

大分子 Western Blot 实验报告

1 实验原理

免疫印迹，又被称为蛋白质印迹（Western blot, WB），是一种复合性的免疫学检测技术。该方法通过利用 SDS-PAGE 技术，在生物样本中将蛋白质分子根据其分子量在凝胶上进行分离，随后通过电转移的方式将这些蛋白质转移到固相膜上。固相膜上的蛋白质充当抗原，与相应的抗体发生免疫反应，接着与酶标记的第二抗体发生反应。最终，通过底物显色或荧光成像等手段，检测电泳分离的特异性目的基因表达的蛋白质。

2 实验器材及试剂

2.1 实验器材

名称	厂家	型号
电子天平	英衡电子天平	YHB3003
酶标检测仪	Molecular Devices	SpectraMax M2
冷冻离心机	Haier Biomedica	LX-165T2R
纯水仪	芷昂仪器（上海）有限公司	Clever-S15
磁力搅拌器	Servicebio	MS-150
脱色摇床	Servicebio	DS-S 100
电泳仪	北京东方瑞丽	DYY-600C
化学发光成像系统	上海勤翔科学仪器有限公司	ChemiScope 6100
-80°C冰箱	Haier	BCD-501WDGR
电转仪	ACE Biotechnology	S-TRANS FW606



电泳槽	北京东方瑞丽	DYC-ZY2
匀浆仪	Servicebio	KZ-II

2.2 主要实验试剂

试剂	厂家	货号
增强型蛋白酶抑制剂混合液 (100x)	杭州浩克生物	HKW2016P
BCA 蛋白定量检测试剂盒	杭州浩克生物	HKW2019
超宽分子量预染蛋白标记	三鹰	PL00003
PVDF 膜 0.45 μ m	millipore	IPVH00010
TWEEN 20	Solarbio	T8220
超敏、高敏 ECL 化学发光试剂盒二合一	杭州浩克生物	HKW2095
β -actin	Proteintech	66009-1-Ig
α -Tublin	Proteintech	66031-1-Ig
GAPDH	Proteintech	60004-1-Ig
HRP 标记山羊抗兔	Proteintech	SA00001-2
HRP 标记山羊抗小鼠	Proteintech	SA00001-1
TBS-T (干粉)	杭州浩克生物	HK0003

3 实验方法

3.1 细胞总蛋白提取

3.1.1 对于悬浮细胞:

使用细胞刮收集细胞悬液 (连同培养基一起收集), 4°C, 500 g 离心 5 分钟, 收集沉淀, 沉淀用预冷的 PBS 洗涤两遍, 收集细胞沉淀, 尽可能吸取残留的 PBS。按每 1000 万细胞加入 1mL 预冷的 CHAPS 裂解液, 4°C 冰箱或冰盒中摇晃 30 分钟。

3.1.2 对于贴壁细胞:

吸净培养基, 用预冷的 PBS 清洗细胞表面 2 遍 (动作轻柔, 防止细胞脱落), 尽可能吸取残留的 PBS。在冰上按每 1000 万细胞加入 1mL 预冷的 CHAPS 裂解液于细胞瓶、培养板或培养皿中, 用移液管吹散贴壁的细胞, 对于贴壁紧的细胞也可使用细胞刮收集, 收集裂解液, 4°C 冰箱或冰盒中摇晃 30 分钟, 使其充分裂解。

3.2 组织总蛋白提取:

- 1) 组织块用冷 PBS 洗涤 2-3 次, 去除血污, 用吸水纸吸干, 剪成小块置于研磨管中, 加入一颗 5mm 的钢珠, 将 EP 管置于液氮中 2min, 取出 EP 置于匀浆器中研磨 (65HZ, 10s 工作, 15s 停顿, -40°C)。
- 2) 当 EP 管中组织成粉末状, 加入 10 倍组织体积预冷的 CHAPS 裂解液 (使用前数分钟内加入蛋白酶抑制剂) 置于匀浆器中研磨 (65HZ, 工作 10s, 停顿 15s, 运行 20 次, -40°C)。
- 3) 将匀浆液转移至 1.5mL 离心管中, 4°C 冰箱或冰盒中摇晃 30 分钟, 使其充分裂解。
- 4) 12000g 离心 10min, 收集上清, 即为总蛋白溶液。

