

Western blot 标准操作流程

1. 目的

Western blot 采用的是聚丙烯酰胺凝胶电泳，被检测物是蛋白质，“探针”是抗体，“显色”用标记的二抗。经过 PAGE 分离的蛋白质样品，转移到固相载体（例如硝酸纤维素薄膜）上，固相载体以非共价键形式吸附蛋白质，且能保持电泳分离的多肽类型及其生物学活性不变。以固相载体上的蛋白质或多肽作为抗原，与对应的抗体起免疫反应，再与酶或同位素标记的第二抗体起反应，经过底色显色或放射自显影以检测电泳分离的特异性目的基因表达的蛋白成分。

2. 适用范围

对蛋白或抗体进行鉴定

3. 程序

3.4.1 实验仪器及材料

转膜用的夹子、两块海绵垫、两张滤纸、一张 NC/PVDF 膜、转膜槽、转移电泳仪、摇床、SDS-PAGE 胶、脱脂奶粉。

3.4.2 实验试剂

(1) 10% SDS 溶液：称取 SDS 10g，溶于 100mL ddH₂O 中。

(2) 10% AP：取 2ml 离心管，称取 0.1g 过硫酸铵至离心管中，溶于 1mL 无菌水，4℃ 保存，可用两周。

(3) 10×SDS-PAGE 电泳缓冲液：Tris-base 30.2g，Glycine 188 g，SDS 10 g，加入 1000 mL 去离子水，搅拌溶解，室温保存。

(4) 转膜缓冲液：Glycine 2.9g、甲醇 200mL，Tris 5.8g，SDS 0.37g，加 ddH₂O 定容至 1000mL。

(5) 1×TBS 缓冲液：NaCl 8g，KCl 0.2g、Tris base 3g 加 ddH₂O 800mL，调节 pH 至 7.4，最后加 ddH₂O 定容到 1000ml。

(6) TBST：1×TBS 中加入 0.1% 的 Tween20，备用。

(7) 封闭液：5% 脱脂奶粉，即 5g 脱脂奶粉溶于 100ml TBST。

(8) 抗体稀释液：含有 5% 脱脂奶粉的 TBST。一抗根据需要进行稀释；二抗常用稀释比例为 1 :5000。

(9) 洗涤液：TBST 溶液。

3.4.3 实验步骤

3.4.3.1 样品处理

3.4.3.1.1 培养的细胞

- (1) 去掉培养基后用常温 PBS 冲洗 2-3 遍。
- (2) 将细胞刮取并收集到 EP 管中，加入细胞裂解液 RIPA（添加终浓度为 0.1mmol PMSF）， 1×10^7 个细胞加入 500ul 的 RIPA。
- (3) 4℃裂解 30min，12000rpm，4℃离心 10min。
- (4) 小心收取离心后的细胞上清，-80℃保存备用。
- (5) 加入上样 loading buffer，混合后沸水中煮或 98℃煮样，10min。 -20℃保存备用。

3.4.3.1.2 组织

- (1) 心肝脾肾等组织可按每 50-100mg 加入 1ml 裂解液，肺 100-200mg 加入裂解液，冰上快速进行匀浆。
- (2) 4℃裂解 30min，12000rpm，4℃离心 10min。
- (3) 小心收取离心后的上清，-80℃保存备用。
- (4) 加入上样 loading buffer，混合后沸水中煮或 98℃煮样，10min。 -20℃保存备用。

3.4.3.2 SDS-PAGE 电泳

制胶：一块胶按 10mL 配，但最终加 7.3mL 即可。开始将胶架按正确方式组装，水平放置，且用力均匀，夹紧后，加二级水检漏。参照配方表加样，混匀后，加样到模具中，加入 1mL 异丙醇压平，室温放置 1h 左右，待胶凝固，将异丙醇倒掉，用二级水冲洗，开始加浓缩胶。浓缩胶按照 2mL/块配置，最终加 1.5mL/块。轻轻插上梳子，平的一面靠外侧，放置干，直接加入跑胶槽。

加样：将整个电泳架放入电泳槽，在内槽中倒入电泳缓冲液 1×Running buffer，淹没样品孔。轻轻拔掉梳子，并用注射器冲洗孔道，注意看有没有被扯歪的孔，如有，用注射器头轻轻拨正，开始上样，10μL/孔(15孔梳子)，marker 5μL/孔。

