项目结题报告

项目名称：Western\_Blot蛋白质印迹实验

# 仪器与试剂

## 实验仪器

## 实验试剂

# 实验方法和分组

## 实验方法

实验原理：

蛋白质免疫印迹分析（Western Blot Analysis）是通过SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳将待测样品中的蛋白质按分子量大小在凝胶中分离，随后把凝胶中分离的蛋白质转移至固相支撑物（eg.NC或PVDF膜），最后用特异性抗体检测出已经印迹在膜上的所要研究的相应抗原 。免疫检测分为直接法和间接法，WB目前多用间接酶标法。以固相支撑物的蛋白质作为抗原，特异性第一抗体与之杂交结合后，用酶标第二抗体（碱性磷酸酶AP或辣根过氧化物酶HRP标记的抗第一抗体的抗体）与第一抗体杂交结合，以酶的底物显色或用化学发光液（ECL）曝光目的蛋白条带，进而对目的蛋白表达进行定性半定量检测。

实验方法：

1. 细胞蛋白提取：

（1）将细胞样品用4℃预冷的PBS清洗2次后，加入蛋白裂解液（含1%-2%蛋白酶抑制剂）。

（2）冰上裂解15-30 min后，用细胞刮刀刮下，并收集于EP管中，而后用超声波细胞破。

2. 碎仪破碎细胞；

（1）在4℃下，15000 rpm，离心30 min，取上清用BCA法测定细胞浓度。

（2）用裂解液将各样品蛋白浓度调成一致，按比例加上样缓冲液后，高温变性后-80℃保存。

3. SDS-PAGE：

（1）制胶：根据目的蛋白分子量大小配制不同凝胶。

（2） 上样：胶凝固后，拔去梳子，用电泳缓冲液清洗上样孔后，加蛋白样品和蛋白Marker。

（3）电泳。

4. 免疫印迹（湿转）：

（1）电泳后，用转膜仪在低温环境下将凝胶中蛋白转移至固相支撑物上。

5. 抗体杂交：

（1）封闭：5%-10%的脱脂牛奶（PBST或TBST溶解）封闭，室温封闭1 h或4℃过夜。

（2）一抗孵育：将第一抗体用稀释液稀释到适当的浓度，在摇床上室温孵育2 h或4℃过夜，用PBST或者TBST洗膜5×5 min。

（3）二抗孵育：将第二抗体用稀释液稀释到适当的浓度，在摇床上室温孵育2 h，用PBST或TBST洗膜3×10 min。

6. 免疫显色（化学发光分析仪）：

（1）将转移膜平铺于化学发光成像仪的暗室平台，将配好的化学发光液均匀的滴在转移膜上。

（2）根据目的蛋白的丰度调整曝光时间。

注：此操作为WB检测蛋白表达的通用操作，仅供参考。

## 实验分组

# 实验结果