

聚丙烯酰胺凝胶电泳

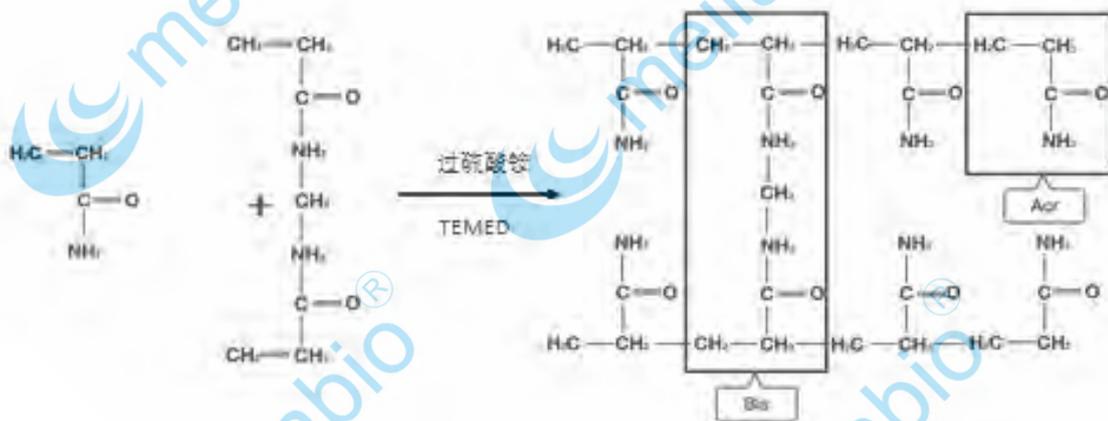
1. 聚丙烯酰胺凝胶的结构和性质

聚丙烯酰胺凝胶是凝胶电泳的载体，以丙烯酰胺（Acr）和交联剂 N,N-甲叉双丙烯酰胺（Bis）聚合而成。聚合反应是由自由基引发，

引发方法包括化学聚合法和光聚合法，化学法一般使用 TEMED 和过硫酸铵生成自由基，而光聚合一般使用核黄素引发生成自由基，核黄素在氧气和紫外光的作用下，会产生自由基，有时会与过硫酸铵结合使用。化学法自由基引发聚合的原理是在水溶液中，因 TEMED 的催化作用，过硫酸铵可以在常温生成过硫酸根自由基，进而激活丙烯酰胺单体，自由基会使丙烯酰胺单体活化成丙烯酰胺自由基，可以与单体反应产生长的聚合物链，并被交联剂无规则交联形成网状结构。

TEMED 具有很强的携带电子的能力，一直被用作加速聚合反应的催化剂。但 TEMED 有容易挥发、氧化，且具有较强的神经毒性的缺点。我公司现已开发出 TEMED 的替代品，可以提前加入到制胶缓冲液内，配制时只需加入过硫酸铵即可生成聚丙烯酰胺凝胶，此类产品货号为 MA0380-MA0389)

丙烯酰胺凝胶聚合方程式如下：



引发剂的种类主要有过硫酸盐和核黄素，我们主要介绍常用的过硫酸盐，引发剂过硫酸盐的用量与丙烯酰胺的聚合速率成正比。聚合反应可以在 4°C 引发聚合，不过在较高温

度时，会加快聚合速度，反之在较低温度时，聚合速度减慢。丙烯酰胺的单体浓度同样与凝胶的聚合速率成正比。低浓度凝胶需要等待更长时间才能凝固。

1.2 聚丙烯酰胺凝胶的孔径

凝胶孔径决定了聚丙烯酰胺凝胶所能分离的蛋白质分子量的大小，而凝胶孔径主要由凝胶浓度和交联度两个因素决定。

凝胶浓度的定义为凝胶溶液中含有的单体和交联剂的总质量的百分比，一般用 T 表示，例如凝胶浓度为 12% 的凝胶，既 100ml 溶液中单体和交联剂的总质量为 12g，交联度是指交联剂双丙烯酰胺与丙烯酰胺单体质量的比值 (w/w)，一般用 C 表示。可简化成以下公式：

$$T\% = \{[\text{丙烯酰胺}(\text{g}) + \text{双丙烯酰胺}(\text{g})] / \text{总体积}(\text{ml})\} \times 100\%$$

$$C\% = \{\text{双丙烯酰胺}(\text{g}) / [\text{丙烯酰胺}(\text{g}) + \text{双丙烯酰胺}(\text{g})]\} \times 100\%$$

