

湖北百奥斯 (Biossci) 生物科技有限公司
武汉长衍病理科技有限公司

Western blot 实验报告

一、实验器材及试剂

1、实验器材

名称	厂家	型号
电源	北京六一	DYY-6C
迷你电泳槽	北京六一	DYZC-24DN
转膜芯	北京六一	DYZC-40D
PVDF 膜	Millipore Cat	IPVH00010
滤纸	Whatman	3MM CHR
高速冷冻型离心机	SCILOGEX	D3024R
酶标仪	深圳雷杜	RT-6100
荧光化学发光凝胶成像系统	上海勤翔科学仪器有限公司	3300 Mini
组织冷冻研磨仪	上海净信	JXCL-3K
研磨珠	上海净信	JX-YG0123
研磨珠	上海净信	JX-YG0124
研磨珠	上海净信	JX-YG0125

2、主要试剂及货号

名称	厂家	货号
丙烯酰胺	Sigma	V900845
甲叉丙烯酰胺	Sigma	V900301
Tris-Base	Sigma	V900483
SDS	Amresco	#0227
甘氨酸 Glycine	Sigma	V900144
过硫酸铵	上海国药	10002618
TEMED	Amresco	0761
PMSF	Amresco	0754

湖北省武汉市江宁区江兴路18号2号楼第5、6层

Tel: 400 118 0100

Website: www.biossci.com

Fax: +86-027-87382710

E-mail: support@biossci.com

湖北百奥斯 (Biossci) 生物科技有限公司
武汉长衍病理科技有限公司

名称	厂家	货号
PageRuler prestained protein ladder	Thermo Fisher	26616
PageRuler prestained protein ladder	Thermo Fisher	26619
Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail	Thermo Fisher	78440
ECL	碧云天	P0018
脱脂奶粉	伊利	
TBS 缓冲盐粉	湖北百奥斯生物科技有限公司	BP0152
吐温 20	上海国药	30189328
BSA	solarbio	A8020
BCA 蛋白定量	艾德来	PP0102
RIPA 裂解液	碧云天	P0013B
Rabbit Anti Goat IgG/HRP	Earthox	E030130
Goat Anti Rabbit IgG/HRP	ptgen	SA00001-2
Goat Anti Mouse IgG/HRP	ptgen	SA00001-1
Goat Anti Rat IgG/HRP		

3、试剂配方

(1) 5%积层胶所用溶液 (按总体积 2.5ml)

溶液	体积
ddH ₂ O	1.7ml

湖北百奥斯 (Biossci) 生物科技有限公司
武汉长衍病理科技有限公司

溶液	体积
30% acrylamide (29: 1)	0.42ml
1.0mol/L Tris (PH=6.8)	0.315ml
10%SDS	25μl
10%AP	25μl
TEMED	3μl

(2) 分离胶溶液配方参考表

各种组份名称	各种凝胶体积所对应的各种组份的取样量							
	5 ml	10 ml	15 ml	20 ml	25 ml	30 ml	40 ml	50 ml
6% Gel								
H ₂ O	2.6	5.3	7.9	10.6	13.2	15.9	21.2	26.5
30% Acrylamide	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	8.0	10.0
1.5 M Tris-HCl (pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% 过硫酸铵	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.004	0.008	0.012	0.016	0.02	0.024	0.032	0.04
8% Gel								
H ₂ O	2.3	4.6	6.9	9.3	11.5	13.9	18.5	23.2
30% Acrylamide	1.3	2.7	4.0	5.3	6.7	8.0	10.7	13.3
1.5 M Tris-HCl (pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% 过硫酸铵	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.003	0.006	0.009	0.012	0.015	0.018	0.024	0.03
10% Gel								
H ₂ O	1.9	4.0	5.9	7.9	9.9	11.9	15.9	19.8
30% Acrylamide	1.7	3.3	5.0	6.7	8.3	10.0	13.3	16.7
1.5 M Tris-HCl (pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% 过硫酸铵	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
12% Gel								
H ₂ O	1.6	3.3	4.9	6.6	8.2	9.9	13.2	16.5
30% Acrylamide	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0	12.0	16.0	20.0
1.5 M Tris-HCl (pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% 过硫酸铵	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
15% Gel								
H ₂ O	1.1	2.3	3.4	4.6	5.7	6.9	9.2	11.5
30% Acrylamide	2.5	5.0	7.5	10.0	12.5	15.0	20.0	25.0
1.5 M Tris-HCl (pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% 过硫酸铵	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02

(3) 电泳缓冲液, 1L

3g Tris-Base、14.4g 甘氨酸、1g SDS, 加蒸馏水至 1L。

(4) 电泳转移缓冲液, 1L

3g Tris-Base、14.4g 甘氨酸、甲醇 200ml, 加蒸馏水至 1L。

(5) 5×样品缓冲液, 10ml

0.6ml 1mol/L 的 Tris-HCl (Ph6.8)、5ml 50%的甘油、2ml 10%的 SDS、0.5ml 2-

湖北百奥斯 (Biossci) 生物科技有限公司
武汉长衍病理科技有限公司

巯基乙醇、1ml 1%溴酚蓝, 0.9ml 的蒸馏水, 可在 4℃保存数周, 或在-20℃保存数月。

二、蛋白提取（根据样品及检测要求选取适当提取方法）

组织样本

- 1、组织块剪成小块置于匀浆管中, 加入 1-3 个匀浆珠, 加入 5-10 倍组织体积的裂解液（使用前数分钟内加入蛋白酶抑制剂）, 设置匀浆程序进行匀浆。
- 2、将匀浆完成的匀浆管取出, 放置冰上裂解液 30min, 每隔 5min 震荡一次确保组织完全裂解。
- 3、10000rpm, 4℃离心 10min, 取适量上清置于新的 1.5ml 离心管中, -80℃保存。

