–1:5,000 (0.2–1.0 µg/mL)
- **二抗建议稀释比** — 1:100,000–1:250,000 (4–10 ng/mL)

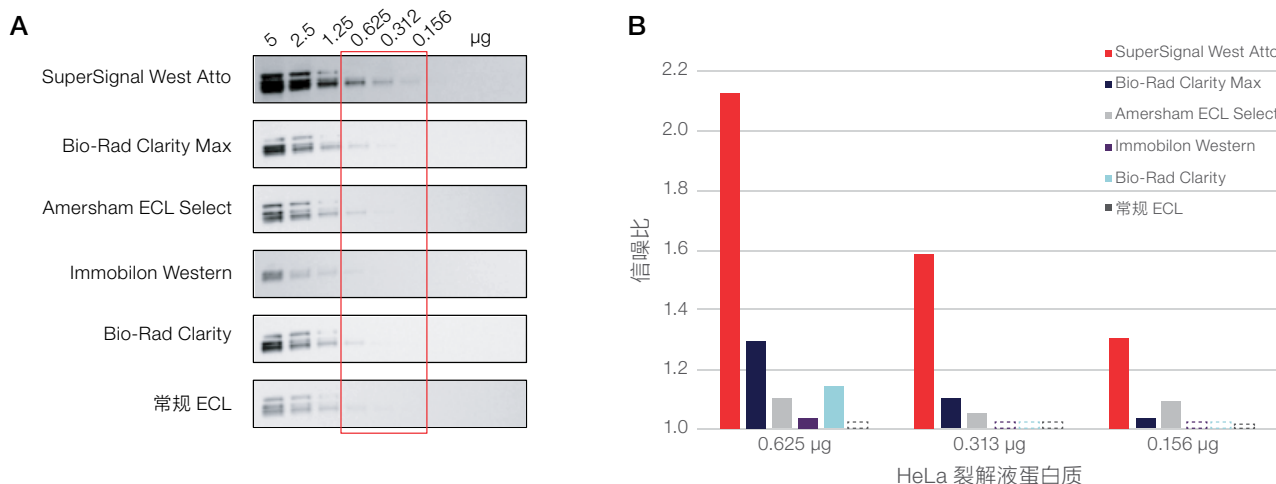


图 30. 各类市售化学发光底物与 SuperSignal West Atto 底物的比较。 (A) 使用 SuperSignal West Atto、Bio-Rad Clarity Max、Amersham ECL、Millipore Immobilon Western、Bio-Rad Clarity 和常规 ECL 底物对 HeLa 裂解液中的 Akt (pan) 进行检测。先后使用 Akt (pan) 单克隆抗体和 HRP 标记山羊抗兔 IgG 二抗对印迹进行孵育处理。按照产品说明, 将印迹与相应底物一起孵育。用 iBright 成像系统采集图像。 (B) SuperSignal West Atto、Bio-Rad Clarity Max、Amersham ECL、Millipore Immobilon Western、Bio-Rad Clarity 和常规 ECL 底物中的蛋白免疫印迹条带 (方框内) 的信噪比以条形图显示。SuperSignal West Atto 底物在所有蛋白样品中都提供了最佳的信噪比。当上样量为 0.625 µg, 常规 ECL 底物无法检测到背景噪声之上的信号。当上样量在 0.313 µg 以下, Clarity 和 Immobilon 底物无法检测到背景噪声以外的信号。

分别使用 SuperSignal West Atto、Bio-Rad Clarity 或 Millipore Immobilon 底物检测 HeLa 细胞裂解液中的 p23。SuperSignal West Atto 底物只需 1.25 µg 的细胞裂解液就能获得清晰的信

号, 而使用其他两种底物则需要 20 µg 的细胞裂解液才能达到相同的检测水平 (图 31)。

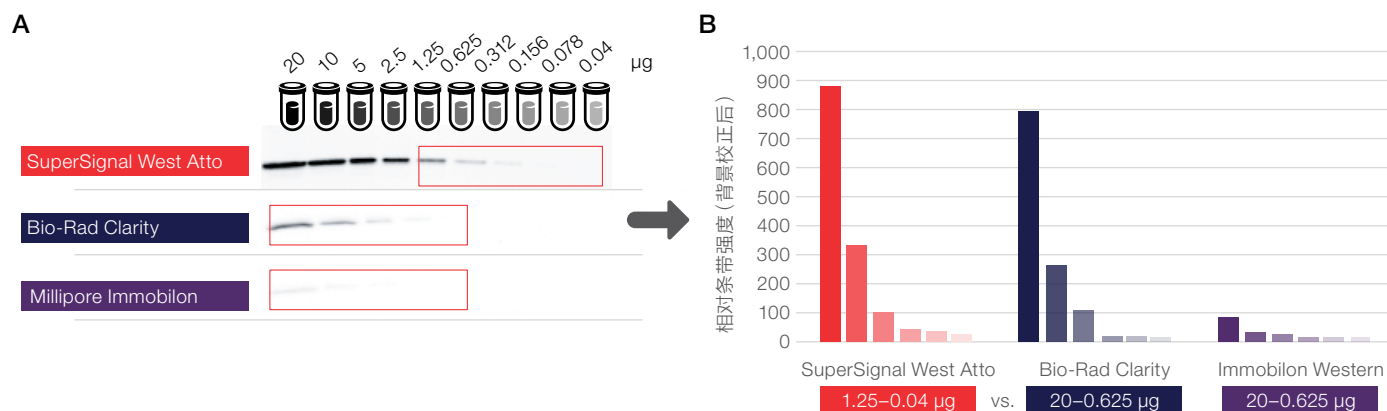


图 31. SuperSignal West Atto 底物适用于低浓度样品检测。 HeLa 细胞裂解液在 Novex Tris-甘氨酸凝胶上分离后, 使用 Power Blotter 系统和 Power Blotter 预组装转印膜组将其转移到硝酸纤维素膜上。将印迹与小鼠抗 p23 一起孵育, 然后再用 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 二抗孵育。最后, 根据产品说明, 将相应印迹与 SuperSignal West Atto 底物、Clarity Western ECL 底物 (Bio-Rad) 或 Immobilon Western 化学发光 HRP 底物 (EMD Millipore) 分别孵育。所有印迹都是用 iBright FL 成像系统同时采集的图像。

WesternBreeze AP 化学发光试剂盒

Invitrogen™ WesternBreeze™ 化学发光试剂盒可在进行转印后检测膜（硝酸纤维素或 PVDF）上固定的蛋白或斑点印迹上的蛋白。使用即用型碱性磷酸酶 CDP-Star® 化学发光底物进行检测，可通过 X 光胶片或成像系统捕获蛋白条带（图 32 和图 33）。

WesternBreeze 化学发光试剂盒包括封闭液、一抗稀释液、即用型二抗溶液（抗小鼠、抗兔或抗山羊）、即用型化学发光底物、漂洗液、孵育盒、预剪裁滤纸和聚酯片（以便底物在膜上均匀显影）。每个试剂盒包含可用于 20 次印迹检测的全套试剂。

特点：

- **信噪比良好** — 特异性高，背景干净
- **灵敏度高** — 飞克级检测水平
- **信号持续时间长** — 长达 5 天
- **快速** — 3 小时内即可获取结果

Novex AP 化学发光底物 (CDP-Star)

Invitrogen™ Novex™ AP 化学发光底物是一种无放射性的即用型 CDP-Star 溶液，用于检测（基于化学发光的免疫检测）蛋白免疫印迹或斑点印迹上的 AP 标记物。该试剂的检测灵敏度优于沉淀显色底物。使用 X 光胶片或成像仪可以实现低皮克级的检测。



小知识

比色底物或显色底物不能用剥离缓冲液剥除抗体，因为在检测过程中可能会形成有色沉淀。



印迹 A：用 WesternBreeze 化学发光试剂盒检测，曝光 10 秒。

图 32. 用 WesternBreeze 试剂盒检测人 IgG。在 Invitrogen™ NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris 凝胶（用 MES SDS 缓冲液）上分离人 IgG（h-IgG）后，转印到硝酸纤维素膜上。将印迹用兔抗人 IgG 稀释液（稀释比 1:500）孵育，再用 WesternBreeze 化学发光试剂盒（抗兔）显影。**泳道 1：**3 μ L 蛋白标准品；**泳道 2：**10 ng h-IgG；**泳道 3：**1 ng h-IgG；**泳道 4：**100 pg h-IgG；**泳道 5：**10 pg h-IgG。

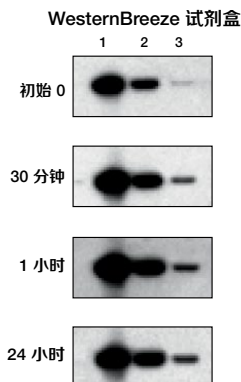


图 33. 用 WesternBreeze 化学发光试剂盒获取的信号。用 NuPAGE 4-12% Bis-Tris 凝胶（用 MES SDS 缓冲液）分离含有 V5 抗原决定簇标签的 53 kDa 蛋白质（Invitrogen™ Positope™ 对照蛋白质），然后转印到 PVDF 膜上。将印迹用小鼠抗 V5 一抗稀释液（稀释比 1:5,000）孵育。使用含有抗小鼠二抗的 WesternBreeze 检测系统（胶片曝光时间不断延长）进行检测。曝光时间为两分钟。初始是指曝光时间低于 5 分钟（去除多余底物后）。随后的时间点是初始曝光之后的数分钟或数小时。1-3 泳道分别含有 20 ng、2 ng 和 200 pg 的 Positope 对照蛋白质。

CSPD 底物

Invitrogen™ CSPD™ 底物（含 Nitro-Block™ 增强剂）是一种即用型化学发光 AP 底物，可用于 PVDF 膜和硝酸纤维素膜上的蛋白质或核酸印迹。CSPD 化学发光底物的灵敏度高、速度快且使用方便，可用于检测 AP 和 AP 标记分子。

这种通用化学发光底物在基于膜的应用（例如，DNA 印迹、RNA 印迹和蛋白免疫印迹）中表现出极高灵敏度。在约 10 分钟内达到最大发光水平，并且能持续发光数小时。

显色蛋白免疫印迹检测

显色底物（沉淀底物）已被广泛使用多年，是最简单和性价比最高的检测方法。当这些底物与合适的酶接触时，它们就被转化成不溶性的有色产物，沉淀在膜上（图34）。由此产生的有色条带或斑点无需特殊设备处理或可视化。显色印迹底物有多种规格和形式可供选择。底物的选择取决于酶标签和所需的灵敏度。

低灵敏度的显色印迹检测使其难以检测低丰度的蛋白质。虽然反应时间可以持续数小时甚至一整夜，但这也会增加背景信号。显色印迹检测的灵敏度不高，但它们是高丰度蛋白

质检测的理想选择。由于酶-底物反应生成有色沉淀，信号稳定，因此显色底物通常不会出现化学发光底物可能出现的假阴性结果。显色检测法的另一个优点是，当达到所需的信号时，可以停止反应，从而使信号的饱和度降到最低。然而，与化学发光印迹检测法不同的是，有色沉淀不易剥离，无法重复检测。来源于不同供应商的底物的性能可能会有很大的不同。这是因为它的性能会受到底物浓度和纯度，以及添加剂和缓冲剂成分的影响。

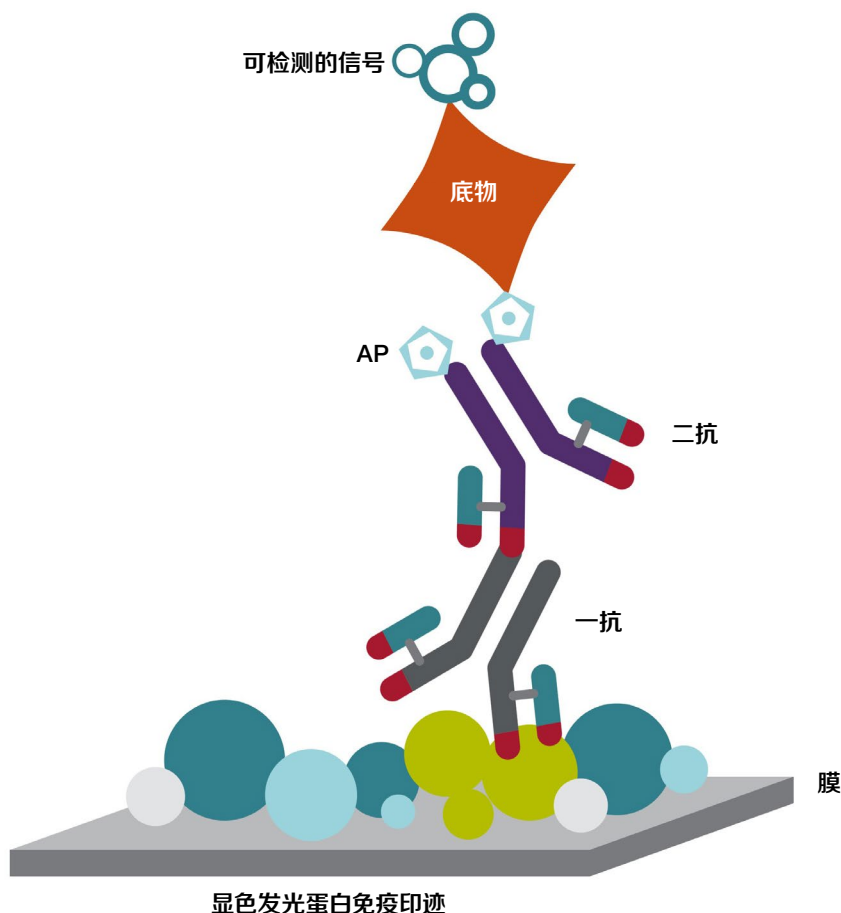


图 34.显色蛋白免疫印迹检测中酶-底物反应的概览。

显色 HRP 底物

显色 HRP 底物大多数都需要添加过氧化物进行比色检测（图35）。由于过氧化物在工作浓度下保质期极短，所以通常需要在将使用前将过氧化氢和底物一起加入缓冲液中。因此，这些底物的保质期通常只有几个小时。许多市售的沉淀 HRP 底物是与稳定的过氧化物酶底物缓冲液配套提供，或已溶在稳定的过氧化物酶底物缓冲液中出售的。这些溶液中的稳定的过氧化物通常是浓缩的，比传统的 30% 过氧化氢储备溶液的腐蚀性要小。由于传统 30% 过氧化氢和过氧化氢的稀释溶液并不稳定，因此使用稳定的过氧化物试剂能提供更稳定的结果。四甲基联苯胺（TMB）是酶联免疫吸附法（ELISA）中 HRP 的最常用底物。然而，在有 HRP 和过氧化物的情况下，该底物会生成一种水溶性的蓝色产物，可以沉淀在膜上。Thermo Scientific™ 1-Step™ Ultra TMB-Blotting 溶液是一种单组分的过氧化物酶底物，可用于蛋白免疫印迹法和免疫组织化学法（表21）。在酶存在时形成深蓝色的沉

淀产物。1-Step Ultra TMB-Blotting 溶液非常适合需要高信噪比的应用。在 HRP 和过氧化物存在的情况下，DAB（二氨基联苯胺）会生成棕色沉淀。这种棕色不溶产物很容易与四氧化钼整合。因此，可以通过添加金属（例如，镍、铜、银和钴）形成络合物而使棕色沉淀更强。金属络合物的颜色比 DAB单独生成的棕色沉淀更深，提高了显色应用的灵敏度。氯萘酚（4-氯-1-萘酚，4-CN）可用于蛋白免疫印迹法和免疫组织化学法的 HRP 显色检测。这种方法产生的沉淀物不像 TMB 和 DAB 那样灵敏或稳定，但醇溶性沉淀物成像方便，并具有明显的蓝紫色，适用于双重显色应用。4-CN 和 DAB 都有各自的优势，通常被一起使用，如 Thermo Scientific™ CN/DAB 底物试剂盒中使用的 CN/DAB 溶液。CN/DAB 底物灵敏度高，生成的深黑色沉淀物易于成像。CN/DAB 底物在蛋白免疫印迹和斑点印迹应用中效果很好。