凝胶浓度 (T) 是分离不同分子量蛋白质的关键因素。丙烯酰胺浓度不能小于 3%，在低于 3% 时凝胶几乎是流动性的，无法操作，如必须使用可尝试加入 0.5% 的琼脂糖来改善；另外丙烯酰胺浓度最多也不会高于 35% 左右，在高浓度时凝胶硬而脆，容易破碎。在实际使用时，固定浓度的丙烯酰胺凝胶，其浓度一般在 4%-20% 之间，如果是梯度凝胶，可以使用的丙烯酰胺浓度范围可扩大到 3%-30%。梯度凝胶与固定浓度凝胶相比，分离的条带具有更高的分辨率。

交联度反应凝胶结构中甲撑桥的密度，密度越大，孔径越小，但交联度不能过高，否则凝胶是不透明的，并且缺乏弹性，

凝胶孔径还会被凝胶聚合速率影响。聚合速率加快时会降低凝胶的多孔性，而降低聚合速率则会产生更大孔隙的凝胶，因此任何影响凝胶速率的因素都会影响凝胶的孔径，所以在实验中为保证实验的可重复性，要尽量保证实验条件的一致。同时聚合速率除影响孔径外，还会影响凝胶的均匀性，当聚合速度太快 (少于 10min) 或太慢 (多于 60min) 都有可能导致凝胶聚合的不均匀，聚合速率一般通过引发剂的用量来控制。

2 聚丙烯酰胺凝胶蛋白电泳

电泳是带电颗粒在电场作用下向着与其本身所带电荷相反的电极移动的现象，而聚丙烯酰胺凝胶蛋白电泳是带有电荷的蛋白质在聚丙烯酰胺凝胶的介质中向其所带电荷相反的电极移动，又因为聚丙烯酰胺凝胶孔径的关系，使不同分子量的蛋白质分离开。按照制备凝胶的支持物形状和电场方向可分成多种不同的电泳技术，本文主要讲述使用最广泛的垂直平板凝胶电泳，这种电泳的优点是可以在同一条件下，在同一凝胶中对多种样品进行电泳。

2.1 非变性凝胶电泳和变性凝胶电泳

聚丙烯酰胺凝胶蛋白电泳按其分离的蛋白质是否变性可分为非变性凝胶电泳和 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)，非变性凝胶电泳在电泳迁移时，迁移速率取决于蛋白质所带电荷、空间结构和分子量等因素。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳中存在 SDS，可以与蛋白质的疏水部分结合，破坏蛋白的天然构象，使蛋白质变性，在同时使用还原剂将二硫

键断开始，SDS 和蛋白质复合物呈棒状结构，长度与蛋白质分子量的大小呈正比，同时 SDS 为复合物提供大量的负电荷，使电泳时可忽略不同蛋白质的电荷差异，这样电泳迁移率只取决于蛋白分子量的大小。

2.2 连续与不连续电泳体系

聚丙烯酰胺凝胶蛋白电泳中的缓冲液成分和浓度、pH、凝胶浓度都相同，这种蛋白电泳被称为连续电泳体系；而在上述因素里如果有两种以上不同，即可称为不连续体系凝胶，不连续体系凝胶分为上层胶和下层胶。上层胶也叫做堆积胶或浓缩胶，下层胶叫做分离胶。不连续体系在电泳时，蛋白质可先浓缩再被分离，这样可以提高蛋白质条带的分辨率。

连续与不连续电泳系统的都属于等速电泳，在体系内存在有效迁移率大小不同的两种离子，并使这两种离子在系统中组成不连续的两相，一种是在凝胶中迁移速度最快的快离子，另外一种是存在于电极缓冲液中迁移速度相对慢的慢离子。在经典的电泳系统中，快离子使用氯离子，慢离子使用甘氨酸。现在也有使用两性缓冲离子作为系统内的慢离子来代替甘氨酸，包括 HEPES、MOPS 和 MES，以上三种物质的 pKa 值在 7 左右，可以使凝胶在弱酸环境时，仍然可以对蛋白质进行快速电泳分离。Meilunbio® 可为您提供以 HEPES 作为慢离子的预制聚丙烯酰胺凝胶，预制胶缩短了电泳时间，延长了保存期限，且使用方便，避免了凝胶配制的繁琐步骤（货号：MA0240-MA0263）

