

免疫印迹 (Western Blot)

溶液和试剂配制

- 1×PBS缓冲液：用PBS粉末和ddH₂O配成。
- 1×TBST缓冲液：用TBS粉末和ddH₂O配制TBS缓冲液，再按1 mL Tween-20/1L TBS的比例，向TBS缓冲液中加入Tween-20，搅拌至完全溶解。
- 5×电泳缓冲液：称取15.1、94和5 g的Tris、甘氨酸和SDS，加ddH₂O，搅拌至溶质溶解。加ddH₂O定容至1 L，摇晃混匀即可。室温存储。使用前，用ddH₂O将其稀释成1×电泳液。
- 1×转膜缓冲液：称取3 g Tris、14.4 g甘氨酸，加入800 mL ddH₂O，摇晃使溶质溶解，再加200 mL甲醇，摇晃混匀即可。4℃保存。
- 封闭液：即5% BSA。称取0.5 g BSA粉末，加入10 mL PBST溶液，充分涡旋混匀。现用现配。
- 5×SDS上样缓冲液：称取0.606 g Tris，加5 mL ddH₂O溶解，用1 M HCl调pH至6.8。加入1 g SDS，搅拌至完全溶解，再加入5 mL甘油和0.002 g 溴酚蓝，充分混匀，用ddH₂O定容至10 mL，分装成1 mL/管，-20℃存储。使用前每管加入100 μL β-巯基乙醇。

实验操作流程

A. 蛋白样品制备：

1、贴壁细胞蛋白提取：

- (1) 吸除旧培养基，加PBS洗涤细胞，吸除废液。重复洗涤1次。
- (2) 向每孔加入50 μL 细胞裂解液（含蛋白酶抑制剂）和50 μL 1×SDS上样缓冲液，静置1-2 min。
- (3) 用细胞刮刮取贴壁细胞，将细胞收集至1.5 mL EP管（置于冰上）。
- (4) 冰上裂解20 min，隔5 min涡旋一次，每次涡旋30 s。
- (5) 将EP管放在金属浴中，100℃煮10 min。
- (6) 待EP管冷却后，以13000 rpm、4℃离心12 min。吸取上清液，-20℃储存。

2、悬浮细胞蛋白提取：

- (1) 吸取细胞悬液至1.5 mL EP管，4000 rpm离心3 min，弃废液。
- (2) 加入1 mL PBS以洗涤细胞，4000 rpm、4℃离心3 min，弃废液。重复洗涤1次。
- (3) 加入100 μL细胞裂解液（含蛋白酶抑制剂），冰上裂解30 min，隔5 min涡旋一次。
- (4) 用超声破碎仪破碎细胞，操作时将探头保持在液面以下，每次超声时长按按钮3 s，每管超声15-20次。
- (5) 以13000 rpm、4℃离心13 min，收集上清液，加入1/4倍上清液体积的5×SDS上样缓冲液，并吹打混匀。
- (6) 将EP管放进金属浴中，100℃煮10 min。待EP管冷却，转移至-20℃储存。

B. SDS-PAGE凝胶配制：

- 1、凝胶的下层为分离胶，上层为浓缩胶。首先配制分离胶溶液，倒入胶板中，吸取无水乙醇或ddH₂O加入以压平分离胶液面，静置30-40 min。
- 2、待分离胶凝固后，倒去上层无水乙醇或ddH₂O，加入浓缩胶溶液，并插入胶梳，静置15-20 min。待浓缩胶凝固，即配制完成。配好的凝胶若不立即使用，可泡在ddH₂O中，4℃下可保存1-2周。