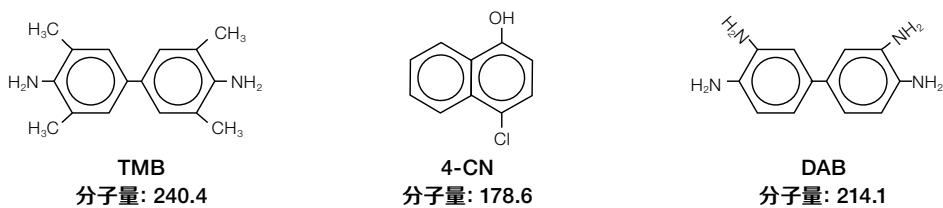


图 35.用于蛋白免疫印迹的显色 HRP 底物。

表 21.Thermo Scientific™ HRP显色底物的特性的比较。

	金属增强型 DAB 底物试剂盒	1-Step Ultra TMB-Blotting 底物溶液	Pierce CN/DAB 底物试剂盒	1-Step 氯萘酚底物溶液
检测限	17 pg	20 pg	500 pg	5 ng
颜色	棕色 - 黑色	深蓝色	黑色	蓝紫色
规格	双组分试剂盒	即用型溶液	即用型溶液	双组分试剂盒
建议抗体稀释比（基于 1 mg/mL 储备液计算）	1°: 1:1,000 2°: 1:5,000–1:50,000	1°: 1:1,000 2°: 1:5,000–1:10,000	1°: 1:500 2°: 1:2,000–1:20,000	1°: 1:500 2°: 1:2,000–1:20,000
货号	34065	37574	34000	34012

显色 AP 底物

硝基四氮唑蓝 (NBT) 属于四唑盐中的杂环有机化合物。被还原时, 该化合物会生成NBT-甲臃, 一种颜色明显、不溶于水的产物。该底物被广泛用于免疫化学检测技术, 因为甲臃生成的颜色在宽范围内有良好且稳定的线性关系。5-溴-4-氯-3-吲哚基磷酸盐 (BCIP) 被 AP 水解后会生成蓝紫色的沉淀物, 可以沉积在硝酸纤维素膜或尼龙膜上。BCIP 可用作免疫印迹和免疫组织化学的显色底物。NBT 和 BCIP 是 AP 体系印迹检测的一种理想组合。共同使用可以生成浓黑紫色沉淀, 其灵敏度比单独使用任何一种底物都要高得多 (表 22 和图 36)。该反应速度稳定, 因此能够精确控制其相对灵敏度。NBT/BCIP 的优点是形成锐利且分辨率高的条带, 膜的背景信号很少。

表 22.Thermo Scientific™ AP显色底物的特性。

	1-Step NBT/BCIP 底物溶液
检测限	30 pg
颜色	黑紫色
规格	即用型溶液
建议抗体稀释比 (基于 1 mg/mL 储备液计算)	1°: 1:500 2°: 1:5,000–1:50,000
货号	34042

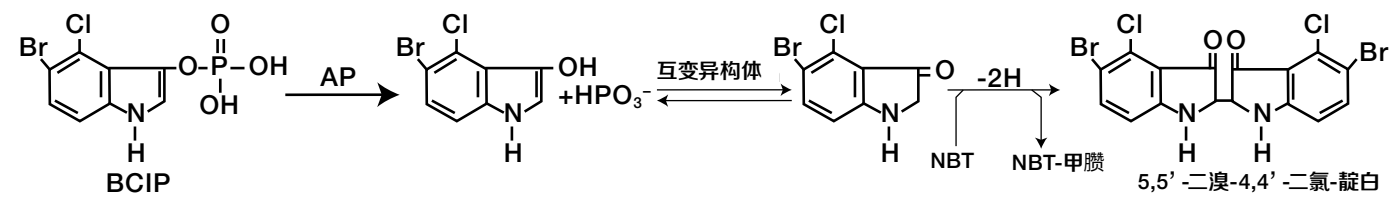


图 36.NBT 和 BCIP 底物与 AP 的化学反应。BCIP 被 AP 水解, 生成一个中间体, 该中间体经过二聚反应生成靛蓝染料。NBT 被二聚反应生成的两个还原当量还原成 NBT-甲臃。该反应以稳定的速度进行, 可以准确地控制相对灵敏度和反应的进程。

Pierce 金属增强型 DAB 底物试剂盒

Thermo Scientific™ Pierce™ 金属增强型 DAB 底物试剂盒在二氨基联苯胺过氧化物酶底物的特殊配方中使用了氯化钴和氯化镍, 使免疫组织化学染色产生较深的颜色。

特点:

- **灵敏度高** — 比传统的 DAB 方法灵敏 50 倍, 比其他金属增强型 DAB 灵敏 30 倍
- **背景低、强度高** — 产生脆性的深褐黑色沉淀物, 比使用未增强 DAB 产生的灰褐色沉淀物颜色更深。而且, 即使强度增加, 背景仍几乎不存在
- **仅有两种组分** — 只需将两种液体组分混合, 您的工作溶液便立即可用
- **长时间稳定** — 工作溶液在室温下可稳定存放 6 小时以上, 而其他的 DAB 底物必须立即使用

1-Step Ultra TMB-Blotting 溶液

Thermo Scientific™ 1-Step Ultra TMB-Blotting 溶液是一种用于蛋白免疫印迹的增强型单组分 HRP 底物。与许多其他显色底物相比,这种用于 HRP 体系的沉淀型显色液可实现高灵敏度、高信噪比和低背景的印迹检测。印迹溶液含有可溶性 TMB (3,3',5,5'-四甲基联苯胺),能非常迅速地与辣根过氧化物酶反应,产生不溶性深蓝色沉淀,该沉淀不会褪色或剥落。底物与硝酸纤维素和 PVDF 膜兼容。提供的印迹溶液为即用型,无需混合。

特点:

- **快速** — 不到一分钟蛋白质条带即可显现
- **抗褪色** — 转印膜干燥后蛋白质条带保持稳定
- **灵敏** — 检测限与 Thermo Scientific™ Pierce™ ECL 蛋白底物相似
- **显色** — 无需特殊设备即可观察到深蓝色条带
- **即用型** — 无需有机溶剂溶解;使用时无需稀释



1-Step Ultra TMB-Blotting 溶液 来自供应商 B 的 TMB 底物

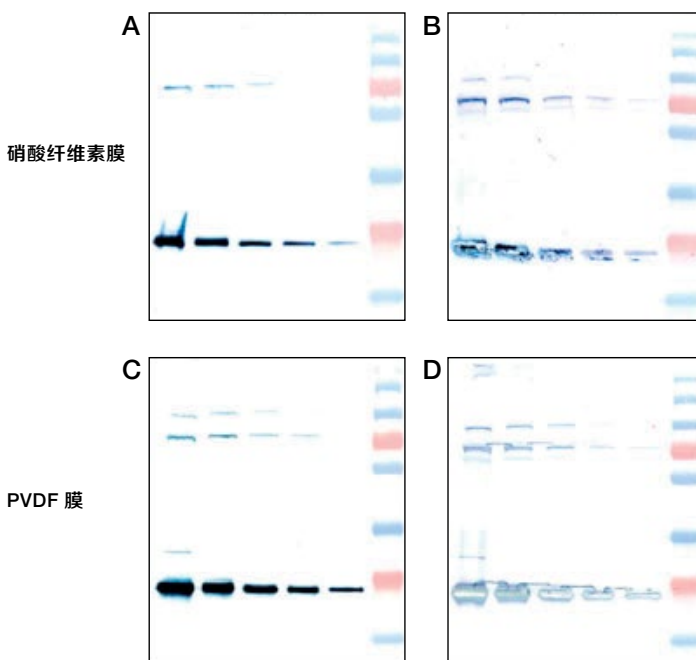


图 37.用 1-Step Ultra TMB-Blotting 溶液和另一种市售 TMB 底物进行检测。制备 HepG2 细胞裂解液连续稀释液 (15、7.5、3.45、1.88、0.94 μg) 并通过电泳分离。把蛋白质转印到 (A, B) 硝酸纤维素膜和 (C, D) PVDF 膜上。用 1X Pierce Clear Milk 封闭缓冲液封闭转印膜。封闭后,将膜与 Invitrogen™ 小鼠 PLK-1 单克隆抗体和兔抗环素 B 多克隆抗体一起孵育。漂洗转印膜,然后将膜与 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Invitrogen™ 山羊抗小鼠 IgG (H+L) 二抗 (HRP 偶联物) 和山羊抗兔 IgG (H+L) 二抗 (HRP 偶联物) 一起孵育,并再次漂洗。用(A, C) 10 mL 1-Step Ultra TMB-Blotting 溶液和来自供应商 B 的 (B, D) TMB 底物孵育转印膜。用超纯水漂洗转印膜,在 (C, D) 3分钟和 (A, B) 5分钟时中止显色。

Pierce CN/DAB 底物试剂盒



Thermo Scientific™ Pierce™ CN/DAB 底物试剂盒包含基于氯萘酚和二氨基联苯胺联合检测的 Western 印迹和组织染色方法中辣根过氧化物酶 (HRP) 活性检测的底物和过氧化物溶液。试剂盒将两种常用的显色过氧化物酶底物化合物 (4-CN 和 DAB) 组合成单一、稳定的 10X 储存液。在印迹和组织样本上, 这种 CN/DAB 溶液在结合 HRP 标记抗体的位点上产生深黑色沉淀。该试剂盒包括 10X CN/DAB 溶液和的 1X 稳定过氧化物底物缓冲液。

特点:

- **HRP 底物** — 可通过 4-CN 和 DAB 的共同作用检测固相介质上的 HRP 活性
- **显色** — 无需特殊设备即可生成易于目测和拍照的深黑色条带
- **易于使用的试剂盒** — 提供底物储存液和稳定过氧化物底物缓冲液, 您无需称量和溶解干粉
- **稳定** — 在 4°C 下冷藏, 至少可保存一年

1-Step 氯萘酚溶液



氯-1-萘酚 (4-CN) 溶液, 可用于在蛋白免疫印迹法和组织化学染色中对 HRP 活性进行显色检测。氯萘酚与 HRP 反应生成明显的蓝色或蓝紫色产物, 可以在印迹或固定的组织样本上识别和可视化过氧化物酶标记抗体的活性。HRP 底物不像其他显色底物 (例如, TMB 和 DAB) 那样灵敏或稳定。然而, 蓝紫色沉淀可以很好地成像, 良好的醇溶性使它适应于某些双重染色的应用。

特点:

- **即用型** — 溶解时无需乙醇或甲醇; 无需稀释
- **配方完整** — 无需添加缓冲溶液或过氧化氢
- **预过滤** — 使用前无需溶解粉末或药片并进行过滤
- **稳定** — 在 4°C 下冷藏, 至少可保存一年

Pierce NBT 底物和 Pierce BCIP 底物



Thermo Scientific™ NBT 底物和 BCIP 底物是硝基四氮唑蓝 (NBT) 和 5-溴-4-氯-3-吡啶基磷酸盐 (BCIP) 的粉末和成品溶液, 用于免疫印迹和 IHC 的 AP 显色检测, 可生成不溶性浓黑紫色沉淀。Pierce NBT 和 BCIP 粉末可单独提供或以两种便利、即用型溶液的形式提供 (含和不含内源性磷酸酶活性的左旋咪唑抑制剂)。

特点:

- 适用于免疫印迹应用
- 灵敏度高, 背景低, 检测间的差异性极小
- 可选择单独的 NBT 和 BCIP 底物粉末, 或选择预制的即用型 1-Step NBT/BCIP 底物溶液 (含或不含左旋咪唑抑制剂)

WesternBreeze AP 显色试剂盒



Invitrogen™ WesternBreeze™ 显色试剂盒可提供背景极低的高灵敏度结果, 无需额外的设备, 即可在短时间内观察信号。该试剂盒采用显色磷酸酶底物 BCIP 和电转试剂 NBT, 可在印迹膜上的蛋白条带处产生深蓝色沉淀。WesternBreeze 试剂盒已优化, 具有皮克级的灵敏度。每个试剂盒都包括即用型的免稀释封闭液、一抗稀释液、漂洗溶液、二抗溶液 (AP 标记抗小鼠、抗兔或抗山羊)、底物和两个孵育盒。

特点:

- 背景干净
- 灵敏度高, 低皮克级检测水平
- 特异性高
- 方案简单, 无需优化

荧光蛋白免疫印迹检测

基于荧光的蛋白免疫印迹检测与其他检测系统不同, 产生的信号不是酶反应的产物, 而是荧光基团被激发后, 从激发态回到基态时发出的荧光(图38)。荧光蛋白免疫印迹的光信号更稳定, 因此比其他检测方法更能准确定量。

荧光蛋白免疫印迹法越来越受欢迎, 因为它比化学发光检测法更节省时间, 并且与化学发光和显色检测系统相比, 它产生的化学废液更少。过去, 用于荧光检测的仪器要么无法满

足灵敏度的需求, 要么价格过高。然而, 随着成像技术的进步, 新的荧光探针的开发, 以及两者成本的降低, 荧光检测系统正在迅速取代常用的显色检测法和化学发光检测法。虽然荧光检测灵敏度不如化学发光检测, 但荧光检测具有独特的优势: 可以在同一印迹上同时检测多个靶标, 而无需剥离并重复检测(也称为多重检测)。

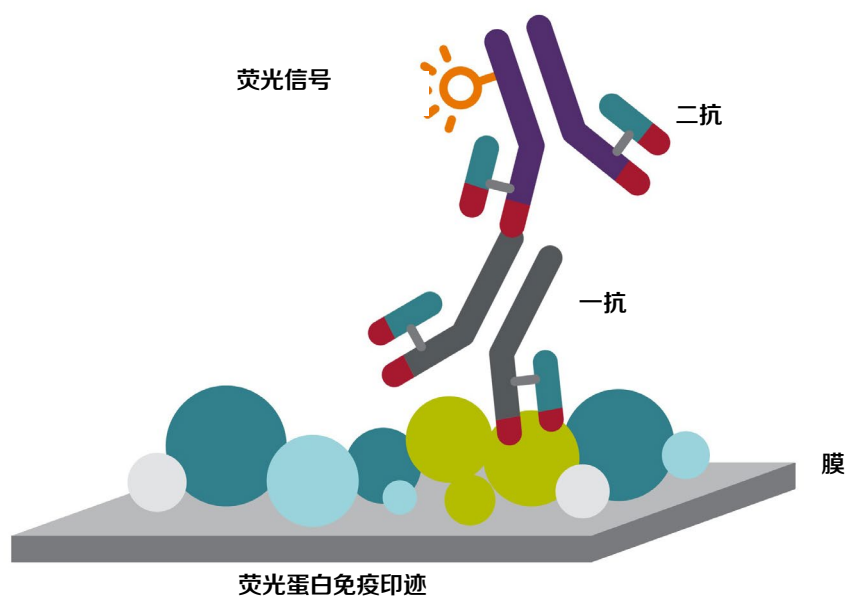


图 38. 荧光蛋白免疫印迹检测的概览。

观看操作视频, 请点击[此处](#)。

Alexa Fluor二抗和 Alexa Fluor Plus二抗

Invitrogen™ Alexa Fluor™二抗和Alexa Fluor Plus二抗应用广泛, 能提供多种光谱选择, 帮助更好地完成蛋白免疫印迹的多重检测。可以在同一泳道中独立检测多个靶标, 且条带颜色清晰可辨。Alexa Fluor Plus二抗具有更高的灵敏度和更宽的检测范围, 以获得更高的信噪比和更好的多重检测结果。