2.3 不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳操作方法

垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳中不连续体系是目前应用最广泛的体系，现对不连续的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳常规的操作和注意事项做详细介绍。

2.3.1 实验仪器和耗材

- 1) 微型凝胶电泳装置，参照 Bio-Rad 公司 Mini 型电泳设备，包括制胶架、配套玻璃、电源仪和电泳槽。
- 2) 水浴锅（金属浴）
- 3) 烧杯或塑料容器
- 4) 离心管
- 5) 移液枪及枪头

2.3.2 实验试剂

- 1) 丙烯酰胺
- 2) N,N'-甲叉双丙烯酰胺（双丙烯酰胺）
- 3) Tris
- 4) 十二烷基硫酸钠
- 5) 四甲基乙二胺
- 6) 巯基乙醇或 DTT
- 7) 甘油
- 8) 溴酚兰
- 9) 甘氨酸

- 10) 盐酸
11) 超纯水

2.3.3 常用工作液配方

1) 30%丙烯酰胺储存液 (29:1), 100ml

29g	丙烯酰胺
1g	双丙烯酰胺
加入超纯水	定容至 100ml

注意：在通风柜操作，加蒸馏水至 100ml，搅拌直至粉末完全溶解，

2) 4×分离胶缓冲液, 100ml

18.17g	Tris
0.4g	SDS
加入超纯水 80ml	完全溶解
8M 盐酸调节 pH 值	至 8.8
加入超纯水	定容至 100ml

Meilunbio®可为您提供此类产品 (货号: MA0053)

3) 4×浓缩胶缓冲液, 100ml

6.057g	Tris
0.4g	SDS
加入超纯水 80ml	完全溶解
8M 盐酸调节 pH 值	至 6.8
加入超纯水	定容至 100ml

Meilunbio®可为您提供此类产品 (货号: MA0054、MA0057)

4) 10%过硫酸铵, 5ml

0.5g	过硫酸铵
5ml	超纯水

注意：溶解后储存于密封管内，4℃保存。

5) 电泳缓冲液, 1L.

3g	Tris
----	------

14.4g	甘氨酸
1g	SDS
加入超纯水	定容至 1L

注意：溶液内不能引入氯离子，pH 在 8.3 左右。一般配制成 5×或者 10×浓缩液，可在室温长期保存。

Meilunbio®可为您提供此类产品（货号：MA0012、MA0013）

6) 5×样品缓冲液（loading buffer），10ml。

0.0727g	Tris
2.5ml	甘油
0.2g	SDS
0.5ml	2-巯基乙醇
0.005g	溴芬兰
加入超纯水	定容至 10ml

注意：储存时间超过 1 个月，在使用前要重新加入还原剂。

Meilunbio®可为您提供此类即用型产品（MA0003、MA0003-D）

2.3.4 凝胶配制操作步骤

1) 分离胶配制方法

a) 根据目的蛋白分子量大小选择合适的PAGE分离胶配制浓度，可根据下表中分离胶分离范围，确定分离胶浓度。

丙烯酰胺在凝胶中的百分比	分离胶的分离范围（kDa）
15%	12-45
12.5%	12-60
10%	18-75
8%	30-120
6%	50-200

b) 参照凝胶模具说明书，装配好凝胶模具。

c) 将不同体积的30% Acr-Bis (29:1)、4×分离胶缓冲液和超纯水在小烧杯或试管中混合。

不同浓度的分离胶各组分加入体积，如下表：

分离胶浓度	凝胶体积 (ml)	所需各组分体积 (ml)				
		纯水	30%Acr-Bis(29:1)	4X 分离胶缓冲液	10%APS	TEMED
6%	5	2.75	1.0	1.25	0.05	0.004
	10	5.5	2.0	2.5	0.1	0.008
	15	8.25	3.0	3.75	0.15	0.012
	20	11	4.0	5	0.2	0.016
8%	5	2.42	1.33	1.25	0.05	0.003
	10	4.8	2.7	2.5	0.1	0.006
	15	7.25	4.0	3.75	0.15	0.009
	20	9.7	5.3	5	0.2	0.012
10%	5	2.08	1.67	1.25	0.05	0.002
	10	4.17	3.33	2.5	0.1	0.004
	15	6.25	5.0	3.75	0.15	0.006
	20	8.3	6.7	5	0.2	0.008
12%	5	1.75	2.0	1.25	0.05	0.002
	10	3.5	4.0	2.5	0.1	0.004
	15	5.25	6.0	3.75	0.15	0.006
	20	7.0	8.0	5	0.2	0.008
15%	5	1.25	2.5	1.25	0.05	0.002