3.3 蛋白浓度测定: 使用 BCA 蛋白浓度检测试剂盒检测蛋白浓度, 将样品分装成小份, 同时每管按 3:1 加入 LDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (4X), 使样品中 LDS-PAGE 蛋白上样缓冲液的终浓度为 1X, 上下颠倒混匀, 保存在 -80°C 冰箱。

3.4 SDS-PAGE 电泳

1) 制胶

4%醋酸胶

试剂	体积
40%T 2.5%C ACR	1mL
10xtris 缓冲液	1mL



AP	71.5uL
TEMED	5uL
H ₂ O	补足至 10mL

6%醋酸胶

试剂	体积
40%T 2.5%C ACR	1.5mL
10xtris 缓冲液	1mL
AP	71.5uL
TEMED	5uL
H ₂ O	补足至 10mL

8%醋酸胶

试剂	体积
40%T 2.5%C ACR	2mL
10xtris 缓冲液	1mL
AP	71.5uL
TEMED	5uL
H ₂ O	补足至 10mL

电泳液配方

试剂	体积
Tris	6.057g
Tricine 三羟甲基甲基甘氨酸	8.96g
SDS	1g
Sodium bisulfite 亚硫酸氢钠	0.25g



HCL	调 pH 值至 8.2
H2O	补足至 1000mL

- 按上述方法配 4%，6%，8%的醋酸胶。将剩余空间灌满浓缩胶然后将梳子插入浓缩胶中。
- 加足够的电泳液后上样电泳。将样品加入电泳孔中，恒压 130v 电泳，电泳至 75KDa Marker 跑至绿色胶圈处即可终止电泳，进行转膜。

3.5 转膜（使用 0.45 μ m 的 PVDF 膜）

转膜液配方

试剂	体积
Bis-tris 双氨基-三羟甲基甲烷	5.24g
BicineN,N 二羟乙基甘氨酸	4.08g
0.5M EDTA	2ml
Methanol 甲醇	200ml
Sodium bisulfite 亚硫酸氢钠	0.25g
HCL	调 pH 值至 7.2
H2O	补足至 1000mL

- 根据上表配制 1X Transfer buffer。
- 将胶从电泳槽中取出，浸泡在转移缓冲液中，以海绵/滤纸/膜/胶/滤纸/海绵的方式，将其紧密排列，确保各个夹层之间没有气泡，采用 20V 恒压进行湿法转移过夜，保持整个转移仪在冰水浴中。

3.6 免疫反应

蛋白固定液

试剂	体积
----	----

地址：浙江省杭州市凤起路 43 号 308

网址：www.haokebio.com

电话：13968143408

邮箱：2235184086@qq.com



乙醇	40mL
乙酸	7mL
甘油	3mL
水	50mL

- 1) 将转好的膜于室温下固定 30min，PBS 冲洗后封闭脱色摇床上用 5%的脱脂牛奶 (0.5%TBST 配)，封闭 1h。
- 2) 稀释一抗 (TBST 溶解，磷酸化蛋白使用 TBST 溶解的 5%BSA)，4°C 孵育过夜。
- 3) 用 TBST 在室温下脱色摇床上洗五次，每次 5min。
- 4) 将二抗用 TBST 稀释 10000 倍，室温下孵育 120min 后，用 TBST 在室温下脱色摇床上洗五次，每次 5min。

3.7 化学发光

将 ECL A 和 B 液按照 1:1 比例混合好后备用，将洗脱完的 PVDF 膜取出放在吸水纸上，稍微吸干膜上面的液体，将膜放入混合好的 ECL 发光液中，让液体完全浸没膜，待反应 1min 之后，将膜取出放入化学发光仪托盘上，按照预设程序开始化学发光。

3.8 凝胶图像分析

PhotoShop 整理结果，Image J 软件处理系统分析目的条带的灰度值。

三、WB 结果及分析（具体详见 Excel 灰度分析表格）