特点:

- **可检测低丰度靶标**—荧光蛋白免疫印迹中的信噪比可提高 5.8 倍
- **预吸附**—最大限度地减少交叉反应, 从而获得低背景和高质量的多重检测结果
- **线性范围更广**—高灵敏度和宽线性检测范围, 可以获得更多图像细节 (图 39)
- **光稳定**—光稳定性更好, 亮度更高

Invitrogen提供多种靶标种属和宽光谱范围(405–800nm)染料的Alexa Fluor Plus二抗, 适用于多重蛋白免疫印迹应用 (表 23)。

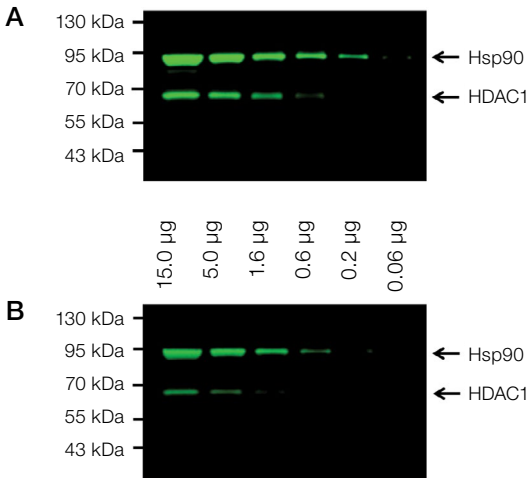


图 39.检测灵敏度的比较。(A) Invitrogen™ Alexa Fluor Plus 800 二抗在更低浓度的样本中显示出更多条带, 与 (B) 另一家供应商的荧光基团标记二抗相比, Invitrogen™ Alexa Fluor™ Plus 800表现出更高的灵敏度和更宽的检测范围。

表 23.Alexa Fluor Plus 二抗可提供种类齐全的物种与波长选择。

	Alexa Fluor Plus 405	Alexa Fluor Plus 488*	Alexa Fluor Plus 555	Alexa Fluor Plus 594	Alexa Fluor Plus 647*	Alexa Fluor Plus 680	Alexa Fluor Plus 800
山羊抗兔	A48254	A32731	A32732	A32740	A32733	A32734	A32735
山羊抗小鼠	A48255	A32723	A32727	A32742	A32728	A32729	A32730
山羊抗鸡	A48260	A32931	A32932	A32759	A32933	A32934	A32935
山羊抗大鼠	A48261	A48262	A48263	A48264	A48265	—	—
山羊抗人	A48275	A48276	A48277	A48278	A48279	—	—
驴抗山羊	A48259	A32814	A32816	A32758	A32849	A32860	A32930
驴抗兔	A48258	A32790	A32794	A32754	A32795	A32802	A32808
驴抗小鼠	A48257	A32766	A32773	A32744	A32787	A32788	A32789
驴抗大鼠	A48268	A48269	A48270	A48271	A48272	—	—

*所有 Alexa Fluor Plus 488 和 647 二抗均提供 100 µg 小包装



小知识

所有的 Alexa Fluor Plus 二抗都针对潜在交叉反应物种进行了交叉吸附处理。交叉吸附或预吸附是额外的纯化步骤, 可以提高抗体的特异性, 从而减少背景染色和交叉反应。二抗溶液需通过含有固定化血清蛋白 (来自潜在的交叉反应物种) 的纯化柱。只有非特异性结合的二抗才会被捕获在柱状基质上, 而特异性高的二抗则流过。进一步通过更多的纯化柱, 可以得到高度交叉吸附的二抗。在可能与其他一抗发生交叉反应的多色染色实验中, 这些额外纯化步骤的优点显而易见。

化学发光和荧光检测的数据采集

在化学发光检测方法中, 化学反应 (HRP或AP介导) 产生的信号可通过 X 光胶片或合适的蛋白免疫印迹成像仪捕获。当用 X 光胶片捕获化学发光信号时, 需要在不同的时间段曝光多张胶片, 以优化最佳的信号和背景。目的是找到恰当的曝光时间, 使目的信号清晰可见, 同时保持低背景。但这通常是很难做到的, 因为无法监测曝光过程并在理想的时间点即刻捕捉信号。

如果胶片曝光不足, 可能监测不到信号。如果胶片曝光过度, 信号可能会过饱和, 或出现强背景, 导致目的信号与背景区分不明显。所有情况都使信号捕获后的数据分析变得困难。尽管 X 光胶片可以提供定性和半定量的结果并用于确认目的蛋白的存在, 但蛋白免疫印迹成像仪可以提供比胶片更高的灵敏度和更宽的动态范围, 从而可以检测到样品之间更细微的差异。此外, 您不必在暗室里花时间将印迹曝光在胶片上, 然后再冲洗胶片。使用蛋白免疫印迹成像仪, 以数字方式采集数据, 无需扫描 X 光胶片后再进行后续分析。此外,

许多系统还提供自动曝光算法, 以帮助获得最佳信噪比。

虽然 X 光胶片不贵, 但还要考虑维护暗室和相关显影设备的费用。新式蛋白免疫印迹成像仪的前期费用可能比一般的 X 光胶片的费用要高, 但这些仪器除了可以捕获化学发光蛋白免疫印迹信号外, 还适用于其他应用 (如显色蛋白凝胶染料), 因此相对性价比更高了。

市售有能够捕获荧光信号的荧光蛋白免疫印迹成像系统, 其中大多数系统采用基于滤光片或激光的技术来提供适当的激发波长, 然后记录发射光。大多数仪器都是基于 CCD 相机的, 但也有基于雪崩光电二极管的扫描系统。采集的图像以数字方式保存。具有不同激发光谱和发射光谱的市售荧光标记抗体不断被开发, 这为用户提供了多种选择。

当配备有适当滤光片或激光器的成像仪与光谱不重叠的荧光基团标记抗体一起使用时, 可以实现多重分析, 在同一印迹中可以检测多个靶标。与通用的化学发光检测相比, 它不需要对印迹进行多次剥离和重复检测, 就能对每个感兴趣的靶标蛋白可视化。每一次的剥离和重新检测, 都有可能从印迹上剥离目标蛋白质, 这将干扰不同目标蛋白之间的比较。因此, 多重检测有助于提高效率和数据产出。例如, 可以将目标蛋白与上样内参蛋白同时可视化(图 40), 区分分子量相近的蛋白(图 41), 并评估复杂的生物通路(图 42)。对于“多重检测”, 检测 2 个目标蛋白质被称为双重实验, 检测 3 个目标蛋白质被称为三重实验, 以此类推。使用 Invitrogen™ iBright™ FL 1500 成像系统, 搭配适当的实验条件和抗体选择可以实现多达四重的荧光蛋白免疫检测(图 43)。

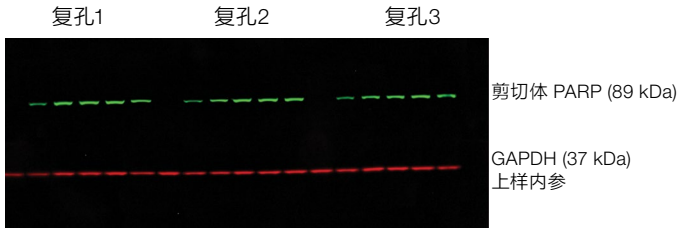


图 40.同时检测目标蛋白和上样内参蛋白。在不同荧光通道中捕获每种蛋白质的信号, 使得能在一个印迹上检测两种蛋白质, 而无需剥离和重复检测。所示的图像为叠加了所有探针信号的组合图像。

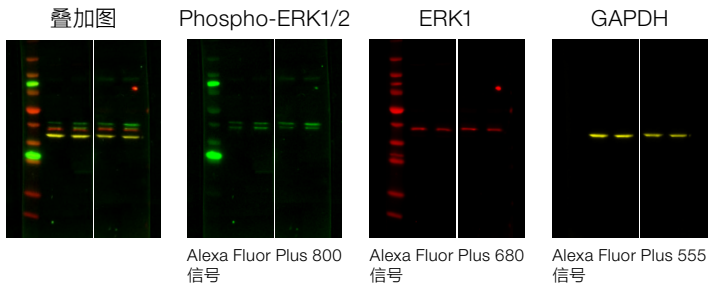


图 41.检测分子量相近的靶标。荧光多重检测能够在同一印迹上明确区分多个靶标, 即使它们的分子量相似。上图展示了叠加图以及单个靶标蛋白的信号图像。将单个信号可视化, 有时可以评估在叠加图中难以看到的细节。

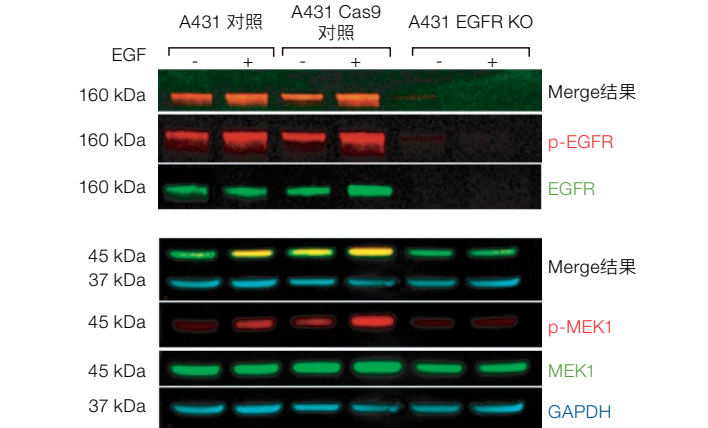


图 42.对复杂的生物信号通路进行评估。用 EGF 处理 EGFR 敲除 (KO) 的 A431 细胞后, 对 EGFR 及其下游靶蛋白 MEK1 的磷酸化进行蛋白免疫印迹分析。

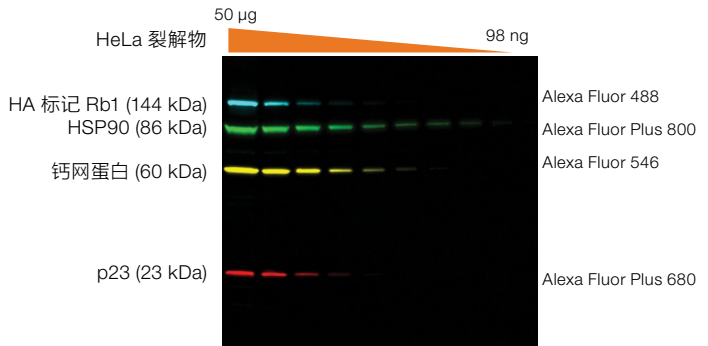


图 43.在 iBright 成像系统上成像的四重蛋白免疫印迹检测。

iBright 成像系统

使用 Invitrogen™ iBright™ 成像系统,可以更轻松地从此凝胶和蛋白免疫印迹中捕获并分析数据。iBright 成像系统具有精简、直观的操作界面和 workflows,各种经验水平的研究人员都能轻松使用。

iBright 成像系统系列有三种型号: iBright™ CL750 成像系统、iBright™ CL1500 成像系统和 iBright™ FL1500 成像系统。iBright CL750 成像系统提供最核心的蛋白免疫印迹和凝胶成像基本功能,轻松实现由使用胶片和暗室检测的转换。iBright CL1500 成像系统扩展了应用领域,并具有我们主推的 iBright FL1500 型号的许多高性能技术参数。iBright FL1500 成像系统具有最多的应用选择,包括一次最多可拍摄四个荧光通道的荧光蛋白免疫印迹成像。

特点:

- **触摸屏操作、优化的曝光设置** — Smart Exposure™ 采集技术可快速确定最佳曝光时间,有助于最大限度地减少重复曝光,以获得想要的信号条带。
- **强大的 910 万像素摄像头** — 910万真实像素冷CCD,采集清晰、锐利、印刷级别的图像
- **高级自动化功能** — 自动旋转样品、自动变焦、自动聚焦和自动机载数据分析,可以提供流畅的成像体验
- **五通道荧光检测** — 用 iBright FL1500 型号五个荧光通道进行多重检测;在一个印迹上采集多达四种靶标信号,从而获取更有意义且具有代表性的比较数据
- **合规性支持** — 所有型号都提供 21 CFR Part 11 合规性支持软件包,以保证数据安全、审计和电子签名



有关产品介绍,请观看:

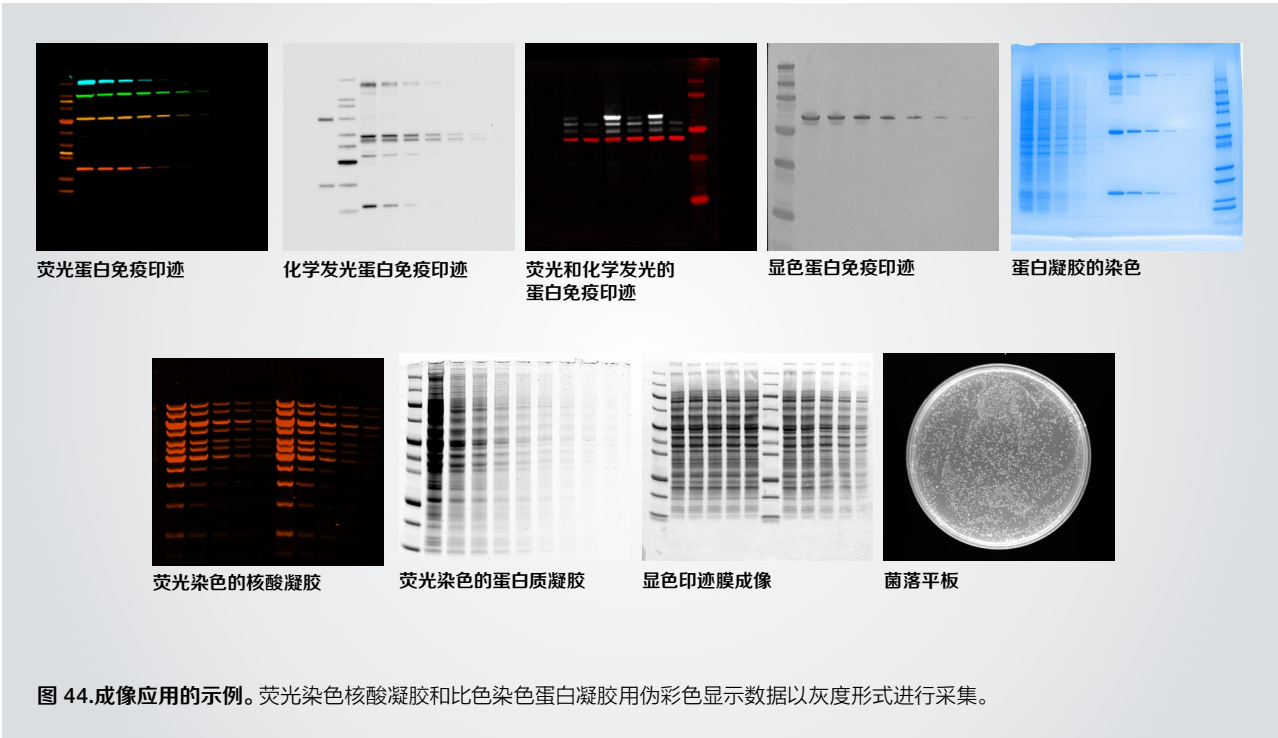


让数据采集更快、更轻松。了解更多信息,请浏览 thermofisher.com/ibright

iBright 成像系统提供多达五种成像模式，可满足您的多种检测应用（表 24）。助您简单高效地进行蛋白质凝胶、核酸凝胶、化学发光、荧光蛋白免疫印迹等的图片拍摄和数据采集（图 44）。