	10	2.5	5.0	2.5	0.1	0.004
	15	3.75	7.5	3.75	0.15	0.006
	20	5.0	10.0	5	0.2	0.008

- d) 加入10% APS和TEMED，轻轻搅拌使其混匀，避免产生气泡。
- e) 在凝胶模具中灌入适量分离胶溶液，然后在分离胶溶液上轻轻覆盖一层1cm的水层，使凝胶表面保持平整。
- f) 静置30-60分钟，待分离胶和水层之间出现一个清晰的界面后，说明凝胶已聚合。

2) 浓缩胶配制方法

浓缩胶各组分加入体积如下表：

浓缩胶浓度	凝胶体积 (ml)	所需各组分体积 (ml)				
		纯水	30% Acr-Bis(29:1)	4X 浓缩胶缓冲液	10%APS	TEMED
5%	2	1.14	0.34	0.5	0.02	0.002
	4	2.28	0.68	1	0.04	0.004
	6	3.42	1.02	1.5	0.06	0.006
	8	4.56	1.36	2	0.08	0.008

- a) 去除覆盖在分离胶上的水层。
- b) 将不同体积的30% Acr-Bis (29:1)、4×浓缩胶缓冲液和超纯水在一个小烧杯或试管中混合。
- c) 加入10% APS和TEMED，轻轻搅拌使其混匀，避免产生气泡。
- d) 将浓缩胶溶液加至分离胶的上面，直至凝胶溶液到达前玻璃板的顶端。
- e) 将梳子慢慢插入凝胶内，避免产生气泡。
- f) 静置等待浓缩胶聚合。
- g) 待聚合后，小心拔出梳子，即可进行电泳。

Meilunbio®可为您提供此类即用型产品包含配制凝胶全套试剂（货号：MA0159）

2.3.5 蛋白样品制备步骤

- 1) 对蛋白样品进行定量后，按照每孔上样蛋白质量20-100ug稀释或浓缩蛋白质。
- 2) 将确定好蛋白浓度的蛋白质样品与5×样品缓冲液（loading buffer）混合，两者体积比为4:1。

- 3) 混合后，在100°C加热5-10min，使蛋白质与SDS结合变性。
 - 4) 煮沸后简短离心，将管壁附着的水珠离心至管底，冷却至室温备用。
- 2.3.6 上样及蛋白电泳
- 1) 上样前首先要将凝胶玻璃板和电泳槽组装好，加入电泳缓冲液。梳子要在使用前拔出，拔出过早会使孔道失水变形。
 - 2) 加样时注意要缓慢加入，防止样品进入相邻孔道导致交叉污染。
 - 3) 样品加入后，取出电泳槽盖，将电极插头与电极相接。
 - 4) 电泳条件分为恒压电泳或恒流电泳，两者电泳结果没有显著差异，恒压时，电压一般控制在 80-120V 之间。
 - 5) 凝胶厚度会影响电泳时间，1.5mm 厚凝胶的电泳速度要比 0.75mm 凝胶慢 10min 左右。
 - 6) 在指示剂迁移至玻璃底部 1cm 时，停止电泳，关闭电源，从电泳槽中取出凝胶玻璃板，轻轻撬开玻璃板，凝胶就会贴在一侧玻璃板上，然后小心取出凝胶，进行后续实验。