接通电源开始电泳。（注意上样时不要让样品扩散）

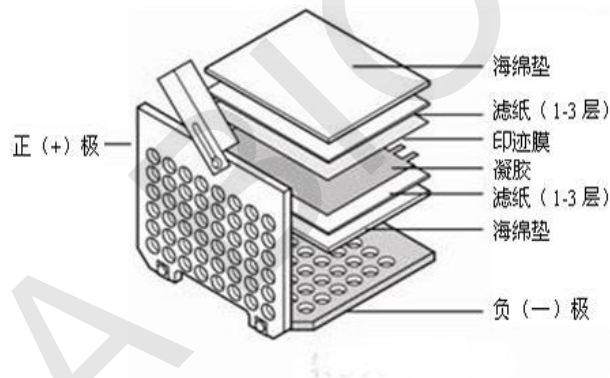
电泳：U=180 伏，50-60 min。

3.4.3.3 转膜

电泳完毕后取下SDS-PAGE胶，放到转膜缓冲液中，制作转膜“夹心”：打开电转印夹，每侧垫上一块专用的用转膜液浸泡透的海绵垫，再各放三张转膜液浸透的滤纸，将凝胶平放在阴极侧滤纸上，最后将硝酸纤维素NC膜平放在凝胶上，去除气泡，夹好电转印夹，注意NC膜与胶，印迹膜与转移垫，转移垫与胶之间不能有气泡。

转印槽加满转膜缓冲液，插入电转印夹，将转印槽放入冰浴中，连接好电极，接通电流，转印夹内的NC膜应对转印槽的正极。转膜选择恒流，建议电流为150-300mA,时间依据胶的浓度适当调整，一般为1-1.5h。

Marker用Thermo的，转膜结束后观测到膜上有完整的Marker条带则转膜成功



3.4.3.4 封闭

转膜完成后，膜上其他没有结合蛋白质的空白位置需要用封闭液加以封闭，以避免一抗或二抗非特异性结合。将NC膜置于封闭液中，室温封闭1-2h或4℃过夜封闭。

3.4.3.5 孵育一抗

将抗体用抗体稀释液进行稀释，室温孵育2h或4℃过夜反应。封闭完成后用洗涤液洗膜5min×3次。

3.2.3.7 孵育二抗

选取适合与一抗反应的二抗（如一抗为兔源的，二抗应为抗兔的二抗）稀释完后室温孵育40min。洗涤缓冲液洗膜3次，每次10min。

3.2.3.8 化学发光成像

根据化学发光试剂盒的操作进行发光成像，记录曝光时间及结果进行分析整理。

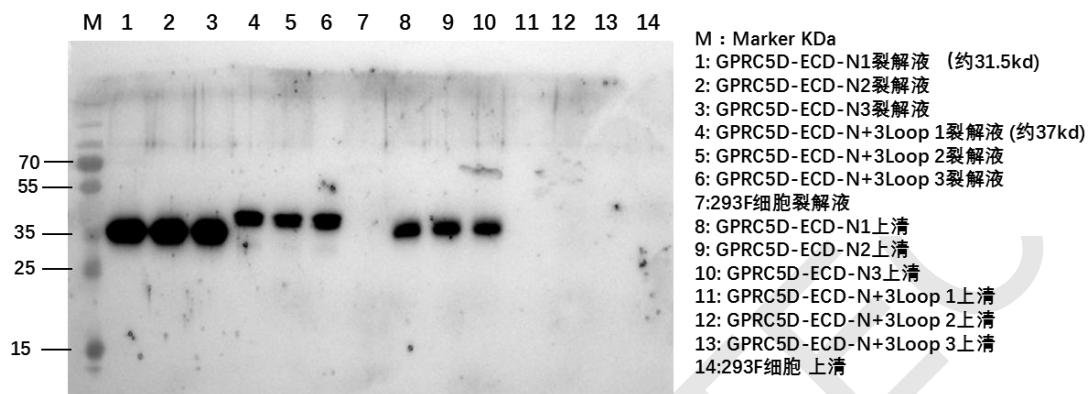


图 1 western blot 实验结果示范
 实验流程图

