

### 使用胶做 western blot 的方法

在经典的 Western Blot 的世界里，蛋白电泳—转膜—封闭—抗体—显色这个五步骤环环相扣，构成 WB 完整过程，就象砌积木一样，少了前面一步的基础后面的就砌不上去。但是亲爱的朋友，告诉我，你们在一次又一次重复这个貌似简单又颇为费时的实验时，有没有设想过能省略掉其中的某个费时的非必需步骤，更直接更快得到结果呢？那该有多么省事啊！

真的有这样一种产品，抽掉了 WB 中费时的非必需步骤——转膜和封闭，直接在 PAGE 电泳胶上做免疫印迹！这个几乎颠覆传统 WesternBlot 概念的技术创新，完美演绎了“没有做不到，只有想不到”这一句话。

经过 PAGE 电泳分离的蛋白样本可以在凝胶里直接固定和染色（比如考马斯亮蓝）看结果，但如果要检测蛋白质特异性就要借助传统 Western Blot 的转膜的步骤，然后在膜上进行免疫反应检测。仿佛是天经地义似的。可是你有没有想过为什么一定要转膜？很简单：因为凝胶上的蛋白质会发生扩散迁移，需要“固定”，但是“固定”本身会影响蛋白质和抗体的免疫识别反应，所以需要将由 PAGE 电泳分开的样本从电泳胶上共同转移到稳定的固相支持介质——膜上，使之不能再迁移同时又能保持免疫原性，然后在这个 PAGE 胶的“影像”也就是印迹上，可以通过免疫检测目标蛋白的特异性。这个方法借助转膜克服了一些难题，但是转膜本身也带来另一些问题：比如转膜的不完全性——样本中各种蛋白的大小和荷电各不相同，在电场中离开 PAGE 胶迁移速度、与膜的结合能力各有差异，导致转膜效率潜在差别；比如 PAGE 胶孔径和膜的孔径甚至电流的大小都会影响转膜效率——非常偶然遇上转移效率低的蛋白比如 Fibrinogen 纤维蛋白原，简直气昏人。再加上转膜过程也有可能造成部分蛋白免疫原性的丢失——特别是非变性胶，目标蛋白的部分抗原表位可能会发生变化，导致抗体无法识别检测。再加上转膜后膜上的其他空白位点需要进行封闭，以及膜本身对部分检测方法的不兼容和背景问题，可见费精力又费钱的转膜这个 PAGE 的“印迹”有时未必能很好的代表 PAGE 胶结果本身（这是非常特殊的情况。多数情况还是很好的，不要误会）。

这般辛辛苦苦的转膜印迹为的就是避过在凝胶上固定和保持蛋白免疫原性之间的矛盾，如果有办法可以在 PAGE 胶上能固定蛋白同时又能保持蛋白免疫原性，不就可以直接在 PAGE 胶上检测蛋白特异性，又避免前面这许多麻烦了吗？还大大节约时间和经费呢。且看生物通为你推荐 2 种技术创新的产品——正是这貌似简单的创新，突破了原来的墨守成规，令未来的 WB 更加简单。原来只要我们敢于突破自己原有的框框，就会有更多精彩的发现！

### 一、Pierce 公司：UnBlot In-Gel Chemiluminescent Detection Kit

其实此前也有尝试改良固定方法使得可以直接在 PAGE 胶上检测蛋白免疫原性的，只不过往往要固定和漂洗很多次，甚至需要一天的时间，太过费时和费力而无法令人接受。不过，坚持致力于蛋白质研究工具开发的 Pierce 公司一直都没有放弃这种努力。坚持就是胜利，就是 UnBlot In-Gel。只要 50% 异丙醇固定 15 分钟，超纯水漂洗 15 分钟，就可以马上用一抗孵育，而省掉了转膜和封闭的步骤！是不是觉得很神奇呢？如果不相信，那就先来看看实验步骤的比较。

这样算下来，怎么算都是 UnBlot In-Gel 的节省吧，节约了转膜和封闭的 3—4 小时的时间，更节约了膜的花费，不用再为转膜效率和转膜条件而伤神，更不用说花在学习实验操作上的时间和金钱。但是当然大家会更关心：快是快多了，那么检测灵敏度和质量又如何呢？固定后的 PAGE 胶，蛋白不会迁移了，可是抗体和检测试剂能“渗透”进去的量就有限了。多谢化学发光法的高度灵敏，UnBlot 的检测灵敏度是 1ng，和经典的 ECL 化学发光法相当，不单适合压片显影，也适合 CCD 成像系统检测，绝对满足一般实验的检测要求。虽然从检测极限的数字上看起来好像不如那些动辄 pico、femo 的检测试剂盒那么高，但是要把在转膜过程中的蛋白损耗和被破坏的抗原决定簇算在内啊，可能也差不多了。UnBlot 防止了这 2 种情况的发生并且帮助不易转膜的蛋白检测，这可是怎么也不能换算的啊！