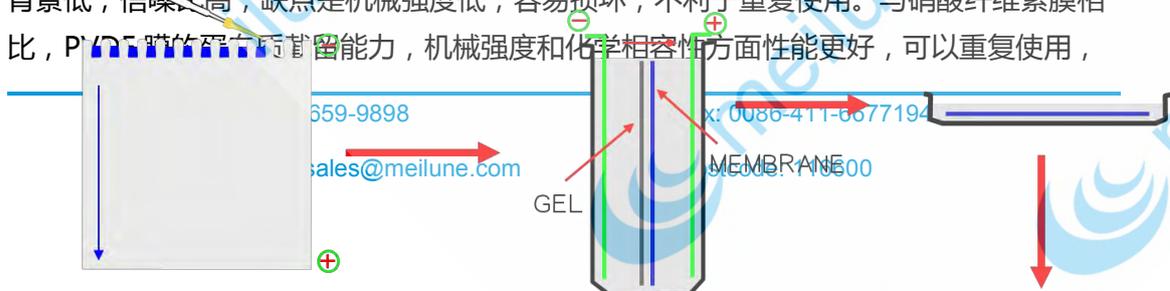
3 免疫印迹实验

蛋白免疫印迹，也称为 Western blotting，是从多种复杂蛋白质中检测目的蛋白质的一种方法，这种技术诞生于 20 世纪 70 年代，由 Towbin 等人发明了该项技术，现在已经成为蛋白质分析的常规技术。该实验流程是将处理好的蛋白样品依据蛋白质的分子量、电荷数和等电点等性质对其进行电泳分离，然后转移到固相载体上，再利用抗体和抗原之间的特异性结合的原理，通过抗体（一抗）识别所要研究的蛋白质，然后用能够与一抗特异性结合的抗体（二抗）识别一抗，二抗一般会偶联能够检测的酶，通过对酶浓度的检测，从而对目的蛋白质进行定性或半定量实验。综上所述，免疫印迹可以分为两个步骤：一是蛋白质由凝胶转移至固相载体；二是对目的蛋白的特异性检测。

3.1 免疫印迹原理

蛋白免疫印记实验流程如下图所示：

者各有优缺点，硝酸纤维素膜的优点是操作简单，不需使用甲醇预处理，只需在电泳缓冲液中浸泡即可润湿，且容易封闭，背景低，信噪比高，缺点是机械强度低，容易损坏，不利于重复使用。与硝酸纤维素膜相比，PVDF 膜的结合能力，机械强度和化学相容性方面性能更好，可以重复使用，



但 PVDF 膜在使用前需要使用无水甲醇预处理，并用转膜液平衡后才能使用，且 PVDF 膜更易于出现背景较高的现象。

硝酸纤维素膜和 PVDF 膜都有 0.45um 和 0.22um 两种孔径，大孔径 0.45um 的膜适合分子量大于 20kDa 的蛋白质，而 0.22um 膜对小分子蛋白有更好的截留吸附能力，但是背景会比孔径为 0.45um 膜高。

3.2 蛋白质转移操作方法

蛋白质转移通常由电泳实现，现常用的转移方法有湿法转移和半干法转移，两者都是将凝胶和固相基质类似三明治样夹在一起，但湿法转膜转膜效率高且转膜均匀，但需使用大量转移缓冲液，转膜时间长，而半干法转膜只需要少量转移缓冲液，且转膜时间短，所以大分子量的蛋白质或转膜效率低的蛋白，更适合使用湿法转移。

3.2.1 湿法转移实验

3.2.1.1 实验仪器和耗材

- 1) 电源仪
- 2) 湿转电转仪装置
- 3) 3MM Whatman 滤纸或类似产品
- 4) 硝酸纤维素膜或 PVDF 膜
- 5) 塑料盒
- 6) 大托盘

3.2.2 实验试剂

- 1) Tris
- 2) 甘氨酸
- 3) 氯化钠
- 4) 甲醇
- 5) SDS

3.2.1.2 工作液配方

1) 转移缓冲液

1.93g	Tris
9g	甘氨酸
加入超纯水	定容至 1L

建议配制成 20× 储存液便于使用，pH 值应在 8.1-8.4 之间。在使用前要加入 10%-20% 的甲醇，促进蛋白的溶解和转移。如蛋白分子量较大，或本身携带负电荷较少，不易转移，可加入 0.025-0.1% 的 SDS，促进转移，但要注意加入 SDS 也可能会抑制某些蛋白质的转移。

