

蛋白质免疫印迹法 (WB)

一、 试剂准备：

1.5 M Tris, pH 8.8 (VWR, VWRC0497) :

181.7 g Tris

800 mL 去离子水充分溶解后

浓 HCl 调 pH 至 8.8

加去离子水定容至 1 L, 过滤除菌后室温保存。

1.0 M Tris, pH 6.8 (VWR, VWRC0497) :

121.14 g Tris

800 mL 去离子水充分溶解后

浓 HCl 调 pH 至 6.8

加去离子水定容至 1 L, 过滤除菌后室温保存。

10% SDS:

10 g SDS

80 mL 去离子水 68°C 加热溶解后

加去离子水定容至 100 mL, 室温保存。

30% 丙烯酰胺 (Acrylamide) :

290 g Acrylamide

10 g Bis

加离子水定容至 1 L, 4°C 避光保存。

10% 过硫酸铵 (APS) :

1 g 过硫酸铵

10 mL 去离子水, 4°C 保存。

1.0 M Tris pH 8.0 (VWR, VWRC0497) :

121.14 g Tris

800 mL 去离子水充分溶解后

浓 HCl 调 pH 至 8.0

加去离子水定容至 1 L, 过滤除菌后室温保存。

5 M NaCl :

292.2 g NaCl

800 mL 去离子水充分溶解后

加去离子水定容至 1 L, 过滤除菌后室温保存。

10×TBS (500 mL) :

150 mL 5 M NaCl

100 mL 1 M Tris-HCl (PH 8.0)

250 mL 去离子水。

5×Running Buffer:

15.1 g Tris

94 g Glycine

5.0 g SDS

加去离子水定容至 1 L, 常温保存。

5×Loading Buffer:

1.25 mL 1 M Tris-HCl (PH 6.8)

0.5 g SDS

25 mg 溴酚蓝

2.5 mL 甘油

250 μL β-巯基乙醇

加去离子水定容至 5 mL, 500 μL 分装至 EP 管, -20°C 保存。

1X Running Buffer:

200 mL 5×running buffer

加去离子水定容至 1 L。

1X Transfer Buffer:

100 mL 5×running buffer

200 mL 甲醇

加去离子水定容至 1 L。

5% 牛奶封闭液:

100 mL 1X TBS

5 g 脱脂牛奶

200 μL TWEEN-20

磁力搅拌器上混匀。

TEMED (Sigma, T7024)

Western 免疫印迹细胞裂解液 (Beyotime, P0013)。

PMSF 100X (碧云天, P0013)

蛋白酶抑制剂 (PI 100X, Millipore)

BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (Beyotime, P0012)

超敏 ECL 化学发光试剂盒 (Beyotime, P0018)

PVDF 膜 (milipore, ISEQ00010)

PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo)

二、实验方法：

1) 蛋白样品的制备

- a. 收细胞，用 PBS 洗一次，将装有细胞沉淀的 EP 管置于冰上。
- b. 加入适量的细胞裂解液（含有 1X PI 和 1X PMSF），使用移液器反复吹打细胞。
- c. 超声破碎，30 sec ON, 30 sec OFF。（Option）
- d. 4 °C 12,000 g 离心 10 min，将上清转移至干净的 EP 管中，放在冰上待用。

2) 蛋白浓度测定

- a. 稀释标准样品：0.1% BSA (1 µg/µL) 按照 0、2、4、8、12、16、20 µL 加入到 7 个 EP 管中，分别加入 ddH₂O 补足至 20 µL。
- b. 稀释蛋白样品：取 2 µL 蛋白样品加入到 18 µL 的 ddH₂O 中。
- c. 按照所需量将 BCA 试剂 A 与试剂 B 按照 50:1 混合均匀，每管加入 200 µL，置于 37°C 反应 30 min。
- d. 使用酶标仪测量 550 波长吸收值，BSA 为 0 的样品作为空白对照。
- e. 绘制标准曲线，根据标准曲线计算蛋白样品的浓度。

3) SDS-PAGE 电泳

- a. 清洗玻璃板，自然风干后，将配胶装置安装好待用。（边缘加点水有助于玻璃板之间的贴合）
- b. 配制合适浓度的分离胶，上层加水封胶。
- c. 约 20 min 后，待分离胶完全凝固后，配制浓缩胶。
- d. 将上层水倒干净后，加入浓缩胶，并插入梳子，室温静置。
- e. 待浓缩胶凝固后，将胶板从配胶架上取下移入电泳槽中，加入 1×Running Buffer，垂直拔出梳子。
- f. 加入少许 1×Loading buffer 便于看清胶孔，用移液器吹打清理胶孔。
- g. 向蛋白样品中加入 5×Loading buffer，混匀后置于 95°C 金属浴变性处理 5 min。
- h. 根据浓度计算等量的样品所需体积，按照计算的体积上样。
- i. 加入蛋白 Marker，并用 1×Loading Buffer 将各个胶孔的样品大概补齐。

- j. 盖上电泳槽盖子，调节电泳仪恒流（15 A 一块胶， 25 A 两块胶），开始电泳。
- k. 约 30 min 后，待样品进入分离胶中，调节电泳仪恒流（30 A 一块胶， 50 A 两块胶），继续电泳。
- l. 约 1 h 后，电泳至蓝色条带接近分离胶下边缘，停止电泳。

4) 转膜

- a. 将滤纸，海绵浸入 1× Transfer Buffer 中平衡。
- b. 将 PVDF 膜浸入甲醇中进行激活。
- c. 取出玻璃板，将浓缩胶去除后，取下分离胶按照（黑色面）海绵-三层滤纸-分离胶-PVDF 膜-三层滤纸-海绵（透明面）顺序自下而上安装好，即胶靠近负极，膜靠近正极，避免气泡产生。
- d. 将安装好的分离胶转移至转膜槽中，注意正负极的摆放，加入 1× Transfer Buffer，侧面放好冰袋，盖好盖子，调节电泳仪恒压（90 V）进行转膜。
- e. 周围加足够冰来进行降温，根据目的蛋白大小选择合适的转膜时间（分子量小于 100 kD 的蛋白转膜 1.5 h）。

5) 封闭

- a. 将膜取下后，根据目的蛋白的大小，按照蛋白 Maker 条带进行裁剪。（可整张膜进行封闭，随后再裁剪）
- b. 将裁剪后的膜置于牛奶封闭液中孵育，室温摇床上低速封闭 2 h。

6) 弃牛奶封闭液，加入用牛奶封闭液稀释的一抗进行孵育，具体时间根据所用抗体来定。（4℃过夜/室温 2h）

7) 将膜从一抗中取出，用 1X TBS 洗三次，每次 5 min。加入牛奶封闭液稀释的二抗进行孵育，室温孵育 2 h。

8) 将膜取出，用 1X TBS 洗 6 次，每次 5 min。

9) 将 ECL 试剂的 A 和 B 等体积混合后，加到膜上避光反应 5 min。

10) 使用压片/自动化学光学成像系统进行条带信息采集。