

WB (Western Blotting) 实验报告

一、实验器材及试剂

1、主要实验器材及耗材

名称	厂家	货号
涡旋混匀仪	杭州申花科技有限公司	SH-VM500S
复合转子离心机	杭州申花科技有限公司	SH-Mini7KS
移液器	德国艾本德股份公司	3120000011
移液器	德国艾本德股份公司	3120000020
移液器	德国艾本德股份公司	3120000038
移液器	德国艾本德股份公司	3120000046
移液器	德国艾本德股份公司	3120000054
台式高速冷冻离心机	湖南恒诺仪器设备有限公司	2-16R
酶标仪	赛默飞世尔仪器有限公司	Multiskan FC
8 联管	合肥科兔生物科技有限公司	KTL-W0208-W
离心管 1.5mL (无菌无酶, 10 支/独立小包)	合肥科兔生物科技有限公司	KTL-15-W
盒装滤芯吸头 1250 μ L 加长 (无菌无酶)	合肥科兔生物科技有限公司	KTX-H200L-W
盒装滤芯吸头 200 μ L (无菌无酶)	合肥科兔生物科技有限公司	KTX-H200L-W
盒装滤芯吸头 100 μ L (无菌无酶)	合肥科兔生物科技有限公司	KTX-H100L-W
盒装滤芯吸头 20 μ L (无菌无酶)	合肥科兔生物科技有限公司	KTX-H20L-W
盒装滤芯吸头 10 μ L (无菌无酶)	合肥科兔生物科技有限公司	KTX-H10L-W
通用电泳仪	杭州申花科技有限公司	SH-DDY10P
超净工作台	苏净安泰	SW-CJ-1FD
翘板摇床	杭州申花科技有限公司	SH-Y09-295
垂直电泳槽	杭州申花科技有限公司	SH-DYC10V
蛋白转印槽	杭州申花科技有限公司	SH-ZYZ10T

2、主要实验试剂

试剂	厂家	货号
One-Step PAGE Gel Fast Preparation Kit (10%)	南京诺唯赞生物科技股份有限公司	E303-01
BCA 蛋白浓度检测试剂盒	上海碧云天生物技术有限公司	No.P0010
双色 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 5 \times	上海碧云天生物技术有限公司	No.P0285
无蛋白快速封闭液	赛维尔生物科技有限公司	G2052
SuperKine 超敏型 ECL 发光液 (飞克级)	Abbkine	BMU102-CN

75%乙醇: Water Nuclease-Free 配制



二、Western blot 详细实验步骤及注意事项

1、蛋白提取

(1) 组织样本蛋白提取

- a. 组织称重，切小块放入管中。
- b. 配置含抑制剂的蛋白质抽提试剂（1ml 抽提试剂中加入 5 μ l 蛋白酶抑制剂混合液，5 μ l PMSF 和 5ul 磷酸酶混合液）。
- c. 加入预冷的含抑制剂的蛋白质抽提试剂（250mg 组织中加入 1ml 抽提试剂）。
- d. 用匀浆器每次 30 秒低速匀浆，每次匀浆间隔冰浴 1 分钟，至组织完全裂解。
- e. 裂解液于预冷的离心机中 14,000xg 离心 15 分钟。上清液立刻转移入新的离心管中保存待用。

(2) 细胞样本蛋白提取

- a. 贴壁培养的细胞，吸去培养基后，每孔加入 2mL 预冷 PBS 洗两次，弃尽上清；
- b. 加入适量 0.25%-EDTA 胰蛋白酶消化液，37 $^{\circ}$ C 消化，消化完成后将细胞及培养液移至离心管中，1000 转/分离心 5 min，再加入 1mL 预冷 PBS 重悬，1000 转/分离心 5 min 洗两次；
- c. 在每 1mL 预冷 Lysis Buffer 中加入 10 μ L 磷酸酶抑制剂，1 μ L 蛋白酶抑制剂和 5 μ L 100mM PMSF，混匀，冰上保存数分钟待用；
- d. 细胞洗涤后，弃尽上清，每管加入 200 μ L 上述配制好的冷 Lysis Buffer；
- e. 置于 4 $^{\circ}$ C 摇床平台上，温和振荡 15 min；
- f. 14,000rpm，4 $^{\circ}$ C 离心 15min，取上清为全蛋白提取物，蛋白定量（BCA 法）；
- g. 分装保存于 -80 $^{\circ}$ C，避免反复冻融。