表 24.iBright 成像系统上的成像模式。

成像模式	可采集的信号类型
蛋白质凝胶	比色法染色的凝胶（例如，考马斯亮蓝、银染），转印膜（例如，丽春红、Thermo Scientific™ Pierce™ 可逆蛋白质染料）和荧光染色凝胶（例如 Invitrogen™ SYPRO™ Ruby）。
核酸凝胶	溴化乙锭和 Invitrogen™ SYBR™ 染料染色
化学发光印迹	所有常用 HRP 和 AP 底物（例如，Thermo Scientific™ SuperSignal™ 和 Invitrogen™ WesternBreeze™ 底物）的化学发光信号
荧光印迹	常用 RGB（可见光范围）和近红外荧光基团（例如，Invitrogen™ Alexa Fluor™ 和 Alexa Fluor™ Plus）的荧光信号
通用	自定义模式用于对含有多种信号（例如，化学发光、荧光、比色染色和/或可见光图像）的样品进行成像；图像显示类似于荧光印迹模式，并允许对任意样本进行伪彩色处理

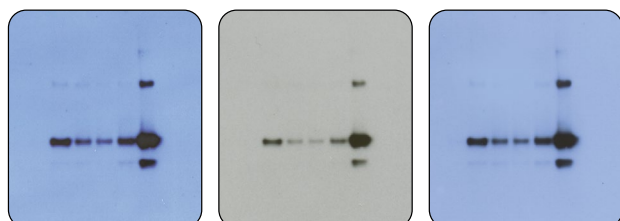


CL-XPosure 胶片

Thermo Scientific™ CL-XPosure™ 胶片是一种经济实惠的透明蓝色 X 光胶片, 用于检测和记录基于 ECL 的 Western 印迹和其他化学发光的蛋白或核酸分析结果。CL-XPosure 胶片是一种高品质照相底版胶片, 可与辣根过氧化物酶 (HRP) 或碱性磷酸酶 (AP) 的增强化学发光 (ECL) 底物配合使用。提供适用于标准胶片盒和胶片显影设备的尺寸。该胶片还可用于化学发光或同位素 DNA 和 RNA 检测, 包括 Southern 和 Northern 印迹和凝胶迁移分析 (EMSA)。

特点:

- **高性能** — 与其他市售的放射自显影胶片一样灵敏 (图 45)
- **便利** — 提供五种尺寸规格, 每盒都包含 100 张胶片



CL-XPosure 胶片

Kodak™ BioMax™
MR-1 胶片

Kodak™ X-Omat™
Blue (XB) 胶片薄膜

图 45. CL-XPosure 胶片与 Kodak 胶片的比较。使用完全相同的蛋白免疫印迹条件测试三种类型的 X 光胶片 (2 种蓝色, 1 种灰色)。结果显示这些薄膜之间没有明显的差异。唯一明显的差别是每张胶片的价格。



小知识

Western blot X-光胶片可以完全手动显影

蛋白免疫印迹检测的归一化和定量

由于凝胶电泳中的蛋白质上样量因样本而异，权威期刊已经制定了蛋白质归一化指南，用于规范定量 WB 数据。

常用的蛋白质归一化方法主要依靠测量所有样品中都有恒定表达的内源性管家蛋白的丰度。 α -微管蛋白(α -tubulin)、 β -肌动蛋白(β -actin)或甘油醛3-磷酸脱氢酶(GAPDH)等蛋白通常用作蛋白质归一化的上样对照，管家蛋白的信号可以在较大的浓度范围内保持线性，以便用作归一化的可靠参考，并且较少受实验条件的影响。但是这种方法存在潜在的缺陷。由于丰度较高，管家蛋白经常出现饱和信号；在某些特定实验条件下，管家蛋白的表达会发生变化，虽然这些缺陷可以通过优化来降低，但这是一个耗时的过程。此外还需使用抗体检测管家蛋白，除了抗体的费用，还要额外的步骤来剥离和重新检测目的蛋白条带。

另一种蛋白质归一化方法是使用总靶蛋白对翻译后修饰蛋白质进行归一化。使用可识别蛋白不同修饰状态的pan抗体，将翻译后修饰（例如磷酸化、糖基化、乙酰化和泛素化）的目的蛋白归一化为相应的总蛋白。使用这种方法对翻译后修饰的目的蛋白进行归一化有许多缺点。pan 或总靶蛋白抗体必须识别所有翻译后修饰和未修饰的目的蛋白。另外，用于归一化的总靶蛋白的表达在所有实验条件下必须是恒定的。这种方法的线性动态范围通常很窄。

比起管家蛋白或翻译后修饰的总靶蛋白归一化，总蛋白归一化(TPN)是一种更好的替代方法。它避免了使用管家蛋白的可变性和不精确性、减少优化条件的时间消耗和检测归一化靶蛋白的试剂成本。

TPN方法中，一个印迹上的总蛋白被标记或染色，使每个泳道中上样的相对蛋白量得以比较并与参考泳道做对比进行归一化。丽春红和几种可逆荧光染料可用于印迹上的TPN总蛋白染色。这些染料的缺点是：要求在染色之后对印迹进行成像，然后在免疫印迹步骤之前去除染料。WB 完成后必须再次成像，然后才能进行结果的归一化。这些染色、洗脱和多个成像步骤非常耗时。

除了使用像丽春红这样的印迹染色剂进行TPN外，还有另一种替代方法。但是这种方法需要购买和使用一种特殊的凝胶，这种凝胶可能不能兼容您目前优化过的目的蛋白分离体系。该方法需要一个特定的凝胶成像仪来捕捉图像，并且需要在免疫印迹步骤之前对印迹上的总蛋白进行成像，因为来自靶蛋白的化学发光信号会干扰印迹上的总蛋白信号。

Invitrogen™ No-Stain™ 蛋白质标记试剂具有 TPN 的优点，且兼容任意凝胶类型。它可以轻松标记转印至膜上的蛋白质（图 46）。通过与蛋白的赖氨酸残基形成共价键，No-Stain 试剂可产生稳定的信号，与抗体孵育的印迹膜同时成像。

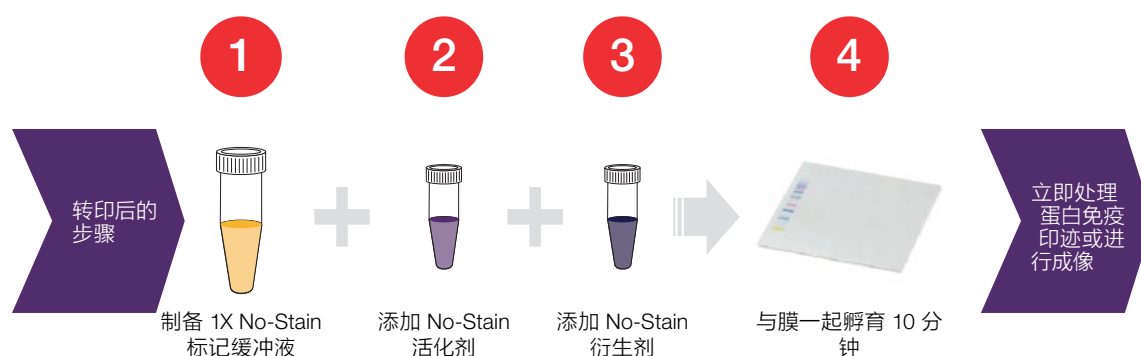


图 46. 转印后，用 No-Stain 蛋白质标记试剂对蛋白质印迹进行标记。

观看操作视频：



No-Stain 蛋白质标记试剂

基于内参蛋白的蛋白质免疫印迹归一化存在一定的偏差，这是因为内参蛋白的表达水平在不同的实验处理和生理条件下可能会发生变化，而且这些蛋白产生的信号通常会超出检测的线性范围，从而影响定量分析的准确性。利用 Invitrogen™ No-Stain™ 蛋白标记试剂进行总蛋白归一化则无需检测内参蛋白，从而避免因此造成的差异和不准确性，在保证实验有效性的同时节省了时间和成本。

特点:

- **标记方式灵活** — 适用于任何蛋白凝胶和膜类型，您可在转印后对膜进行总蛋白标记，或当电泳后不需要进行转印时，将其作为一种快速的蛋白凝胶染料
- **操作简单快速** — 混匀后，对转印后的PVDF/硝酸纤维素膜，或者凝胶进行孵育，以标记赖氨酸残基，反应时间仅需10分钟
- **灵活的检测方式** — 可使用 UV 透射仪、蓝色 LED 透射仪或带有荧光 (约 488 nm) 光源的成像仪进行检测，包括 iBright FL1500 智能成像系统
- **准确的总蛋白归一化** — 1-80 g (总蛋白上样量，图 47) 宽线性范围；可检测低至20 ng的蛋白条带，信号可与使用化学发光或荧光法进行检测的抗体所兼容

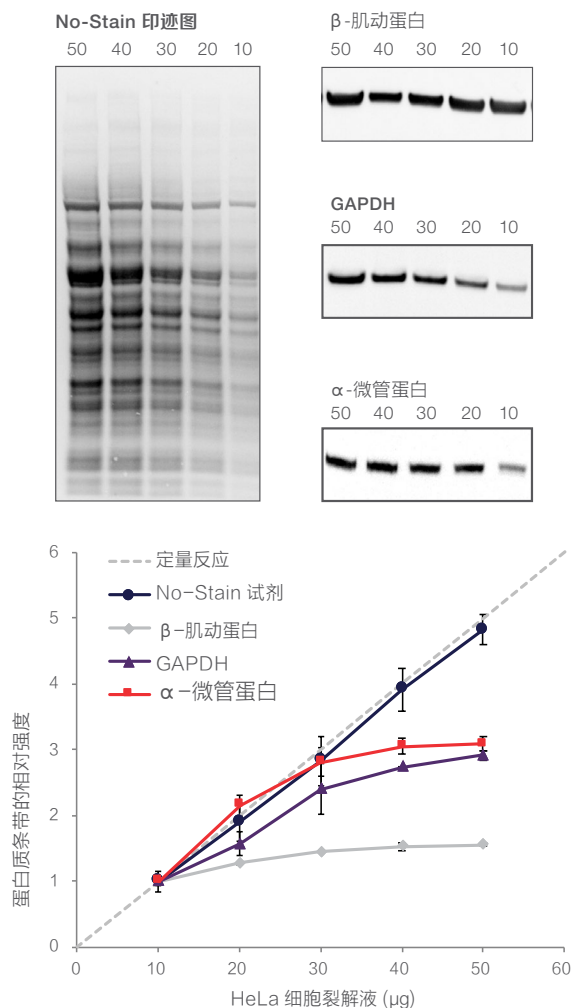


图 47.用 No-Stain 蛋白质标记试剂进行总蛋白归一化。 Bolt 4-12% Bis-Tris Plus 凝胶，上样 10-50 μg 的 HeLa 细胞裂解液。将凝胶中的蛋白质转印到 PVDF 膜上。用超纯水漂洗 PVDF 膜，并用 No-Stain 标记工作溶液进行标记。再用超纯水漂洗膜，接着孵育 β-肌动蛋白、GAPDH 和 α-微管蛋白抗体，然后用山羊抗鼠 Alexa Fluor Plus 680 抗体孵育。最后用 iBright FL1500 成像系统对印迹进行成像和分析。No-Stain 试剂在整个浓度范围内的拟合 R^2 值为 0.9990，而 β-肌动蛋白、GAPDH 和 α-微管蛋白的 R^2 值分别为 0.8851、0.9438 和 0.8332。

了解更多信息，请浏览 thermofisher.com/no-stain

检测后的步骤和信号增强

剥离并再次检测蛋白免疫印迹

化学发光检测法和荧光检测法的主要优势之一是能够从印迹上剥离试剂，然后在优化或新的条件下重新检测同一印迹。这个技术有助于优化抗体浓度、信噪比或在同一印迹上进行多种检测实验（表25）。使用化学发光法和荧光法，所有的试剂都可以从膜上去除（剥离）。显色检测则不可以，它是在膜上沉积有色沉淀物。

剥离蛋白免疫印迹膜

膜剥离的关键是改变条件使抗体从靶蛋白上脱离，而靶标蛋白不能从膜上脱离。为了实现这一目的，多种方案已被开发出来，它们包括去垢剂、还原剂、加热和低 pH 值的一些组合。在剥离过程中，不可避免地会有一些蛋白质从膜上流

失，因此通过在温和条件下剥离抗体来最大程度地减少这种损失很重要。每个抗体-靶标对都有独特的特性，因此没有万全的方法可以在保留靶蛋白的同时去除抗体。

验证并再次检测已剥离的印迹

经过任一剥离步骤后需对印迹进行测试，以确保所有的检测试剂都已被去除。为此，需要对膜进行漂洗几次、封闭、与二抗孵育，然后用检测底物重新孵育。如果一抗被剥离，那么二抗就不会与膜结合，也不会有信号产生。如果印迹上仍可见条带，那就必须加强剥离条件。通常情况下，只需增加反应时间或温度就能完成剥离过程。然而，可能有必要改变剥离缓冲液的成分或改变方法。一系列 Thermo Scientific™ Restore™ 剥离液可供选择，使优化过程更加轻松（表 26）。

表 25.重新剥离并重新检测蛋白免疫印迹的优势。

节省样品	当蛋白质样本很稀有或很珍贵时，重新检测可以节省样品，并能用相同或不同的抗体对膜进行重新分析。
节省时间	运行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳，然后将蛋白质转印到膜上是很耗时的。使用同一印迹完成几种不同的检测，可以节省时间。
节省经费	通过重复使用同一印迹，可以节省转印膜、缓冲液和蛋白质样品的费用。
轻松优化检测	超敏化学发光底物的信号强度通常需要优化抗体浓度，以获得最高质量的印迹。通过剥离转印膜并用不同抗体浓度重新检测，可以轻松实现优化。
快速确认异常结果	当免疫印迹的结果不符合预期时，可以使用同一蛋白质样品重新检测，无需回到凝胶电泳步骤中去上样新的样品。
快速修正操作失误	免疫印迹的孵育涉及许多操作步骤，很多环节容易出现错误，比如孵错抗体。通过剥离印迹膜，印迹可以重复使用。

表 26.Restore系列剥离液选择指南

	Restore抗体剥离液	Restore PLUS 加强型抗体剥离液	Restore 荧光抗体剥离液
特点	温和,无气味	强劲而温和, 无气味	针对近红外荧光染料标记的二抗进行了优化
即用型	是	是	是
适用的膜	硝酸纤维素膜和 PVDF 膜	硝酸纤维素膜和 PVDF 膜	与低荧光 PVDF 膜一起使用
孵育时间	在室温下 15–30分钟	在室温下 5-15分钟	在室温下 15分钟
何时选择	一抗容易被抗体剥离液洗脱	去除高亲和力一抗时	去除近红外染料标记抗体时
应用	- 检测不同靶标 - 优化抗体浓度	设计用于难以从蛋白免疫印迹上去除，需要较长的孵育时间或孵育温度高于 22℃ 的抗体	温和又高效的试剂，用于快速去除蛋白免疫印迹上的一抗和近红外染料标记的二抗

Restore 抗体剥离液

Thermo Scientific™ Restore™ 抗体剥离液可安全有效地去除印迹膜上的一抗和二抗，以便对化学发光蛋白免疫印迹重新检测。因此无需上样多块凝胶也可检测不同靶标，助您节省稀有或珍贵的样品（图 48-50）。Restore 剥离缓冲液通常仅需 15 至 30 分钟即可完成剥离，具体取决于一抗的亲合力。

特点：

- **节省时间** — 无需重新跑胶和转印
- **节省珍贵样品** — 在同一张膜上检测不同的靶标
- **高效** — 优化的配方比自制缓冲液更有效
- **温和** — 剥离时不会去除靶蛋白，能有效地重新检测
- **无异味** — 没有硫醇意味着没有刺激性气味

