

Western Blot 检测

一、实验试剂:

1. 1M Tris pH 8.8
2. 1M Tris pH 6.8
3. 10% SDS
4. 10% APS
5. 30% Acrylamide
6. TEMED
7. Tween-20
8. 100% methanol
9. RIPA buffer
10. 1×PBST
11. 1×Transfer Buffer
12. 1×SDS-PAGE Running buffer
13. 5×Loading Buffer
14. 5% Fat free milk
15. BCA kit
16. ECL kit
17. 一抗
18. 二抗
19. 蛋白 Marker

二、实验步骤:

(一) 样品准备 (以从细胞提取蛋白为例)

1. 取出长满细胞的培养皿, 吸弃培养液, 冷 PBS 洗涤 2 次, 吸弃。
2. 加入 RIPA , 覆盖平皿即可, 冰上放置 30min。
3. 转移至 1.5ml 离心管中。
4. 4℃, 15000g 离心 15min。
5. 取上清液分装, 低温保存。另取少量上清液测蛋白含量。
6. 定蛋白及计算上样量 (BCA 法, 如用碧云天蛋白测定试剂盒)。

- (1) 预先准备 BCA 工作液
- (2) 完全溶解蛋白标准品 (5mg/ml), 使终浓度为 0.5mg/ml。
- (3) 测样品浓度

将样品适当稀释。

在 96 板操作:

标准品 (μl)	0	1	2	4	8	12	16	20
H ₂ O (μl)	20	19	18	16	12	8	4	0

样品液则每孔加 20μl。

在每孔中加入 200μl 工作液。37℃, 孵育 30 分钟, λ=562nm 比色。

根据标准管以及样品 OD 值, 得出稀释蛋白含量。

- (4) 计算上样量

求出样品的实际蛋白含量, 求得在 25μl 总体积中的样品体积, 保证每个样品的浓度一致 (如: 为 20μg)。

(二) 电泳

1. 安装电泳装置。
2. 配 10% 的分离胶, 灌胶约 2/3 体积, 用蒸馏水液封。
3. 待凝后倾去蒸馏水。
4. 配 4% 的堆积胶, 灌胶至平板顶部, 插入梳子。

配方如下 (1.0mm 玻璃板为例):

	10% Running gel 分离胶		4% Stacking gel 堆积胶	
	4 块胶	2 块胶	4 块胶	2 块胶
ddH ₂ O	5.4 ml	2.7ml	7.36 ml	3.68ml
1M Tris	pH 8.8 7.5 ml	pH 8.8 3.75 ml	pH 6.8 1.25 ml	pH 6.8 0.625 ml
10% SDS	200 μl	100μl	100 μl	50μ

30% Acrylamide	6.7 ml	3.35ml	1.33 ml	0.665ml
10% Aps	200 μl	100μl	50 μl	25μl
TEMED	10 μl	5μl	10 μl	5μl

待凝后，拔出梳子，倒入电泳缓冲液。

5.样品前处理：匀浆液，取上样量（由定蛋白计算所得）再加 1/5 总体积的 Loading Buffer（5 \times LB，5 μ l），最后用 PBS 补齐至总体积相等（25 μ l）。混匀后 95 $^{\circ}$ C 煮 5min-10min。

6.上样，接通电源，100V 电泳，当指示剂到达平板底端的时候停止电泳。

7.准备 3 个平皿，一个装甲醇，一个装去离子水，另一装转移缓冲液。

8.取下胶，并将其浸入转移缓冲液中约 15 min。

9.裁剪 PVDF 膜，将其浸入甲醇中约 10 秒，浸泡于去离子水中约 5 分钟，再放入转移缓冲液中，裁剪滤纸，预先浸泡在转移缓冲液中；海绵预先浸泡在转移缓冲液中。

10.按顺序安装好转膜装置并完全排除气泡，4 $^{\circ}$ C（或者冰浴条件），350mA 恒流转膜 60min。

11.倾去转膜缓冲液，拆除转膜装置。取出膜。

12.将 PVDF 膜放入丽春红中摇床染色约 5min，用铅笔标出 Marker 位置，再用去离子水震荡以去除浮色。在上角剪去一角以辨上下左右。

（注：用预染的 Marker，则可以通过 Marker 的转移条带进行转膜成功与否的判断，不需要用丽春红染色）

13.PBST 洗膜 5 分钟

14.将膜转移至另一容器中，用 5%脱脂奶粉封闭 1h。

（三）一抗孵育

1.配一抗。

2.滴加一抗于 Parafilm 膜，将膜小心覆盖于一抗上。或者将膜转移至尽可能小的容器（如灌入蜡的平皿）中并加入稀释的一抗。37 $^{\circ}$ C 摇床孵育约 2h，或者 4 $^{\circ}$ C 过夜。

(四) 二抗孵育与显色

- 1.用 1 ×PBST 洗涤 4 次，每次 10 分钟（Or : 6 次,每次 5min）。
- 2.配二抗：
3. 滴加二抗于小盒中，膜置入小盒内。 室温孵育 60min。
- 4.用 1 ×PBST 洗涤 4 次，每次 10 分钟（OR:洗涤 6 次,每次 5min）。
- 5.准备 ECL 化学发光显色剂。
- 6.将膜从 PBST 中取出，用吸水纸稍吸干膜，滴加 ECL 显色液。
- 7.扫描及分析（可用凝胶图像分析系统进行）。