2、蛋白定量

(1) 蛋白标准品的准备

- a. 取 1.2ml 蛋白标准配制液加入到一管蛋白标准(30mg BSA)中，充分溶解后配制成为 25mg/ml 的蛋白标准溶液。配制后可立即使用，也可以 -20 $^{\circ}$ C 长期保存。
- b. 取适量 25mg/ml 蛋白标准，稀释至终浓度为 0.5mg/ml。例如取 20 μ l 25mg/ml 蛋白标准，加入 980 μ l 稀释液即可配制成为 0.5mg/ml 蛋白标准。蛋白样品在什么溶液中，标准品也宜用什么溶液稀释。但是为了简便起见，也可以用 0.9%NaCl 或 PBS 稀释标准品。稀释后的 0.5mg/ml 蛋白标准可以 -20 $^{\circ}$ C 长期保存。

(2) BCA 工作液的配制

根据样品数量，按 50 体积 BCA 试剂 A 加 1 体积 BCA 试剂 B(50:1)配制适量 BCA 工作液，充分混匀。例如 5mlBCA 试剂 A 加 100 μ l BCA 试剂 B，混匀，配制成 5.1ml BCA 工作液。BCA 工作液室温 24 小时内稳定。

(3) 蛋白浓度检测

- 将标准品按 0、1、2、4、8、12、16、20 μ l 加到 96 孔板的标准品孔中，加标准品稀释液补足到 20 μ l，相当于标准品浓度分别为 0、0.025、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5mg/ml。
- 加适当体积样品到 96 孔板的样品孔中。如果样品不足 20 μ l，加标准品稀释液补足到 20 μ l。请注意记录样品体积。
- 各孔加入 200 μ l BCA 工作液，37 $^{\circ}$ C 放置 20-30 分钟。
- 用酶标仪测定 A562，或 540-595nm 之间的波长的吸光度。
- 根据标准曲线和使用的样品体积计算出样品的蛋白浓度。
- 根据定量结果调整蛋白浓度，确保上样时各泳道蛋白总量一致。

3、SDS-PAGE 电泳与转膜

(1) 配胶

以制备一块 0.75/1.0/1.5 mm 的 mini 胶为例。

凝胶厚度	下层胶配方			上层胶配方		
	Resolver A	Resolver B	APS	Stacker A	Stacker B	APS
0.75 mm	2.0 ml	2.0 ml	40 μ l	0.5 ml	0.5 ml	10 μ l
1.0 mm	2.7 ml	2.7 ml	60 μ l	0.75 ml	0.75 ml	15 μ l
1.5 mm	4.0 ml	4.0 ml	80 μ l	1.0 ml	1.0 ml	20 μ l

各组分在使用前请颠倒混匀 6 - 8 次。

- 下层胶配制：取等体积 Resolver A 和 Resolver B，各 2.0/2.7/4.0 ml，混匀。
- 上层胶配制：取等体积 Stacker A 和 Stacker B，各 0.5/0.75/1.0 ml，混匀。向步骤 2 的混合溶液中加入 40/60/80 μ l 的 APS，立即充分混匀，然后注入制胶玻璃板中，使液面距短玻璃板上沿约 1.5 cm。此溶液为过量，请勿全部注入。混匀操作避免剧烈振荡，在灌注的过程中避免将气泡灌入制胶玻璃板中。灌注下层胶后要在 3 min 内将上层胶注入制胶玻璃板中。如果觉得配制困难，也可选择灌制下层胶后用 ddH₂O 或醇封闭，待下层