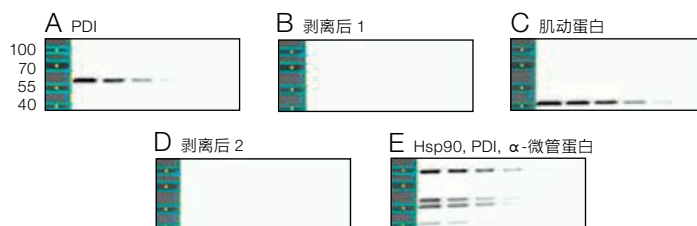


图 48.针对分子量相近的靶标，用 Restore 抗体剥离液剥离并重新检测印迹。在电泳还原样品缓冲液中，将 A431 细胞裂解液稀释到 125 $\mu\text{g/mL}$ ，并进行连续稀释（稀释比 1:2）。样品稀释液（每一份 10 μL ）通过 SDS-PAGE 分离（1,250 ng 至 39 ng 总蛋白），并转印到 0.45 μm 的硝酸纤维素膜上。用 1X Thermo Scientific™ Pierce™ PBS Tween™ 20 缓冲液配制的 5% 脱脂奶粉封闭液封闭转印膜，并用 SuperSignal West Dura 持久性底物进行蛋白免疫印迹分析和成像。(A) 第一个靶蛋白用 0.33 $\mu\text{g/mL}$ Invitrogen™ PDI 单克隆抗体孵育，然后用 6.7 ng/mL Invitrogen™ 山羊抗小鼠 IgG HRP 二抗进行检测并成像。(B) 接下来，印迹在 37°C 下用 Restore 蛋白免疫印迹剥离缓冲液剥离 15 分钟，用 1X Pierce PBS Tween 20 缓冲液漂洗，再用底物孵育，并进行成像以检查剥离效率。(C) 第二个靶蛋白经过膜的再封闭后用 0.5 $\mu\text{g/mL}$ Invitrogen™ Actin 单克隆抗体孵育，然后用 6.7 ng/mL 抗小鼠 IgG HRP 二抗进行检测并成像。(D) 再次剥离印迹，然后 (E) 对多个靶标 (0.2 $\mu\text{g/mL}$ α -微管蛋白、0.33 $\mu\text{g/mL}$ PDI 和 0.14 $\mu\text{g/mL}$ hsp90) 进行探测，并如上所述进行成像。

观看操作视频：



A 蛋白免疫印迹分析



B 信号密度测定

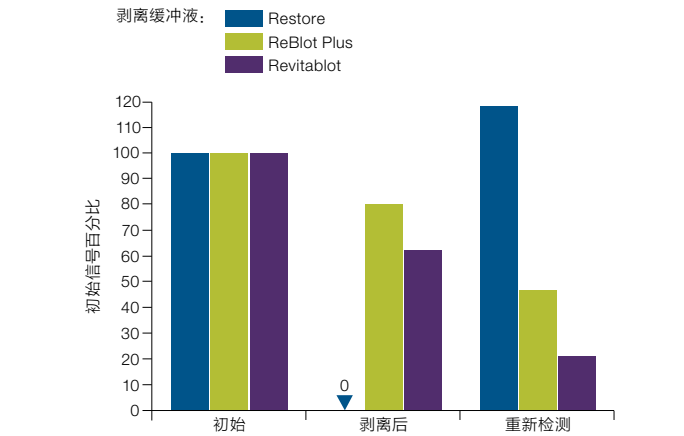


图 49. 三种剥离缓冲液在硝酸纤维素膜上的蛋白免疫印迹剥离和重新检测性能。用电泳还原样品缓冲液将 HeLa 细胞裂解液稀释到 1 mg/mL，并进行连续稀释（稀释比 1:1）。三组样品稀释液（每一份 10 μ L，10 μ g 至 0.31 μ g 总蛋白）通过 SDS-PAGE 分离，并转印到 0.45 μ m 硝酸纤维素膜上。(A) 在 1X Pierce TBS Tween 20 缓冲液中，用 5% 脱脂奶粉封闭转印膜，并用 SuperSignal West Dura 持久性底物蛋白免疫印迹分析和成像。用 0.5 μ g/mL Invitrogen™ Hsp90 多克隆抗体孵育转印膜，然后用 5.7 ng/mL Invitrogen™ 山羊抗兔 IgG HRP 二抗进行探测并成像。第一次检测后，将三组印迹切成三条，根据制造商的说明，在 Restore 蛋白免疫印迹剥离缓冲液（37℃ 下 15 分钟）、ReBlot Plus 剥离溶液（MilliporeSigma；室温下 15 分钟）或 Revitablot™ 蛋白免疫印迹剥离缓冲液（Rockland Immunochemicals Inc.；室温下 15 分钟）中剥离每个印迹。剥离结束后，用 1X PBS Tween 20 缓冲液漂洗膜条，用底物孵育并进行成像。重新封闭膜条，并按上述方法重复蛋白免疫印迹。(B) 光密度测定显示，Restore Western Blot 剥离缓冲液能完全去除信号，并在初次和二次蛋白免疫印迹检测之间保持几乎相同的水平。

A 蛋白免疫印迹分析



B 信号密度测定

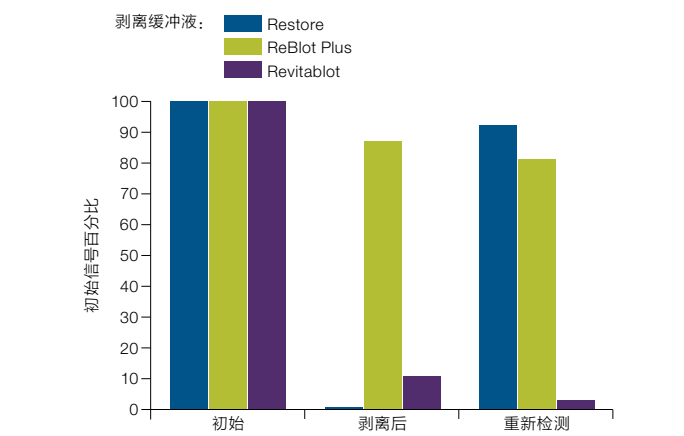


图 50. 三种剥离缓冲液在 PVDF 膜上的蛋白免疫印迹剥离和重新检测性能。用电泳还原样品缓冲液中，将 HeLa 细胞裂解液稀释到 1 mg/mL，并进行连续稀释（稀释比 1:1）。三组样品稀释液（每一份 10 μ L，10 μ g 至 0.31 μ g 总蛋白）通过 SDS-PAGE 分离，并转印到 0.45 μ m 的 PVDF 膜上。(A) 在 1X Pierce TBS Tween 20 缓冲液中，用 5% 脱脂奶粉封闭转印膜，并用 SuperSignal West Dura 持久性底物进行蛋白免疫印迹分析并成像。用 0.2 μ g/mL Invitrogen™ Cyclophilin B 多克隆抗体孵育转印膜，然后用 5.7 ng/mL 山羊抗兔 IgG HRP 二抗进行探测并成像。第一次检测后，将三组印迹切成三条，并根据制造商的说明，在 Restore 蛋白免疫印迹剥离缓冲液（37℃ 下 15 分钟）、ReBlot Plus 剥离溶液（MilliporeSigma；室温下 15 分钟）或 Revitablot 蛋白免疫印迹剥离缓冲液（Rockland Immunochemicals Inc.；室温下 15 分钟）中剥离每个印迹。剥离结束后，用 1X PBS Tween 20 缓冲液漂洗膜条，用底物孵育并进行成像。重新封闭膜条，并按上述方法重复蛋白免疫印迹。(B) 光密度测定显示，Restore Western Blot 剥离缓冲液能完全去除信号，并在初次和二次蛋白免疫印迹检测之间保持几乎相同的水平。

Restore PLUS 加强型抗体剥离液

当研究人员需要一款强劲而温和的蛋白免疫印迹剥离缓冲液时, 基础款 Restore Western Blot 剥离缓冲液一直是首选的缓冲液。然而, 一些抗体仍然难以从化学发光蛋白免疫印迹上去除, 需要更长的孵育时间或孵育温度高于22°C。而 Thermo Scientific™ Restore™ PLUS抗体剥离缓冲液采用温和配方, 在保持室温孵育条件的同时又能减少孵育时间。本产品能快速高效地去除高亲和力抗体, 而不会对转印蛋白造成影响, 从而实现靶标蛋白的多次检测。

特点:

- **即用型, 操作简单** — 无需稀释, 无异味, 室温储存
- **兼容性** — 可在干燥或湿润的NC膜和 PVDF 膜上使用; 几乎适用于所有封闭液、酶偶联物和化学发光底物
- **高性价比** — 节省宝贵的时间和珍贵的样品; 首次就能有效地剥离印迹
- **强劲而温和** — 有效保护蛋白不被损伤; 同一印迹膜最多可剥离 5 次

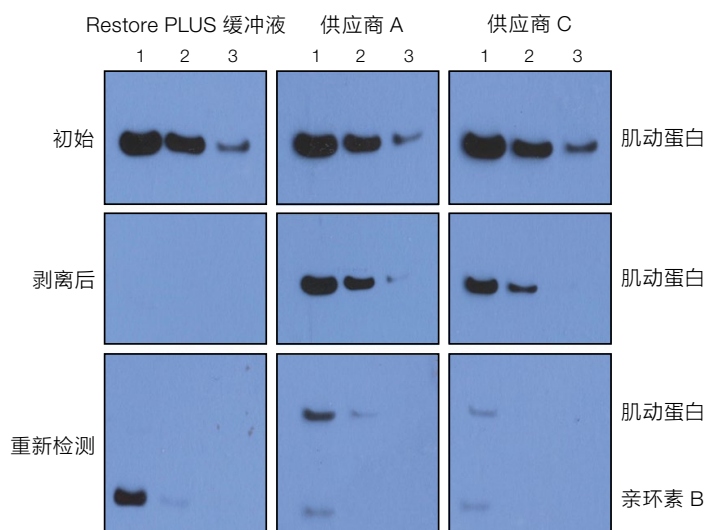


图 51. Restore PLUS 蛋白免疫印迹剥离缓冲液对于用不同抗体进行重新检测最为有效。对 HeLa 细胞裂解液进行肌动蛋白检测, 并用 Pierce ECL 底物 (“初始”) 检测。然后用 Restore PLUS 蛋白免疫印迹剥离缓冲液或其他供应商的剥离缓冲液来进行印迹剥离。然后重新封闭印迹、重新检测亲环素 B, 并用 Pierce ECL 底物检测。

Restore 荧光抗体剥离液

Thermo Scientific™ Restore™ 荧光抗体剥离液是一种温和而高效的试剂, 可用于快速去除蛋白免疫印迹上的一抗和近红外染料标记的二抗, 从而再次检测不同的靶标 (图52)。Restore 荧光蛋白免疫印迹剥离缓冲液仅适用于低荧光 PVDF 膜。

特点:

- **快速** — 室温下仅需 15 分钟即可剥离印迹
- **节省时间** — 无需运行新的凝胶和制备新的印迹
- **节省样品** — 可在同一 PVDF 膜上重新检测多个靶标
- **高效** — 首次就能有效地剥离印迹

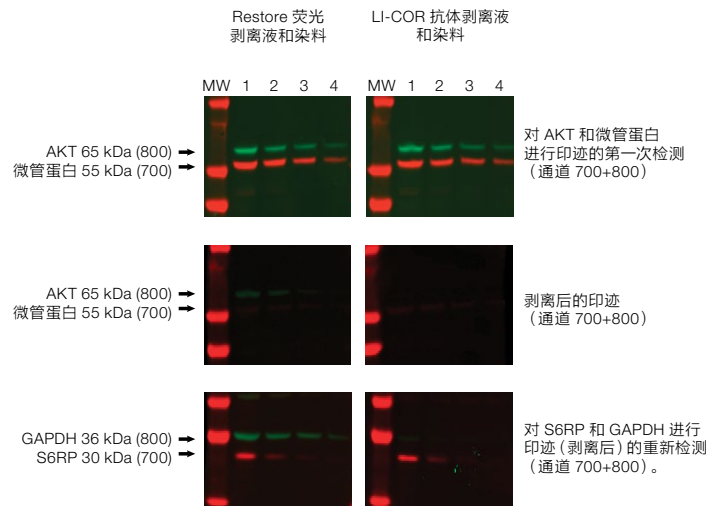


图 52. 对 PVDF 膜上的一抗和近红外染料标记的二抗进行有效的剥离和重新检测。将 A549 全细胞裂解液 (泳道 1、2、3 和 4 分别有 20 µg、10 µg、5 µg 和 2.5 µg 蛋白质) 转印到 PVDF 膜上。**第一组印迹。**用 AKT 和微管蛋白抗体探测印迹, 并用 Invitrogen™ DyLight™ 680 山羊抗小鼠 IgG 和 DyLight™ 800 山羊抗兔 IgG, 或 IRDye™ 680 山羊抗小鼠 IgG 和 IRDye™ 800CW 山羊抗兔 IgG (LI-COR) 二抗孵育。使用能够采集荧光通道 700 和通道 800 的成像仪。**第二组印迹。**在室温下, 使用 Restore 荧光抗体剥离液或 NewBlot™ PVDF 5X 剥离液 (LI-COR) 剥离印迹 15 分钟。用 TBS 漂洗印迹 5 分钟, 重新成像。**第三组印迹。**用兔抗 S6 核糖体蛋白 (S6RP) 和小鼠抗 GAPDH 抗体孵育剥离后的膜。使用 DyLight 800 山羊抗兔 IgG 和 DyLight 680 山羊抗兔 IgG, 或 IRDye 800CW 山羊抗兔 IgG 和 IRDye 680 山羊抗兔 IgG 孵育, 并再次成像。

观看操作视频, 请点击[此处](#)

了解更多信息, 请浏览

thermofisher.com/westernbuffers

信号增强

提高蛋白免疫印迹灵敏度的方法很多。有些方法非常简单，如更换检测底物或封闭缓冲液，而有些方法则更耗时，如优化抗体稀释度。

通过处理转印后的膜也可以提高信号强度。其中一些方法可以提高灵敏度，或降低背景，或两者兼顾；另一些方法在保持信号强度的同时，节省了下游所需的抗体量。

SuperSignal 信号增强剂

提高信噪比和条带显影，以提高灵敏度

Thermo Scientific™ SuperSignal™ 蛋白免疫印迹增强剂包含膜处理试剂和一抗稀释剂，与不使用该试剂进行的检测相比，信号强度和灵敏度都提高了 3-10 倍。

当蛋白质由于丰度低或免疫反应性不良而难以检测时，使用 SuperSignal 蛋白免疫印迹增强剂有助于大大降低背景并增强对低丰度蛋白的检测。

它最大限度地减少了印迹曝光过度的常规问题，从而减少了为获得“完美印迹”而进行多次曝光试验的需要。该试剂盒适用于 PVDF 膜和硝酸纤维素膜，与荧光检测、显色检测和化学发光检测兼容 (图 53-55)。



特点:

- **提高灵敏度** — 信号强度和灵敏度都提高了 3-10 倍
- **提高特异性** — 提高质量不佳和亲和力低抗体的信噪比
- **减少背景** — 有助于提高清晰度，使蛋白免疫印迹更清晰
- **膜兼容性** — 用 PVDF 膜和硝酸纤维素膜都能有效增强信号
- **底物兼容性** — 经过验证可用于显色法、化学发光法和荧光检测法