Meilunbio® 可为您提供此类产品（货号：MA0093、MA0094）

3.2.1.3 湿法转移操作步骤

- 1) 配制好转移缓冲液并加入甲醇，放入冰箱冷却至 4°C。甲醇也可以用乙醇替代。
- 2) 如果使用硝酸纤维素膜，在转移缓冲液内浸泡 15-20min 即可使用，如果是 PVDF 膜，需要先使用甲醇浸泡活化，活化时间在 0.5-2min 之间，活化后同硝酸纤维素膜一样浸泡在转移缓冲液内备用。
- 3) 将转印用的 3MM 滤纸和海绵也要提前放入缓冲液内浸湿。
- 4) 蛋白电泳结束后，取出凝胶放入缓冲液内平衡 10min 左右，注意凝胶在缓冲液内时间不能过长，时间过长会使蛋白弥散影响蛋白分辨率。
- 5) 打开转移盒并放置在大托盘内，将完全被转移缓冲液浸透的海绵放在转移盒壁上。每放置一层滤纸、凝胶或膜时，都要使用滚轮或是用玻璃板替代，轻轻滚动排除每层之间可能存在的气泡。
- 6) 在海绵上再放置一张浸湿的 Whatman 3MM 滤纸。注意托盘内应装有转移缓冲液，水线最好于滤纸齐平，液体过多，凝胶容易漂浮错位。
- 7) 小心将凝胶放置于滤纸上，避免气泡。
- 8) 使用缓冲液将凝胶表面润湿，将印记膜放在胶面上。
- 9) 然后在印记膜上放一张浸湿的 Whatman 3MM 滤纸，将另一块被转移缓冲液润湿的海绵放在滤纸上。关上转移盒，并放入电转仪内。
- 10) 辨别电转仪的正负极，保证印记膜在靠近正极一侧，凝胶在靠近负极一侧。安装好后向电转仪内加满转移缓冲液，连接好电源，开始电泳。大部分仪器均是黑丝代表负极，红色代表正极。
- 11) 注意转印最好在 0-4°C 进行，最好将电转仪放置在冷藏冰箱或者冰水混合物内。

3.2.2 半干法转移实验

3.2.2.1 实验仪器和耗材

- 1) 电源仪
- 2) 半干法电转仪装置
- 3) 3MM Whatman 滤纸或类似产品
- 4) 硝酸纤维素膜或 PVDF 膜
- 5) 塑料盒

3.2.2.2 实验试剂

- 1) Tris
- 2) 甘氨酸
- 3) 氯化钠
- 4) 甲醇

3.2.2.3 半干转移操作步骤

- 1) 半干法转移可使用与湿法转移相同的缓冲液。准备六张 Whatman® 3MM 滤纸和一张转印膜，转印膜的处理方法与湿转法相同，都要剪切成与凝胶同样大小，并放在电转移缓冲液内浸湿，

- 2) 取出三张浸湿的滤纸，将其放在半干转仪器底槽上，三张滤纸要放置整齐。注意在每放置一层滤纸、凝胶或膜时，都要使用滚轮或是用玻璃板替代，轻轻滚动排除每层之间可能存在的气泡。
- 3) 确认半干转仪器底部的正负极，如果是正极，则在放置好的三层滤纸上先放置转印膜。
- 4) 然后将凝胶放置在膜上，再将三层滤纸放在凝胶上面。
- 5) 最后将仪器上盖轻轻放下。注意在操作时，不要加入过多转膜液，否则会引起短路。在开始转印时，要观察转膜的电压和电流是否正常。
- 6) 具体电压和电流，可根据仪器说明书提供的计算公式设定。

3.3 免疫印记检测

蛋白质由丙烯酰胺凝胶转移至硝酸纤维素膜或 PVDF 膜上后，利用抗体（一抗）检测特定蛋白质，再使用二抗识别一抗，需要注意的是在加入抗体前，需要将膜上没有被凝胶中蛋白覆盖的位置封闭，防止抗体非特异性结合在膜上，常用的封闭试剂是含脱脂奶粉或 BSA 的 TBST 溶液。下文来介绍辣根过氧化物酶标记二抗的检测方法。

3.3.1 实验仪器和耗材

- 1) 水平摇床
- 2) 化学发光成像仪
- 3) 塑料盒
- 4) 保鲜膜
- 5) 枪头

3.3.2 实验试剂

- 1) Tris
- 2) 氯化钠
- 3) 吐温-20
- 4) BSA 或脱脂奶粉
- 5) 抗体
- 6) 发光检测试剂 (Meilunbio®可为您提供此类即用型产品,货号 MA0186)

3.3.3 工作液配方

- 1) 1×TBS, 1L

3g	Tris
8.7g	氯化钠
加入 800ml 超纯水	溶解

使用盐酸调 pH 值	至 7.2
加入超纯水	定容至 1L

Meilunbio®可为您提供此类即用型产品(货号：MA0141)

2) 1×TBST, 1L

1L	1×TBS
0.5ml	吐温-20
混匀，常温保存	

Meilunbio®可为您提供此类即用型产品(货号：MA0091、MA0092)

