

Western blot 实验（其实是孙师姐总结的，最为详细！）

1. 细胞系总蛋白质的提取

(1) 将准备好的细胞培养皿置于冰上，弃掉原本的培养基，加入 PBS 充分润洗细胞 2 次 (沿皿壁加 PBS!)，弃 PBS，用蒸馏水和 PBS 分别冲洗细胞刮刀，将皿中的细胞刮下，收集于离心管中，4 °C 离心机 1000 rpm 离心 5 min，弃上清，保留细胞团块。

(2) 视细胞沉淀大小加入 RIPA 裂解液 (已添加蛋白酶抑制剂)，重悬后充分混匀，置于冰上裂解 30 min。

(3) 裂解结束后，将离心管置于 4 °C 离心机，13000 rpm 离心 15 min，此时上清即为所需蛋白裂解液。

(4) 配置测定蛋白浓度所需的 BCA 试剂，按每个样品做 3 个复孔，每个孔加入 200 μL BCA 试剂计算，A 液：B 液的比例为 199:1，充分涡旋震荡混匀后，加入透明 96 孔板中，每孔添加 200 μL，再加入 1 μL 蛋白裂解液，轻轻震荡混匀后，置于 37 °C 恒温培养箱孵育 30 min。（先加 1ul 的蛋白，在家 BCA 试剂 maybe）

(5) 使用酶标仪测定每孔吸光度，程序设置时，先振板 3 s，再测定 562 nm 下的吸光值，根据吸光值以及标准曲线，计算每个蛋白样品的浓度。

(6) 根据浓度计算，加入适量 5×Loading Buffer，浓度高的样品可以添加一些 RIPA 裂解液配平，将浓度调成一致之后，标好日期、样品名称和浓度，置于 95 °C 金属浴加热 10 min，注意在盖子上压好重物，防止受热盖子弹开导致样品损失。煮完的样品可以用于 WB 实验，或冻存于 -80 °C 长期保存。

2.SDS-PAGE 凝胶电泳

- (1) 根据目的蛋白大小选择合适浓度的凝胶，并配好新鲜的电泳液、转膜液、TBST 及牛奶等试剂。**(所有试剂最好现配现用!)**
- (2) 上样前可以将样品 95 °C 加热 2 min，化开后涡旋混匀再瞬离至管底，保证样品上样时均匀。
- (3) 先用低电压 80 V 跑至溴酚蓝到达浓缩胶与分离胶的边缘，大约 30 min，再将电压调至 120 V，电泳至溴酚蓝指示带跑到凝胶底部时，结束电泳。
- (4) 电泳结束后，准备转膜，在托盘中加满 ddH₂O 或转膜液，将转膜的三明治夹打开浸泡于液体中，在海绵上各放置两张滤纸。裁剪好尺寸和孔径都合适的 PVDF 膜，置于甲醇中浸泡震荡 2 min，激活后置于滤纸上。再将凝胶由玻璃板中拆出，切掉多余胶孔部分，放置于 PVDF 膜上，每步操作后都用刮板轻轻赶走气泡，确保各层之间没有气泡或其他杂质，并且顺序为**黑胶白膜**后，将转膜夹夹紧，按照颜色对应的方向置于转膜槽中，在槽中放两块冻于-80 °C 的冰袋，将转膜液加满后，根据目的蛋白的大小选择转膜电流和时间，通常为 250 mA 左右，1 KD/1 min。转膜全程置于冰浴中，放置过热导致花膜。
- (5) 转膜结束后，将 PVDF 膜用镊子夹至用 1×TBST 配置的 5% 脱脂牛奶中进行封闭，室温摇床上转速 70 rpm 封闭 1 h，如有需要也可以选择 4 °C 封闭过夜。
- (6) 将封闭结束的 PVDF 膜用镊子夹至洁净的 TBST 中，置于室温摇床 70 rpm 清洗 3 次，每次清洗 5 min。3 次清洗结束后，将 PVDF 夹至护卡膜中，根据目的蛋白的分子量进行裁切，然后孵育不同蛋白对应的一抗，一抗

的稀释浓度根据说明书选择，通常约为 1 : 1500，然后放到 4 °C 冰箱中的摇床上过夜孵育，有需要时也可以室温孵育 2 h，但是对一抗损耗较大。

(7) 将一抗孵育结束的 PVDF 膜用镊子夹至洁净的 TBST 中，置于室温摇床 70 rpm 清洗 3 次，每次清洗 5 min。清洗结束后，加入配置好的对应种属的二抗，二抗稀释浓度约 1 : 4000，放到 70 rpm 的摇床上在室温下孵育 2 h 左右。

(8) 将二抗孵育结束的 PVDF 膜用镊子夹至洁净的 TBST 中，置于室温摇床 70 rpm 清洗 3 次，每次清洗 5 min。将洗过的 PVDF 膜浸入到配制好的显影液中（辣根过氧化物酶化学发光底物，A 液：B 液=1: 1），最后用镊子放到化学发光成像系统的托盘上，进行电脑操作，曝光显影。根据日期和所检测样品的名称进行命名。

Tips: western 的结果最好当天显影结束当天处理数据哈哈。