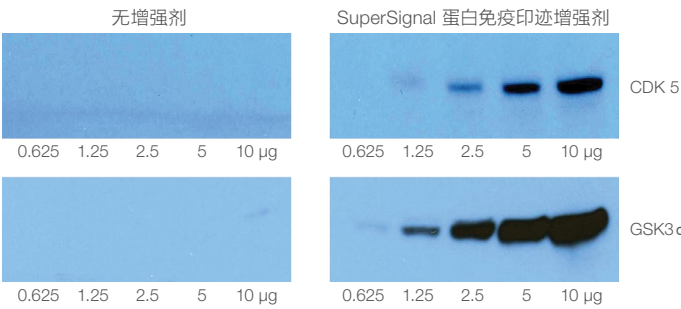


图 53.SuperSignal 信号增强剂提高了化学发光底物的检测下限。细胞裂解液经电泳分离后，转移到硝酸纤维素膜上，并使用传统方法（左）或使用 SuperSignal 蛋白免疫印迹增强剂方案（右）进行蛋白免疫印迹法。

	上组图	下组图
封闭缓冲液	5% 牛奶 Tris 缓冲盐水 (含有 0.05% Tween™ 20 表面活性剂)	Thermo Scientific™ Blocker™ BLOTTO TBS
一抗	1 µg/mL 小鼠抗 CDK5	1 µg/mL 兔抗 GSK3α
二抗	0.1 µg/mL HRP 标记山羊抗小鼠 IgG	0.1 µg/mL HRP 标记山羊抗兔 IgG
底物	Thermo Scientific™ Pierce™ ECL 底物	Thermo Scientific™ SuperSignal™ West Pico PLUS 底物
检测	X 光胶片, 曝光时间 1分钟	X 光胶片, 曝光时间 10分钟

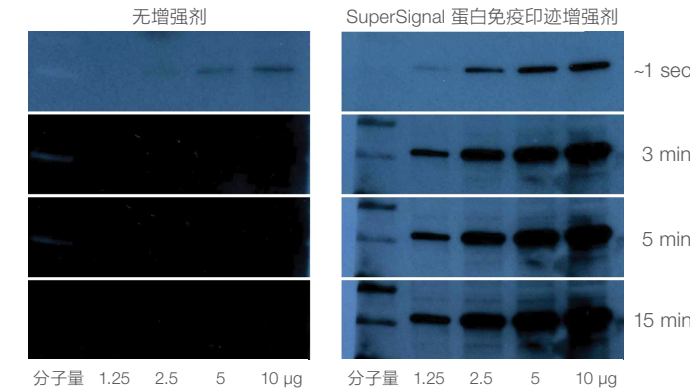


图 54. SuperSignal 蛋白免疫印迹增强剂可降低背景，适用于检测低丰度靶标。将 K562 细胞裂解液上样到 Tris-甘氨酸 SDS-PAGE 凝胶中，1.25 µg、2.5 µg、5 µg 和 10 µg/泳道。电泳后，蛋白质被转印到硝酸纤维素膜上。

所有图	
封闭缓冲液	Thermo Scientific™ SuperBlock™ (TBS) 封闭缓冲液
一抗	1 µg/mL 小鼠抗 ERK1 一抗
二抗	0.08 µg/mL HRP 标记山羊抗小鼠 IgG
底物	Pierce ECL 底物
检测	X 光胶片

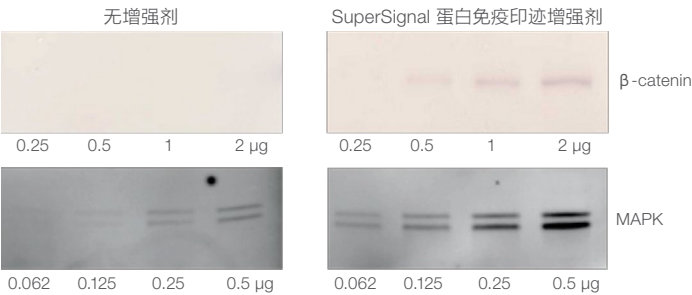


图 55. SuperSignal 蛋白免疫印迹增强剂与显色法和荧光检测法兼容。HeLa 细胞裂解液经电泳分离，转印到硝酸纤维素膜（上图）或 Thermo Scientific™ 低荧光 PVDF 膜（下图），并使用传统方法（左）或使用 SuperSignal 蛋白免疫印迹增强剂方案（右）进行蛋白免疫印迹法。

	上组图	下组图
封闭缓冲液	SuperBlock 封闭液	Blocker BLOTTO TBS 封闭液
一抗	0.2 µg/mL 兔抗 β-catenin	1 µg/mL 兔抗 MAP 激酶
二抗	0.04 µg/mL AP 标记山羊抗兔 IgG	0.1 µg/mL Invitrogen™ DyLight™ 488 标记山羊抗兔 IgG
底物	Thermo Scientific™ Pierce™ 1-Step NBT/BCIP 底物溶液	–
检测	直接观察	Typhoon™ 9410 成像仪

推荐产品

推荐 SuperSignal West Pico PLUS 化学发光底物与 SuperSignal 蛋白免疫印迹增强剂配套使用。对于显色法，我们推荐 Pierce 1-Step NBT/BCIP 底物溶液。

推荐使用 Invitrogen™ 山羊抗小鼠或山羊抗兔 HRP 标记二抗进行蛋白免疫印迹检测。

了解更多信息，请浏览 thermofisher.com/supersignalenhancer

特殊检测试剂

Clean-Blot IP 检测试剂

当进行免疫沉淀 (IP) 时, 目标蛋白信号会受到IgG重链和轻链 (~50 kDa和25 kDa) 的影响。IgG对免疫印迹结果的干扰是由于IP实验同时释放了抗体和抗原, 并使用了诸如组织提取物这样含IgG的样品类型。所以使用传统二抗时就会检测到印迹上的变性IgG碎片。

Thermo Scientific™ Clean-Blot™ IP检测试剂是一种HRP标记物, 适用于IP后的印迹检测, 可避免变性IP抗体片段的干扰。该试剂仅结合功能性完整IgG, 将来自抗体重链和轻链IgG片段的干扰降至最低, 从而准确、特异性地检测目标抗原。

特点:

- **通用** — 结合并检测通常用于蛋白免疫印迹法一抗的多数 IgG 亚类和同种型 (表 27)
- **兼容** — 适用于使用蛋白A、蛋白G或抗IgG琼脂糖与任意封闭液的IP体系
- **易于使用** — 无需改变蛋白免疫印迹方案; 只需用 Clean-Blot IP 检测试剂取代传统的HRP二抗 (图 56)
- **避免干扰检测** — 免疫沉淀检测的蛋白免疫印迹结果清晰, 不会受到变性 IgG 条带的明显干扰 (图 57)

SuperSignal West HisProbe 试剂盒

Thermo Scientific™ SuperSignal™ West HisProbe™ 试剂盒属于化学发光系统, HisProbe-HRP 偶联物用来克服抗组氨酸抗体和其他检测策略的缺陷。HisProbe-HRP 偶联物对多组氨酸标签特异性更高, 背景值更低。与抗 His 抗体不同, HisProbe-HRP 偶联物可以单独识别多组氨酸标签。

特点:

- **快速** — His 标记检测是通过一步法探针孵育实现的, 无需运行冗长的一抗/二抗反应的两步方案
- **特异性高** — HisProbe-HRP 可以单独识别 His 标签
- **空间位阻少** — HisProbe-HRP 偶联物比抗体小, 可以用于检测带His 标签的融合蛋白, 而使用一些抗 His 标签的抗体时往往检测不到这些融合蛋白

表 27.用 Clean-Blot IP 检测试剂可识别的一抗类型。

物种	同型
牛	IgG2
山羊	IgG2
人	IgG1、IgG2、IgG4
小鼠	IgG2a、IgG2b、IgG3
大鼠	IgG2c
绵羊	IgG2

* Clean-Blot IP 检测试剂可识别多克隆抗体和单克隆抗体。要确定特定抗体的兼容性, 可进行斑点印迹分析。

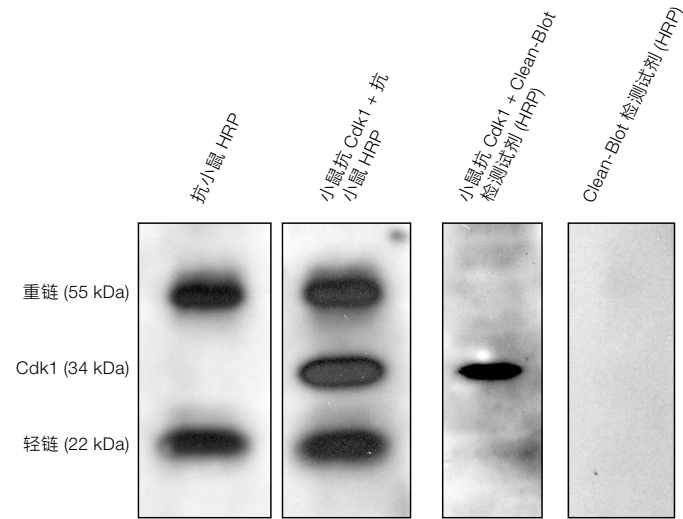


图 56.用 Clean-Blot 检测试剂 (HRP) 检测靶蛋白。凝胶电泳分离小鼠肝脏提取物 (50 µg) 总蛋白, 转印到 PVDF 膜上, 并用 5% 牛奶 TBST 进行封闭。用小鼠单克隆抗 Cdk1 (LabVision, 0.2 µg/mL) 和山羊抗小鼠 HRP (0.16 µg/mL) 或 Clean-Blot 检测试剂 (HRP) (0.2 µg/mL)检测转印膜。SuperSignal West Pico 底物用于检测 Cdk1 蛋白。

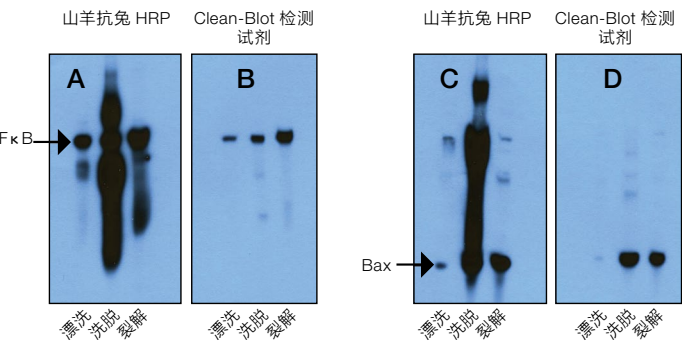
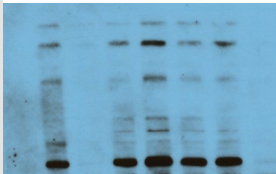
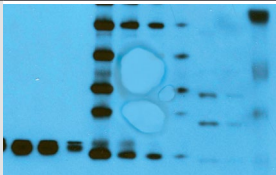
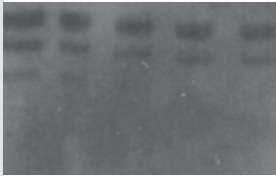


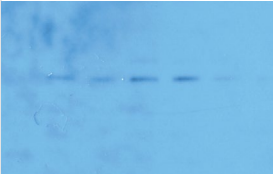
图 57.用 Clean-Blot 检测试剂 (HRP) 检测靶蛋白。为了检测靶蛋白, 我们进行了 IP 和 蛋白免疫印迹实验。使用蛋白质 A/G 琼脂糖树脂和 (A 和 B) 兔抗 NF-κB 和 (C 和 D) 兔抗 Bax, 从 A549 裂解液中免疫沉淀 NF-κB 和 Bax。 (A 和 C) 用山羊抗兔 HRP 进行检测, 没有信号。 (B 和 D) 用 Clean-Blot 检测试剂 (HRP) 进行检测, 能检测到信号。

常见问题排查指南

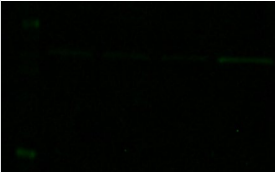
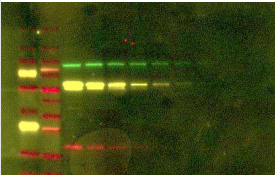
化学发光蛋白免疫印迹

观察结果		原因	解决方案	
非特异或弥散条带		抗体浓度过高	降低抗体浓度，尤其是一抗浓度。	
		电泳时上样的蛋白质过多	减少胶上的上样量。	
		化学发光底物的信号太强	缩短印迹曝光的时间。	
			降低底物的浓度。	
			缩短底物孵育的时间。	
出现部分显影区或空白区		转印不完全	孵育后要完全去除底物。	
			降低抗体的浓度，尤其是 HRP/AP 标记二抗。	
			在转印过程中，使用凝胶滚筒滚压转印膜组，确保凝胶和膜充分接触。	
背景过高		与封闭缓冲液不兼容	根据制造商的说明，润湿和活化膜。	
			处理膜时，一定要戴上干净的手套或使用镊子。	
			抗体浓度过高	降低一抗和/或二抗的浓度。
			对非特异性位点的封闭不充分	牛奶不能用于亲和素-生物素检测系统。牛奶含有生物素，这会导致高背景。
				当检测磷酸化蛋白时，避免使用磷酸盐的缓冲液（例如，PBS）和含磷酸化蛋白的封闭剂（例如，牛奶或酪蛋白）。应该用含BSA的Tris 缓冲液进行封闭。
		在封闭缓冲液中测试交叉反应，方法是封闭一片干净的膜，再与抗体一起孵育，然后用底物进行检测。		
		当使用碱性磷酸酶 (AP) 偶联物时，应选择 Tris-缓冲盐水 (TBS) 类的封闭缓冲液，因为磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 会干扰 AP 活性。		
		尝试其他封闭缓冲液。使用我们的封闭缓冲液选择指南，请浏览 thermofisher.com/blockingbuffers ，为您的实验找到最合适的封闭缓冲液。		
		对非特异性位点的封闭不充分	增加封闭缓冲液中蛋白质的浓度。	
			优化封闭时间和/或温度。在室温 (RT) 下封闭至少 1 h 或在 4℃ 下封闭过夜。	
			在封闭缓冲液中加入 Tween 20 去垢剂可以帮助减少背景。然而，过多的去垢剂会干扰抗体的结合。终浓度为 0.05%吐温通常效果理想。选择含有 0.05% Tween 20 去垢剂的封闭缓冲液更方便，例如 Thermo Scientific™ StartingBlock™ T20 封闭缓冲液（货号37543 或 37539）或 SuperBlock™ T20 封闭缓冲液（货号 37536 或 37516）。	
			在含有 0.05% Tween 20 去垢剂的封闭缓冲液中制备抗体稀释液。	
			使用 Thermo Scientific™ SuperSignal™ 蛋白免疫印迹增强剂（货号 46640）能降低背景并提高对低丰度和弱免疫反应靶蛋白的检测。	
		漂洗不充分	增加漂洗次数和/或缓冲液用量。	
			在漂洗缓冲液中加入 Tween 20 去垢剂，至最终浓度为 0.05%。如果 Tween 20 去垢剂的浓度过高，它会将蛋白质从膜上剥离。	
膜处理不当	根据制造商的说明，润湿和活化膜。			
	处理膜时，一定要戴上干净的手套或使用镊子。			
	在任何时候都要用液体浸泡膜，防止变干。			
	在所有孵育过程中都使用振荡器。			
仪器或材料的污染	小心处理膜，因为膜损坏会导致非特异性结合。			
	制备新鲜的缓冲液并在使用前过滤。			
化学发光底物的信号太强	使用清洁无污染的电泳仪器、转印仪器和孵育盒。			
	缩短印迹曝光的时间。			
	降低底物的浓度。			
	缩短底物的孵育时间。			
化学发光底物的信号太强	孵育结束后要完全去除底物。			
	降低抗体的浓度，尤其是 HRP/AP 标记二抗。			

化学发光蛋白免疫印迹 (续)