细胞样本

- 1、弃去培养基, 用预冷 PBS 清洗细胞, 加入总蛋白提取液, 充分吹打, 然后冰上放置 10~20min 后, 将匀浆液吸出放到 1.5ml 离心管中。
- 2、10000rpm, 4℃离心 10min, 取适量上清置于新的 1.5ml 离心管中, 80℃保存。

三、蛋白浓度测定

- 1、采用 BCA 法测定浓度。
- 2、操作步骤:

标准曲线的绘制: 取一块酶标板, 按照下表加入试剂:

孔号	0	1	2	3	4	5	6	7
蛋白质溶液 (μl)	0	1	2	4	8	12	16	20
去离子水 (μl)	20	19	18	16	12	8	4	0
相应蛋白质含量 (μg)	0	0.5	1	2	4	6	8	10

- 3、样品浓度测定, 1μl 待测蛋白和 19μl 0.9%生理盐水。
- 4、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。

湖北百奥斯 (Biossci) 生物科技有限公司
武汉长衍病理科技有限公司

- 5、各孔加入 200 μ l BCA 工作液。
- 6、把酶标板放置 37 $^{\circ}$ C 30 分钟，然后在 562nm 下比色测定。以蛋白含量 (μ g) 为纵坐标，吸光值为横坐标，绘出标准曲线。
- 7、根据所测样品的吸光值，在标准曲线上即可查得相应的蛋白含量。

四、SDS-PAGE 电泳

- 1、将抗原（组织/细胞裂解液）样品体积：5 $\times$ loading buffer 体积=4：1，混匀，在 100 $^{\circ}$ C 加热 5 分钟以使蛋白质变性。
- 2、设计加样顺序，作好实验记录，按预定顺序加样。蛋白质量（蛋白质混合物）：40 μ g。
- 3、把电泳装置与电源连接好，将电压调至 100V，电流应流向阳极，待溴酚蓝迁移到分离胶底部 0.5cm 处，关闭电源。
- 4、从电泳装置上卸下凝胶玻璃板，用去离子水冲洗干净。准备进行免疫印操作。

五、免疫印迹操作-转膜

- 1、将凝胶玻璃板置于盛有电泳转移缓冲液的容器中。
- 2、戴上手套，裁剪好滤纸（Whatman, 3MM CHR）和 PVDF 膜，滤纸和膜大小为 83mm $\times$ 75mm，尽量避免污染滤纸和膜，将裁减好的滤纸和活化好的 PVDF 膜浸泡与电泳转移缓冲液中。
- 3、打开转移盒并放置浅盘中，用转移缓冲液将海绵垫完全浸透后将其放在转移盒壁上，海绵上再放置一张浸湿的 Whatman, 3MM 滤纸。
- 4、小心将凝胶放置于滤纸上，避免气泡。
- 5、将另一块海绵用转移缓冲液浸透后放在凝胶-膜“三明治”上，关上转移盒并插入转移槽。
- 6、将冰盒装入缓冲液槽，注满 4 $^{\circ}$ C 预冷的转移缓冲液。
- 7、连接好转移电极恒流 300mA 转移 90min。
- 8、电转完毕后，将电转膜置于 5% 的脱脂奶粉（TBST 配制）中封闭，磷酸化指标用 5% 的 BSA（TBST 配制）封闭，37 $^{\circ}$ C 1 小时。

六、免疫检测

一抗与靶蛋白的结合

- 1、封闭的膜用 TBST 漂洗 2 次。
- 2、将加样槽洗涤干净，用蒸馏水润洗，晾干，将膜用一次性手套覆盖好，按标记和实验设计切下膜条按顺序置于加样槽中，作好实验记录，加入相应的一抗。
- 3、一抗孵育 4℃过夜。
- 4、弃去一抗，膜条仍置于加样槽，每个槽加 2-3 ml TBST，上摇床洗涤洗涤 5min，换液，反复 4 次。

酶标记二抗与一抗的结合

- 1、根据实验需要和设计选择合适的酶标二抗和稀释浓度 (TBST 稀释)，每个加样槽中加入二抗室温下于摇床孵育 1h，注意保证膜的所有部分同溶液接触。
- 2、弃去二抗，膜条仍置于加样槽，每个槽加 2-3 ml TBST，上摇床洗涤洗涤 5min，换液，反复 4 次。

七、化学发光

将膜吸去多余 TBST，将膜浸入配制好的 ECL 中，室温下孵育 1 分钟并轻轻摇动。将膜取出并吸走多余的反应底物 (但不要使它晾干)，包在保鲜膜中然后将膜放入荧光化学发光凝胶成像系统，成像得到图片。