胶凝固后再灌注上层胶。向步骤 3 的混合溶液中加入 10/15/20 μl 的 APS，立即充分混匀，无需等待下层胶凝固，即可将混匀后的溶液轻缓注入制胶玻璃板中，轻轻插入梳齿。灌注上层胶溶液可沿着长玻璃板轻缓注入，避免将下层胶冲散。

- c. 待胶凝固后(室温约 15 min)，拔去梳齿即可用于电泳。推荐电泳电压为 150-200 V，待溴酚蓝指示剂到达底部边缘时即可停止电泳。
- d. 请尽量使用新鲜配制的电泳缓冲液成层胶聚合后，小心拔去样品梳子，然后加入的电泳缓冲液。

(2) 上样

吸取适量样品上清加入样品孔中，在样品旁的孔中加入预染的蛋白 Marker，未添加样品上清的孔中，加入 1 \times loading buffer 保持胶面平衡。

(2) 电泳

打开电源，电压开始设置为 80V，当蛋白样品进入分离胶后，电压可提高到 150V。参照预染 Marker 的位置，待目的条带进入凝胶最佳分离区(大约凝胶的 2/3)时，停止电泳。

(3) 转膜

- a. 预先将转膜液 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷。
- b. 在托盘上打开转移盒，靠近阴极侧的内面铺上已经用转膜缓冲液浸湿的有孔维垫，其上放三层浸有转膜缓冲液的滤纸，注意排净气泡。
- c. 小心撬开玻璃板，将胶放置含有转膜液的托盘内，将含有目的条带的分离胶切下，用转膜液浸泡后置于滤纸上。
- d. 在凝胶上铺上经甲醇和转膜液浸湿的 PVDF 膜，胶和膜之间不能存有气泡，膜、滤纸和凝胶的大小，大致相同。
- e. 在 PVDF 膜上再放两层浸过转膜液的滤纸，注意排净气泡。
- f. 放上第二块海绵垫，使整个转印夹层依次形成“纤维垫-滤纸-凝胶-PVDF 膜-滤纸-纤维垫”层次，关闭转印夹，放入转移槽中，槽中灌满转膜液。
- g. 打开电源，稳流 300mA，40min。
- h. 转膜结束后，取出 PVDF 膜并作好标记，用 TBST 洗膜 7min \times 3 次。

4 免疫印迹

(1) 封闭、抗原抗体反应

- a. 将 PVDF 膜放入平皿中，加入无蛋白快速封闭液，摇床振荡 15-20min。
- b. 封闭结束后，用 TBST 洗膜 7min \times 3 次。



- c. 根据蛋白分子量对应位置裁剪出至少包括三条 Marker 的适量条带。
- d. 将剪裁好的条带放入含对应目的蛋白一抗(用 western 一抗稀释液稀释)的平皿中, 4°C 摇床振荡孵育过夜。
- e. 第二天取出, 室温振荡 30min, 吸弃一抗, TBST 洗 7min×3 次。
- f. 用 TBST 稀释二抗, 室温摇床振荡反应 1.5 h。
- g. 二抗反应结束后, 回收二抗。然后用 TBST 洗膜 7min×3。

(2) 显色

- a. 将 ECL 化学发光试剂盒中的 A、B 两种液体按 1: 1 等体积混合, 配置成工作液备用。
- b. 将 PVDF 膜从 PBS 中取出, 甩掉多余的液体, 将含有蛋白质的膜正面朝上, 放在保鲜膜, 滴加适量工作液, 用保鲜膜覆盖。
- c. 使用申花科技化学发光成像。

注: 本实验结果为不同目的蛋白对应条带的显影结果 TIF 图片, 并非包含完整 Marker 的结果。

5 图像分析

使用 SHST Analysis 软件对结果进行灰度分析。

仅供科研用途, 不可用于临床诊断!