观察结果	原因	解决方案
信号微弱或无信号	转印不完全或低效	转印后, 用总蛋白染料对凝胶进行染色, 以确定转印率, 例如 Ponceau S 或 Thermo Scientific™ Pierce™ 可逆蛋白染色试剂盒 (货号 24585 或 24580)
		在转印过程中, 使用凝胶滚筒滚压转印膜组, 确保凝胶和膜充分接触。
		确保将膜组放置的位置正确, 使蛋白质能够迁移到膜上。
		根据制造商的说明, 润湿并活化膜。
		使用阳性对照, 例如预染分子量 Marker, 可以快速评估是否发生了转印。
		使用与蛋白免疫印迹成像底物兼容的分子量 Marker, 例如 Invitrogen™ iBright™ 预染蛋白分子量标准 (货号 LC5615) 或 Invitrogen™ MagicMark™ XP Western 蛋白标准品 (货号 LC5602), 作为阳性对照。
		增加转印时间和/或电压。
		确保样品制备条件不会破坏样品的抗原性。(有些蛋白质不能在还原性环境下运行)。
	与膜结合不充分	对于低分子量 (MW) 靶标, 在转印缓冲液中加入 20% 甲醇, 可以帮助结合并防止蛋白质穿过膜。
		缩短转印时间。低分子量蛋白质可能穿过膜。
		对于高分子量靶标, 在转印缓冲液中加入 0.01-0.05% SDS, 可以帮助提高转印效率。
		改变膜类型 (硝酸纤维素膜与 PVDF 膜)。
		换成小孔径的膜。
		抗体浓度过低
		增加抗体浓度。抗体可能对靶蛋白的亲合力差。
		抗体可能已经失去活性。进行斑点印迹以确定活性。
		靶蛋白不足
		增加蛋白上样量。
		蛋白质被封闭缓冲液封闭
		降低封闭缓冲液中蛋白质的浓度。
		尝试其他封闭缓冲液。使用我们的封闭缓冲液选择指南, 请浏览 thermofisher.com/blockingbuffers , 为您的实验找到最合适的封闭缓冲液。
		缓冲液含有叠氮化钠
		叠氮化钠会抑制 HRP。不要将其与 HRP 标记抗体一起使用。
	化学发光底物的信号太弱	增加膜与底物的孵育时间。
		增加胶片曝光时间。
		确保底物没有过期。
	剥离的膜重新检测	当蛋白质浓度很低时, 使用 Thermo Scientific™ SuperSignal™ West Atto 超敏底物 (货号 A38555) 来放大蛋白免疫印迹信号。
		避免反复剥离同一张膜。
		缩短剥离缓冲液的孵育时间, 防止靶蛋白剥离。
	膜上的蛋白质被消化	封闭缓冲液可能含有具有蛋白水解活性的底物 (例如, 明胶); 将封闭缓冲液改为纯化的封闭蛋白 (例如, 酪蛋白)。
	印迹储存时间过长导致蛋白质降解	制备新的印迹。

荧光蛋白免疫印迹

观察结果		原因	解决方案
非特异或弥散条带		抗体对目标靶标特异性差	更换一抗。 仅使用经验证*的一抗进行蛋白免疫印迹法。
		样品完整性差	由于过热或蛋白酶活性引起样品降解，导致靶标降解和抗体对靶标的识别性低。例如，不要将样品在 SDS 样品缓冲液中煮沸，而是在 70℃ 下加热 10分钟，以避免蛋白质分解。
		多重检测中的抗体交叉反应性	选择在远缘宿主物种来源的一抗。 使用高度交叉吸附的二抗。 减少二抗的用量，保持在最佳性能范围内。
		多重检测时，出现荧光渗漏（出现意外的条带）	避免选择光谱上相近的偶联物，尤其是当信号非常强时。 确保荧光染料与成像仪兼容。 如果可以，使用成像仪上的自动曝光功能来确定每个通道的最佳曝光时间。
信号微弱或无信号		一抗的量不足	增加一抗浓度。 确保一抗效价良好，并且对靶蛋白具有特异性。 对于细胞或组织裂解液中的低丰度靶标，可以增加一抗的量或蛋白上样量。 延长孵育时间，4℃ 下过夜，或室温下 3-6 小时。 尝试使用一抗增强剂。
		抗体失活	确保抗体储存得当。 检查抗体的有效期。 避免重复使用预稀释的抗体。
		成像曝光时间太短	增加曝光时间。 如果可以，使用成像仪上的自动曝光功能来确定最佳曝光时间。
		仪器设置不正确	为荧光基团选择合适的激发和发射范围。
		去垢剂的使用	去垢剂过多或去垢剂本身会导致信号消失，所以应减少或不用去垢剂。
		封闭缓冲液封闭靶蛋白	一些封闭溶液会封闭印迹，降低抗体对靶蛋白的识别，尤其是当封闭步骤超过 1 h 时。 在漂洗缓冲液中稀释一抗。 更换封闭缓冲液。
		上样量	裂解液过多会使特定靶标过度拥挤，降低抗体的敏感度。 裂解液太少可能会检查不到目标靶标。 对裂解液或样品进行连续稀释，以确定最佳的蛋白质上样量。
		蛋白质转印效果差，或转印后蛋白质丢失	检查转印条件，以确保蛋白质转印成功。 在检测新的蛋白质时，可能需要重新优化。
出现背景问题 （背景高、不均匀或有斑点）		背景高：膜被污染	使用干净的镊子和干净的孵育盒或孵育皿来处理膜。 确定最适合您应用的封闭缓冲液，因为一抗在不同的封闭缓冲液中会有不同的 反应。封闭缓冲剂（例如，正常动物血清或牛奶）可能导致交叉反应。使用我 们的封闭缓冲液选择指南，请浏览 thermofisher.com/blockingbuffers，为 您的实验找到最合适的封闭缓冲液。
		伪影：上样的蛋白 Marker 或蛋白分子量标 准过多	减少上样 Marker。
		漂洗液或稀释液并非最佳	使用含有 0.1-0.2% Tween 20 去垢剂的漂洗缓冲液。
			制备含有 0.05% Tween 20 去垢剂的二抗稀释液。
			增加漂洗步骤的次数或时长。
		背景高：二抗过多	根据所使用的染料优化二抗的稀释度，遵循供应商推荐的稀释度并进行相应 调整。
		背景有斑点或不均匀；膜变干	确保在所有孵育步骤中印迹被浸泡其中。 确保在每个孵育步骤中振荡均匀一致。
		膜选择错误	膜的性质会影响背景；例如，PVDF 膜会自发荧光，导致高背景，所以要使用 低荧光 PVDF 膜。
		膜上有斑点和指纹	使用干净的镊子取膜，并避免直接接触膜；工具上的微粒和污染物可能会导致自发荧光。 使用干净的孵育盒或孵育皿；用甲醇漂洗后再用水漂洗，将有助于清洗此前残留的干染料。
			如果使用湿式转印法，避免斑点出现，要清洁转印仪器和有灰尘的耗材。 在采集图像前，用乙醇清洁成像仪表面，以去除灰尘、绒毛和残留物。

74 “验证”（或任何类似说法）一词的使用仅指研究用抗体，这些抗体经过功能测试以确保该抗体可用于所述研究技术。它并不能确保产品用于临床用途或诊断用途。

附录

快速参考方案和缓冲液配方

- 化学发光蛋白免疫印迹的实验方案
- 荧光蛋白免疫印迹的实验方案
- 蛋白质电泳和蛋白免疫印迹缓冲液配方
- Power Blotter 和 Power Blotter XL 转印系统
- iBlot 2 干式转印系统
- iBind 蛋白免疫印迹仪器
- iBind Flex 蛋白免疫印迹仪器
- iBright CL1500 和 FL1500 成像系统

如果您发现这些方案不适合您的靶标蛋白, 请尝试我们的 BlotBuilder 产品选择工具, 为您量身定制一套蛋白免疫印迹产品方案。

thermofisher.com/blotbuilder



订购信息

转印前

产品	规格	货号
转印膜		
即用型转印三明治		
Power Blotter 预组装转印膜组, 硝酸纤维素膜, 小型	10 组	PB3210
Power Blotter 预组装转印膜组, 硝酸纤维素膜, 小型	40 组	PB3240
Power Blotter 预组装转印膜组, PVDF 膜, 小型	10 组	PB5210
Power Blotter 预组装转印膜组, PVDF 膜, 小型	40 组	PB5240
Power Blotter 预组装转印膜组, 硝酸纤维素膜, 常规型	10 组	PB3310
Power Blotter 预组装转印膜组, 硝酸纤维素膜, 常规型	40 组	PB3340
Power Blotter 预组装转印膜组, PVDF 膜, 常规型	10 组	PB5310
Power Blotter 预组装转印膜组, PVDF 膜, 常规型	40 组	PB5340
Power Blotter 预剪裁膜和滤纸, 硝酸纤维素膜, 小型	20 组	PB7220
Power Blotter 预剪裁膜和滤纸, PVDF 膜, 小型	20 组	PB9220
Power Blotter 预剪裁膜和滤纸, 硝酸纤维素膜, 常规型	20 组	PB7320
Power Blotter Pre-cut 预剪裁膜和滤纸, PVDF 膜, 常规型	20 组	PB9320
iBlot 2 转印膜组, 硝酸纤维素膜, 小型	10 组	IB23002
iBlot 2 转印膜组, 硝酸纤维素膜, 常规型	10 组	IB23001
iBlot 2 转印膜组, PVDF 膜, 小型	10 组	IB24002
iBlot 2 转印膜组, PVDF 膜, 常规型	10 组	IB24001
预剪裁硝酸纤维素膜		
SureLock Tandem 中型预剪裁膜和滤纸, 0.2 µm, 硝酸纤维素膜, 8.6 x 14 cm	20/包	STM2007
SureLock Tandem 中型预剪裁膜和滤纸, 0.45 µm, 硝酸纤维素膜, 8.6 x 14 cm	20/包	STM2008
预剪裁 PVDF 膜		
Invitrolon PVDF 膜/滤纸三明治, 0.45 µm 孔径, 8.3 x 7.3 cm (用于小型凝胶)	20/包	LC2005
Invitrolon PVDF 膜/滤纸三明治, 0.45 µm 孔径, 8.5 x 13.5 cm	16/包	LC2007
SureLock Tandem 中型预剪裁膜和滤纸, 0.45 µm, PVDF, 8.6 x 14 cm	20/包	STM2006
低荧光 PVDF 转印膜, 0.2 µm, 7 x 8.4 cm	10 片	22860
PVDF 膜/滤纸三明治, 0.2 µm 孔径	20/包	LC2002
PVDF 转印膜, 0.45 µm, 10 x 10 cm	10 片	88585
Tropifluor PVDF 膜, 0.45 µm 孔径, 15 x 15 cm	5 片	T2234
PVDF 膜 (卷状)		
PVDF 转印膜, 0.2 µm, 26.5 cm x 3.75 m	1 卷	88520
PVDF 转印膜, 0.45 µm, 26.5 cm x 3.75 m	1 卷	88518
滤纸 (用于转印)		
蛋白免疫印迹滤纸, 8 x 10.5 cm	100 片	88600
蛋白免疫印迹滤纸, 7 x 8.4 cm	100 片	84783
蛋白免疫印迹滤纸, 8 x 13.5 cm	100 片	84784
蛋白免疫印迹滤纸, 特厚, 7 x 8.4 cm	50 片	88605
蛋白免疫印迹滤纸, 特厚, 8.5 x 9 cm	50 片	88610
蛋白免疫印迹滤纸, 特厚, 8 x 13.5 cm	50 片	88615
蛋白免疫印迹滤纸, 特厚, 20 x 20 cm	50 片	88620
转印滤纸, 2.5 mm 厚, 8.6 x 13.5 cm	50 张	LC2008
转印滤纸, 2.5 mm 厚, 7.5 x 8.4 cm	50 片	LC2010

转印前

产品	规格	货号
蛋白分子量标准		
PageRuler Plus 预染蛋白分子量标准, 10-250 kDa	2 x 250 µL	26619
PageRuler Plus 预染蛋白分子量标准, 10-250 kDa	10 x 250 µL	26620
PageRuler 预染蛋白分子量标准, 10-180 kDa	2 x 250 µL	26616
PageRuler 预染蛋白分子量标准, 10-180 kDa	10 x 250 µL	26617
iBright 预染蛋白分子量标准, 11-250 kDa	2 x 250 µL	LC5615
HiMark 预染蛋白分子量标准, 30-460 kDa	250 µL	LC5699
Spectra 多色宽范围蛋白分子量标准, 10-260 kDa	10 x 250 µL	26623
Spectra 多色宽范围蛋白分子量标准, 10-260 kDa	2 x 250 µL	26634
Spectra 多色高范围蛋白分子量标准, 40-300 kDa	2 x 250 µL	26625
PageRuler 非预染蛋白分子量标准, 10-200 kDa	2 x 250 µL	26614
PageRuler 非预染低分子量范围蛋白分子量标准, 3.4-100 kDa	2 x 250 µL	26632
MagicMark XP Western 蛋白标准品, 20-220 kDa	250 µL	LC5602
BenchMark His-标记蛋白标准品, 10-160 kDa	125 µL	LC5606

转印

产品	规格	货号
转印缓冲液		
Bolt 转印缓冲液 (20X)	125 mL	BT0006
Bolt 转印缓冲液 (20X)	1 L	BT00061
BupH Tris-甘氨酸缓冲液干粉包	40 包	28380
Novex Tris-甘氨酸转印缓冲液 (25X)	500 mL	LC3675
NuPAGE 转印缓冲液 (20X)	125 mL	NP0006
NuPAGE 转印缓冲液 (20X)	1 L	NP0006-1
Power Blotter 1-Step 转印缓冲液 (5X)	1 L	PB7300
Power Blotter 1-Step 转印缓冲液 (5X)	250 mL	PB7100
Pierce 10X Tris-甘氨酸缓冲液	1 L	28363
Pierce 10X 蛋白免疫印迹转印缓冲液 (无甲醇)	5 L	35040
湿式转印系统		
小型印迹模块	1 把	B1000
小型凝胶电泳槽和印迹模块套装	1 把	NW2000
SureLock Tandem 中型印迹模块	1 块	STM2001
SureLock Tandem 转印盘	1 盘	STM3001
XCell II Blot 模块	1 把	EI9051
XCell SureLock 小型槽和 XCell II 印迹模块	1 把	EI0002
PowerEase Touch 350W 电源 (230 VAC)	1 把	PS0353
PowerEase Touch 120W 电源 (230 VAC)	1 把	PS0123
半干式转印系统		
Power Blotter 电源基座	1 个	PB0010
Power Blotter 卡匣	1 台	PB0002
Power Blotter 卡匣 XL	1 台	PB0003
Power Blotter 系统	1 套	PB0012
Power Blotter XL 系统	1 套	PB0013
Power Blotter 迎新套装	1 套	PB0112
Power Blotter XL 迎新套装	1 套	PB0113
干式转印系统		
iBlot 2 凝胶转印装置	1 台	IB21001

转印后

产品	规格	货号
可逆蛋白染色试剂盒		
Pierce 可逆蛋白染色试剂盒 (用于硝酸纤维素膜)	1.5 L	24580
Pierce 可逆蛋白染色试剂盒 (用于 PVDF 膜)	1.75 L	24585
信号增强		
SuperSignal 信号增强剂	500 mL	46640
SuperSignal 信号增强剂	50 mL	46641