注：在配制凝胶前，需要根据目的蛋白的分子量大小选择适合的分离胶浓度，浓缩胶浓度通常选用5%。分离胶浓度对应的分离范围，以及凝胶配方如下：

分离胶浓度	蛋白分子量范围(KDa)
6%	50-300
8%	30-200
10%	20-100
12%	12-60
15%	5-40

表1 不同分离胶浓度所适合分离的蛋白分子量范围

组分	6%	8%	10%	12%	15%
30% Acr-Bis (mL)	2.0	2.7	3.3	4.0	5.0
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) (mL)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
10% SDS (μL)	100	100	100	100	100
10% APS (μL)	100	100	100	100	100
TEMED (μL)	10	10	10	10	6
ddH ₂ O (mL)	5.3	4.6	4.0	3.3	2.3

表2 不同浓度的分离胶配方 (10 mL体系)

组分	用量
30% Acr-Bis (mL)	0.67
1.0 M Tris-HCl (pH 6.8) (mL)	0.5
10% SDS (μL)	50
10% APS (μL)	50
TEMED (μL)	5
ddH ₂ O (mL)	3.73

表3 5%浓缩胶配方 (4 mL体系)

C. 电泳：蛋白上样，每孔上10-40 μg蛋白样品为宜。先用80 V恒压运行30 min，待溴酚蓝条带进入分离胶后，再用120 V恒压运行约1 h。

D. 转膜：将PVDF膜放在甲醇中浸泡约5 min，然后转移到转膜液中以平衡膜。转膜夹黑色面向下，向其上依次放海绵、滤纸、胶、膜、滤纸、海绵。将组装好的转膜夹放进转膜槽中，加入冰盒，往槽中加转膜液至刚好没过转膜夹，将转膜槽放到冰块之中。200 mA恒流运行约80 min。

E. 封闭：将与凝胶接触的那一面膜朝上，浸泡在封闭液中，室温在摇床上孵育1 h。用TBST缓冲液洗涤3次，每次5 min。

F. 一抗孵育：配制一抗稀释液（抗体稀释度可参考产品网站）。将膜置于一抗稀释液中，在摇床上4℃孵育过夜，或室温孵育2.5 h。用TBST缓冲液洗涤3次，每次5 min。

G. 二抗孵育：选择识别一抗来源种属的HRP偶联二抗，配制适宜浓度的二抗稀释液（抗体稀释度可参考产品网站）。膜置于二抗稀释液中，在摇床上室温孵育1 h。用TBST缓冲液洗涤3次，每次5 min。

H. 显影：配制ECL化学发光检测工作液，将发光工作液滴加到膜表面，用显影仪对蛋白条带进行显影。



实验注意事项

1. 转膜条件应视目标蛋白分子量大小而调整。200 mA恒流、80 min的转膜条件适用于分子量为30-150 kDa的蛋白。若要转印大分子蛋白，应增大电流或延长转膜时间，转印小分子蛋白，应减小电流或缩短转膜时间。
2. 当目标蛋白过大或过小时，一般条件下常用的蛋白质分子量Marker和内参蛋白 (β -actin、GAPDH) 难以被转印到膜上，应提前更换合适的Marker和内参蛋白 (如Histone H3、 α -Tubulin)。
3. 根据待检测蛋白的分子量大小来选择合适的孔径的PVDF膜。若待测蛋白分子量<20 kDa，应选择0.1 μ m膜；20-50 kDa，选择0.22 μ m膜；>50 kDa，选择0.45 μ m膜。

实验相关产品推荐

A. 细胞裂解液：

- 1、RIPA Lysis Buffer (Strong), C0045
- 2、RIPA Lysis Buffer (Medium), C0046
- 3、RIPA Lysis Buffer (Weak), C0047

B. 蛋白酶抑制剂：

- 1、Protease Inhibitor Cocktail (EDTA-Free, 100 $\times$ in DMSO), C0001
- 2、Protease Inhibitor Cocktail, MS-safe (10 $\times$), C0055
- 3、Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail, MS-safe (10 $\times$), C0057

C. 抗体网站：<https://www.targetmol.cn/all-antibodies>

D. BCA蛋白浓度测定试剂盒 BCA Protein Quantification Kit, C0050

E. Tween 20, T9526

F. 牛血清白蛋白 (BSA), T5664