3) BSA 封闭液, 100ml。

5g	脱脂奶粉/BSA
100ml	1×TBST
溶解，现配现用，4℃保存	

Meilunbio®可为您提供此类即用型产品(货号：MA0097)

4) 抗体稀释液, 100ml

1g	BSA
100ml	1×TBST
溶解，如果准备多次使用可以加入防腐剂叠氮钠等。	

Meilunbio®可为您提供此类即用型产品(货号：MA0100、MA0097);注意抗体稀释液除了加入 BSA 外，可以使用脱脂奶粉、酪蛋白和明胶，可单独使用，也可以混合使用。

Meilunbio®也可为您提供防腐剂叠氮钠替代品（货号：MA0400）。

3.3.4 印记膜的封闭和抗体孵育操作步骤

1) 印记膜的封闭

- a) 打开转印仪器，将印记膜从仪器中取出。注意不要触碰膜上可能有蛋白的区域。
- b) 迅速将膜放在装有 TBS 的容器中，液面必须没过膜，清洗 2min，将膜上的转膜液洗净。
- c) 弃掉清洗用的 TBS，加入封闭液，也要保证没过膜。
- d) 轻轻水平震荡，孵育 30-90min。
- e) 弃掉封闭液，使用 TBS 清洗 2 次，每次 4min。

2) 抗体孵育和洗膜

- a) 将一抗适当稀释于抗体稀释液中，并将膜放在液体中，为节省一抗，可将膜放置于塑料袋中孵育，注意要保证液体和膜均匀接触，防止造成假阴性结果。
- b) 孵育时间是抗体和蛋白质特性决定，一般过夜孵育时灵敏度最高。
- c) 使用 TBST 清洗膜，去除膜表面没有与目的蛋白结合的一抗，洗膜次数要 3-4 次，每次时间 8-10min。注意如果是检测磷酸化蛋白，不要使用 PBST，防止溶液中磷酸根对实验结果的干扰。
- d) 弃掉 TBST，加入稀释好的二抗，二抗可以使用抗体稀释液或者 TBST 稀释，二抗孵育时间是 30-90min。
- e) 弃掉二抗，使用 TBST 清洗膜两次，每次 10min，第三次建议使用 TBS 洗膜。

3.3.5 抗体选择注意事项

免疫印记实验普遍采用间接法检测目的蛋白，虽然增加了操作步骤，但是可以增加灵敏度，降低成本。在选择一抗时要选择已经经过验证可以应用于免疫印记的抗体，而二抗的选择要取决于一抗的动物种属，例如，如果一抗是兔多克隆抗体，那么二抗必须是来源于非兔源的抗兔 IgG，一般商品名称是羊抗兔抗体或者是鸡抗兔 IgG 抗体。

3.3.6 信号检测

- 1) 免疫印记检测信号的来源是标记于二抗的辣根过氧化物酶 (HRP) 或碱性磷酸酶 (AP)，本文主要介绍实验中常用的辣根过氧化物酶 (HRP) 的检测方法，化学发光的原理是化学反应过程中产生的能量以光的形式释放，常用的底物是鲁米诺，通过 HRP 催化过氧化物，进而使鲁米诺被氧化为含有高能量的激发态产物，然后在释放光的同时，恢复到稳定的基态产物。Meilunbio® 可为您提供灵敏度高且信号稳定的即用型化学发光检测试剂盒，可检测低丰度的蛋白。
- 2) 发光信号的采集主要有两种方法，一种是在暗盒内使用胶片感光，另外一种是使用化学发光成像仪采集光信号。

3.3.3.5.1 化学发光检测法的操作步骤

- 3) 将 A 液和 B 液按照 1:1 的比例 混合制备成工作液。工作液需要现配现用，推荐使用剂量：0.1ml 工作液/cm² 膜。
- 4) 用镊子取出洗好的膜，沥干膜上洗膜液，将结合蛋白的一面朝上，放置于洁净保鲜膜上。
- 5) 加上配好的 ECL 工作液，孵育时确保工作液覆盖整张膜，室温孵育 1-2min。
- 6) 弃去印迹膜上 ECL 工作液，将一张洁净的保鲜膜平整的铺在印迹膜上。
- 7) 将处理好的印迹膜置于 X 光片盒中，在暗室中取一张胶片小心置于膜上，曝光时间取决于膜上的发光强度，曝光后立即显影定影，或将印迹膜放置到化学发光成像仪内，按仪器说明书进行检测。