封闭、漂洗、检测

产品	规格	货号
自动化孵育系统		
Bandmate 自动化蛋白免疫印迹处理系统	1 套	BW1000
iBind Flex Western Starter 试剂盒	1 套	SLF2000S
iBind Flex 蛋白免疫印迹仪器	1 台	SLF2000
iBind Flex 卡	10 张	SLF2010
iBind Flex 荧光检测 (FD) 溶液试剂盒	1 套	SLF2019
iBind Flex 溶液试剂盒	1 套	SLF2020
iBind Western Starter 试剂盒	1 套	SLF1000S
iBind 蛋白免疫印迹仪器	1 台	SLF1000
iBind 卡	10 张	SLF1010
iBind 荧光检测 (FD) 溶液试剂盒	1 套	SLF1019
iBind 溶液试剂盒	1 套	SLF1020
封闭液		
Blocker BSA (10X) (PBS)	200 mL	37525
Blocker BSA (10X) (TBS)	125 mL	37520
Blocker 酪蛋白 (TBS)	100 mL	37583
Blocker 酪蛋白 (PBS)	100 mL	37582
Pierce 无蛋白 (PBS) 封闭缓冲液	1 L	37572
Pierce 无蛋白 (PBS) 封闭缓冲液	100 mL	37584
Pierce 无蛋白 (TBS) 封闭缓冲液	1 L	37570
Pierce 无蛋白 (TBS) 封闭缓冲液	100 mL	37585
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 (PBS) 封闭缓冲液	100 mL	37578
StartingBlock (TBS) 封闭缓冲液	1 L	37542
StartingBlock (TBS) 封闭缓冲液	100 mL	37579
StartingBlock T20 (PBS) 封闭缓冲液	1 L	37539
StartingBlock T20 (TBS) 封闭缓冲液	1 L	37543
Blocker FL 荧光封闭缓冲液 (10X)	100 mL	37565

封闭、漂洗、检测

产品	规格	货号
二抗和相关试剂		
山羊抗小鼠 IgG (H+L) 二抗, HRP	2 mL	32430
山羊抗兔 IgG (H+L) 二抗, HRP	2 mL	32460
Pierce 高灵敏度链霉亲和素-HRP	0.5 mL	21130
Pierce 高灵敏度链霉亲和素-HRP	5 mL	21132
Pierce 高灵敏度链霉亲和素-HRP (预稀释)	2 mL	21134
Pierce 高灵敏度 NeutrAvidin-HRP	0.5 mL	31030
Pierce 高灵敏度 NeutrAvidin-HRP	5 mL	31032
山羊抗小鼠 IgG (H+L) 二抗, HRP	2 mL	31430
山羊抗兔 IgG (H+L) 二抗, HRP	2 mL	31460
山羊抗小鼠 IgG (H+L) 多聚 HRP 二抗, HRP	0.5 mL	32230
山羊抗兔 IgG (H+L) 多聚 HRP 二抗, HRP	0.5 mL	32260
乙二醇 (50% w/v)	200 mL	29810
Guardian 过氧化物酶偶联稳定剂/稀释剂	200 mL	37548
Guardian 过氧化物酶偶联稳定剂/稀释剂	1 L	37552
HRP 偶联稀释剂/稳定剂	1 L	00-2018
Pierce 稳定过氧化物底物缓冲液 (10X)	100 mL	34062
多聚 HRP 稀释缓冲液	1 L	N501
多聚 HRP 稀释缓冲液	100 mL	N500
漂洗缓冲液		
Pierce 快速漂洗缓冲液 (10X)	1 L	37577
漂洗缓冲液 (25X)	100 mL	WB01
漂洗缓冲液 (25X)	1 L	WB02
BupH 磷酸盐缓冲液干粉包	40 包	28372
BupH Tris 缓冲盐水干粉包	40 包	28376
BupH Tris 缓冲盐水干粉包	10 包	28379
Tween 20 Surfact-Amps 去垢剂溶液	50 mL	85113
PBS (磷酸盐缓冲液) 速溶片	100 片	00-3002
PBS (磷酸盐缓冲液) (10X), pH 7.4, 无 RNase	500 mL	AM9624
PBS (磷酸盐缓冲液) (10X), pH 7.4, 无 RNase	1 L	AM9625
Pierce 20X PBS Tween 20 缓冲液	500 mL	28352
Pierce 20X 磷酸盐缓冲液	500 mL	28348
Pierce 20X TBS 缓冲液	500 mL	28358
Pierce 20X TBS Tween 20 缓冲液	500 mL	28360
TBS 缓冲液 (冻干粉)	1 包	R017R.0000
WesternBreeze 漂洗液 (16X)	2 x 100 mL	WB7003

检测

产品	规格	货号
显色 HRP 底物		
金属增强型 DAB 底物	275 mL	34065
1-Step Ultra TMB-Blotting 溶液	250 mL	37574
Pierce CN/DAB 底物试剂盒	275 mL	34000
显色 AP 底物		
1-Step NBT/BCIP 底物溶液	250 mL	34042
1-Step NBT/BCIP plus 抑制剂底物溶液	100 mL	34070
BCIP 底物粉末 (5-溴-4-氯-3-吡啶基磷酸盐对甲苯胺)	1 g	34040
NBT 底物粉末 (氯化硝基四氮唑蓝)	1 g	34035
WesternBreeze 显色试剂盒 (抗山羊)	1 套	WB7107
WesternBreeze 显色试剂盒 (抗小鼠)	1 套	WB7103
WesternBreeze 显色试剂盒 (抗兔)	1 套	WB7105
化学发光 HRP 底物		
SuperSignal West Dura 持久性底物	100 mL	34075
SuperSignal West Dura 持久性底物	200 mL	34076
SuperSignal West Dura 持久性底物	20 mL	37071
SuperSignal West Pico PLUS 化学发光底物	1 L	34578
SuperSignal West Pico PLUS 化学发光底物	500 mL	34580
SuperSignal West Pico PLUS 化学发光底物	200 mL	34577
SuperSignal West Pico PLUS 化学发光底物	20 mL	34579
SuperSignal West Atto 极敏底物	100 mL	A38555
SuperSignal West Atto 极敏底物	200 mL	A38556
SuperSignal 蛋白免疫印迹底物, Pico PLUS + Atto 套装试剂盒	500 mL + 20 mL	A45915
SuperSignal 蛋白免疫印迹底物, Atto + Pico PLUS 套装试剂盒	100 mL + 20 mL	A45917
SuperSignal 蛋白免疫印迹底物, Atto + Pico PLUS 套装试剂盒	20 mL + 20 mL	A45918

产品	规格	货号
化学发光 AP 底物		
WesternBreeze 化学发光试剂盒 (抗山羊)	1 套	WB7108
WesternBreeze 化学发光试剂盒 (抗小鼠)	1 套	WB7104
WesternBreeze 化学发光试剂盒 (抗兔)	1 套	WB7106
CDP-Star 底物 (0.25 mM 即用型)	50 mL	T2145
CDP-Star 底物 (0.25 mM 即用型)	100 mL	T2146
CDP-Star 底物 (0.25 mM 即用型)	250 mL	T2147
CDP-Star 底物 (0.25 mM 即用型, 含 Nitro-Block- II 增强剂)	100 mL	T2218
CDP-Star 底物 (0.4 mM 即用型), 含 Emerald-II 增强剂, A 包装	100 mL	T2216
CDP-Star 底物 (0.4 mM 即用型), 含 Sapphire-II 增强剂, A 包装	100 mL	T2214
CDP-Star 底物 (12.5 mM 浓缩液)	1 mL	T2304
CDP-Star 底物 (12.5 mM 浓缩液)	2 mL	T2305
CDP-Star 底物 (12.5 mM 浓缩液)	5 mL	T2306
CDP-Star 底物 (12.5 mM 浓缩液)	10 mL	T2307
CDP-Star 底物 (12.5 mM 浓缩液)	20 mL	T2308
CDP-Star 底物 (12.5 mM 浓缩液)	50 mL	T2309
CDP-Star 底物 (12.5 mM 浓缩液)	200 mL	T2310
CSPD 底物 (0.25 mM 即用型)	50 mL	T2141
CSPD 底物 (0.25 mM 即用型)	100 mL	T2142
CSPD 底物 (0.25 mM 即用型)	250 mL	T2143
CSPD 底物 (0.25 mM 即用型, 含 Nitro-Block 增强剂)	100 mL	T2217
CSPD 底物 (0.4 mM 即用型), 含 Emerald-II 增强剂, A 包装	100 mL	T2212
CSPD 底物 (0.4 mM 即用型), 含 Sapphire-II 增强剂, B 包装	100 mL	T2210
CSPD 底物 (25 mM 浓缩液)	0.5 mL	T2040
CSPD 底物 (25 mM 浓缩液)	2 mL	T2041
CSPD 底物 (25 mM 浓缩液)	5 mL	T2042
CSPD 底物 (25 mM 浓缩液)	10 mL	T2043
CSPD 底物 (25 mM 浓缩液)	25 mL	T2044
CSPD 底物 (25 mM 浓缩液)	1 mL	T2098
CSPD 底物 (25 mM 浓缩液)	100 mL	T2138
Nitro-Block 增强剂 (用于膜转印检测的发光增强剂)	20 mL	T2184
Novex AP 化学发光底物	100 mL	WP20002
Novex AP 小鼠化学发光检测试剂盒	1 套	SLF1021
Novex AP 兔化学发光检测试剂盒	1 套	SLF1022

了解更多用于蛋白免疫印迹分析的 Invitrogen 一抗和二抗, 请浏览 thermofisher.com/antibodies

检测

产品	规格	货号
化学发光和荧光检测仪器		
iBright FL1500 成像系统	1 套	A44241
iBright CL1500 成像系统	1 套	A44240
iBright CL750 成像系统	1 套	A44116
iBright SAE 软件 (适用于 21 CFR Part 11, 单一 许可证)	1 套	A49208
X 光胶片		
CL-XPosure 胶片, 5 x 7 in. (13 x 18 cm)	100 片	34090
CL-XPosure 胶片, 7 x 9.5 in. (18 x 24 cm)	100 片	34089
CL-XPosure 胶片, 8 x 10 in. (20 x 25 cm)	100 片	34091
特殊蛋白免疫印迹试剂盒		
SuperSignal West HisProbe 试剂盒	685 mL	15168
HisProbe-HRP 偶联物	2 mg	15165
Clean-Blot IP 检测试剂盒 (HRP)	25 个印迹	21232
Clean-Blot IP 检测试剂 (HRP)	2.5 mL	21230
SuperSignal 蛋白免疫印迹增强剂	500 mL	46640
SuperSignal 蛋白免疫印迹增强剂	50 mL	46641
归一化和定量		
No-Stain 蛋白质标记试剂	40 次反应	A44449
No-Stain 蛋白质标记试剂	10 次反应	A44717
印迹剥离和重新检测		
Restore 荧光抗体剥离液	20 mL	62299
Restore 荧光抗体剥离液	100 mL	62300
Restore PLUS 抗体剥离液	30 mL	46428
Restore PLUS 抗体剥离液	500 mL	46430
Restore 抗体剥离液	500 mL	21059
Restore 抗体剥离液	5 L	21063
Restore 抗体剥离液	30 mL	21062

推荐的蛋白免疫印迹参考文献

参考文献

1. Towbin H (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose 片: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:4350–4354.

2. Tovey ER, Baldo BA (1987) Comparison of semi-dry and conventional tank-buffer electrotransfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose membranes. *Electrophoresis* 8:384–387.

更多相关文献

Gooderham K (1984) Transfer techniques in protein blotting. In Walker JM, ed. *Methods in Molecular Biology Vol. 1. Proteins*. Humana Press: New York, NY, 1984, pp 165–177.

Khyse-Andersen J (1984) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *Biochem Biophys Methods* 10:203.

Kubo K (1995) Effect of incubation of solutions of proteins containing dodecyl sulfate on the cleavage of peptide bonds by boiling. *Anal Biochem* 225:351–353.

Kurien BT, Scofield RH (1997) Multiple immunoblots after non-electrophoretic bidirectional transfer of a single SDS–PAGE gel with multiple antigens. *J Immunol Methods* 205:91–94.

Kurien BT, Scofield RH (2002) Heat-mediated, ultra-rapid electrophoretic transfer of high and low molecular weight proteins to nitrocellulose membranes. *J Immunol Methods* 266:127–133.

Kurien BT, Scofield RH (2003) Protein blotting: a review. *J Immunol Methods* 274:1–15.

Kurien BT, Scofield RH (2009) Introduction to protein blotting. In: *Protein Blotting and Detection: Methods and Protocols*. Humana Press: New York, NY, pp 9–22.

Kurien BT, Scofield RH (2009) Nonelectrophoretic bidirectional transfer of a single SDS–PAGE gel with multiple antigens to obtain 12 immunoblots. In: *Protein Blotting and Detection: Methods and Protocols*. Humana Press: New York, NY, pp 55–65.

Mahmood T, Yang PC (2012) Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci* 4:429–434.

Moos M Jr, Nguye, NY, Liu TY (1988) Reproducible high yield sequencing of proteins electrophoretically separated and transferred to an inert support. *J Biol Chem* 263:6005–6008.

Ornstein L (1964) Disc electrophoresis. 1. Background and theory. *Ann N Y Acad Sci* 121:321–349.

Peferoen M (1988) Vacuum blotting: an inexpensive, flexible, qualitative blotting technique. In: Walker JM, ed. *Methods in Molecular Biology Vol. 3. New Protein Techniques*. Humana Press: New York, NY, pp 383–393.

Westermeier R (2005) Blotting. In: *Electrophoresis in Practice. A Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separations*, 4th ed. Wiley-VCH: New York, NY, pp 67–80.

Wisdom GB (1994) Protein blotting. *Methods Mol Biol* 32:207–213.

赛默飞世尔科技

上 海

上海市浦东新区新金桥路27号3,6,7号楼
邮编 201206
电话 021-68654588*2570

生命科学产品和服务业务

上海市长宁区仙霞路99号21-22楼
邮编 200051
电话 021-61453628 / 021-61453637

北 京

北京市东城区北三环东路36号环球贸易中心C座7层/8层
邮编 100000
电话 010-87946888

广 州

广州国际生物岛寰宇三路36、38号合景星辉广场北塔204-206 单元
邮编 510000
电话 020-82401600

成 都

成都市临江西路1号锦江国际大厦1406 室
邮编 610041
电话 028-65545388*5300

沈 阳

沈阳市沈河区惠工街10号卓越大厦3109 室
邮编 110013
电话 024-31096388*3901

西 安

西安市高新区科技路38号林凯国际大厦
1006-08单元
邮编 710075
电话 029-84500588*3801

南 京

南京市中央路201号南京国际广场南楼1103室
邮编 210000
电话 021-68654588*2901

武 汉

武汉市东湖高新技术开发区高新大道生物园路
生物医药园C8栋5楼
邮编 430075
电话 027-59744988*5401

昆 明

云南省昆明市五华区三市街6号柏联广场写字
楼908单元
邮编 650021
电话 0871-63118338*7001

欲了解更多信息，请扫描二维码关注我们的微信公众账号

赛默飞世尔科技在全国有共21个办事处。本资料中的信息，说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。

了解更多详细信息，请浏览 thermofisher.com/westernblot



赛默飞
官方微信



赛默飞
生命科学小助手

免费服务电话：800 820 8982/400 820 8982
信息咨询邮箱：cnbidmarketing@thermofisher.com
www.thermofisher.cn

ThermoFisher
S C I E N T I F I C

仅用于研究目的。不可用于诊断目的。© 2021 Thermo Fisher Scientific Inc. 保留所有权利。所有商标均为 Thermo Fisher Scientific Inc. 及其子公司的资产，除非另有指明。Bio-Rad、Clarity、Criterion 和 TGX 是 Bio-Rad Laboratories, Inc. 的商标。Immobilon 和 Luminata 是 Merck KGaA 的商标。Kodak 和 BioMax 是 Eastman Kodak 公司的商标。IRDye 和 NewBlot 是 LI-COR Inc. 的商标。Polaroid 是 Polaroid 公司的商标。Revitablot 是 Rockland Immunochemicals Inc. 的商标。Triton 是 Union Carbide 公司的商标。Tween 是 Croda International PLC 的商标。Typhoon 是 GE Healthcare 的商标。Strep-Tag 和 Strep-Tactin 是 IBA 公司的商标。Syngene 是 SynGene 有限公司的商标。COL33965 0621