除了上面所说的这两点，对于实验结果的分析，UnBlot 由于无需转膜，因此可以在化学发光显色并记录后再进行总蛋白的染色，无论丽春红 S、考马斯亮蓝，氨基黑等等或者 Pierce 的 GelCode Blue Stain Reagent 都可以检测后染色，比较蛋白免疫反应的特异性，方便判断实验结果。而且想一想，这可是在原位检测哦，真正保持一致性。另外由于 UnBlot 是在胶上检测，那也就是说可以 reprobing 啰，如果你的样本珍贵，要检测几种蛋白（比如一个基因表达的变化可能会引起几种相关蛋白表达的变化），你就可以很方便的洗掉原来的抗体，换个抗体检测其他目标蛋白！是不是很节约时间和样本呢？至少不用再跑电泳了啊。只检测一个蛋白也可以用 reprobing 优化反应条件，这为我们获得漂亮的结果可是大为有益的。

还有一个问题就是适用范围的问题，以前 UnBlot 只能用于 Invitrogen 的 Novx, Cambrex (以前的 FMC, Biowhittak, 生物通前面的文章有介绍的), Bio-Rad 的 Criterion brand Bis-Tris, Tris-Glycine, Tricine 和 Tris Acetate gels, 包括变性和非变性胶，但是不能用于 Bio-RadiGel 和 Zaxis gel。国内毕竟还是自配胶居多，经过改良后的 UnBlot 也可以用于自制胶了，这个方法距离大家就不再遥远啦！不过，做胶时要用硅化玻璃和有特殊要求（配胶时不要用 SDS）。而就种类来说，UnBlot 也可以用于 3-8%, 4-12%, 8-18%, 4-20% 和 10-20% 的梯度胶，以及 8-16% 的非梯度胶。至于在蛋白适用性上，UnBlot 并没有什么限定性，目前已有报告成功应用的例子包括 20KD 到 160KD 的蛋白。如果硬要说有的话，那就是 UnBlot 通用试剂盒目前只有小鼠和兔源、生物素 3 种选择（还有 GST-tag 融合蛋白的），如果你一抗不在此列，那么也就没有办法，乖乖的转膜，慢慢的摸索条件吧。

现在 UnBlot 参考价格是“贵妃级”的 ¥5000 左右（打折幅度以各人能力为准，嘿嘿，7 折也要 3500 呢），可用于 1000cm<sup>2</sup> 胶，说明书说可以用 10 次（10x8cm）Mini 胶，不过我们知道一般 Mini 胶去掉积层胶后通常不过 5cm 高，其实用 20 次应该没问题的。由于包含了二抗和显色试剂，还居然有 25 张 X 光片和配套的显色工具箱，呵呵，确实价值不菲。不过可以节约膜、转膜设备以及奶粉钱，确实可以一试。还有生物素标记方法和 GST-Tag 的检测试剂盒。我很期待，也相

信，很快会有更方便常规实验的 Unblot 系列推出吧。老实说，Pierce 还是很值得期待的，毕竟在研究蛋白的领域里有很好的口碑，也有许多很有创意的产品——尽管我们不太熟悉它，相信以后越来越多的目光转向蛋白研究，会有越来越多人记住这个与 Hyclone 合并的公司的。哦对了，生物通近期的优秀论文评选，获奖论文的奖金就可以用于选购 Pierce/Hyclone 的产品，如果你有文章在《遗传》《遗传学报》《中国农业科学》《中国生物工程杂志》上发表，也许可以考虑试试这个东西？

另一个“神奇侠”是来自 Invitrogen 公司的 InVision His-tag In-gel Stain，其实这是个染料，根本就不算 Western，但关键是巧妙得很，利用荧光染料交联带有 Ni<sup>2+</sup>的 NTA，其中的 Ni<sup>2+</sup>可以高度亲和 His-tag，所以可以直接染色 PAGE 胶，而特异地将样品中带有 His-Tag 的条带显示出来，就和用 His 抗体做 Western Blot 一样，又省掉了转膜、封闭、抗体等等麻烦的步骤，只要紫外或者扫描仪，而且灵敏度很高，达到 ng 级别。实在是好玩的很呐。如果你的实验室有表达 His tag 融合蛋白，一定要搞一个，比买 His 抗体要好哦，Invitrogen 的招牌，应该也没有人怀疑吧？如果我还告诉你这个试剂盒做一个检测只需要 100 多元钱（¥3498，20mini-gels），是不是想买了呢？如果是这样，那就赶快行动吧。