

# WESTERN BLOT 技术手册

WESTERN BLOT TECHNICAL MANUAL

技术引领医学转化 专业创造行业口碑

广州奥科生物医学科技有限公司

# 目录

一. 技术背景介绍.....	2
二. 材料与方法.....	2
1.需要的实验仪器.....	2
2.配置的试剂.....	2
3.需要实验耗材.....	2
三. 实验步骤.....	2
1.蛋白样品制备.....	2
1.1 单层贴壁细胞总蛋白的提取.....	2
1.2 组织中总蛋白的提取.....	3
1.3 加药物处理的贴壁细胞总蛋白的提取.....	3
2.蛋白含量的测定.....	4
2.1 制作标准曲线.....	4
2.2 检测样品蛋白含量.....	4
3.SDS-PAGE 电泳.....	4
3.1 清洗玻璃板.....	4
3.2 灌胶与上样.....	5
3.3 电泳.....	5
4.转膜.....	6
5.免疫反应.....	6
6.化学发光, 显影, 定影.....	7
7.凝胶图象分析.....	7

# Western Blot印迹法

## 一. 技术背景介绍

Western blot技术将电泳分离的组分从凝胶转移到一种固相载体, 并以特异性识别特定氨基酸序列的试剂作为探针进行检测的一种蛋白检测方法。Western Blot使用的探针是抗体, 它与附着于固相载体上的靶蛋白所呈现的抗原表位发生特异性反应。这种技术的作用是对非放射性标记蛋白组成的复杂混合物中的某些特异蛋白进行鉴别和鉴定。

## 二. 材料与方方法

### 1. 需要的实验仪器

高压锅、玻璃匀浆器、高速离心机、分光光度仪、-20 °C低温冰箱、垂直板电泳转移装置、恒温水浴摇床、多用脱色摇床。

### 2. 配置的试剂

单去污剂裂解液(50 mmol/L Tris·HCl (pH 8.0), 150 mmol/L NaCl, 1% TritonX-100, 100 μg/ml PMSF)、0.01 mol/L PBS (pH 7.3)、10%分离胶、4%浓缩胶、G250考马斯亮蓝溶液、0.15 mol/L NaCl溶液、2X (5X) SDS上样缓冲液、电泳缓冲液、转移缓冲液、10X丽春红染液、封闭液、TBST、TBS、洗脱抗体缓冲液、显影液、定影液、抗体、化学发光试剂。

### 3. 需要实验耗材

各种规格的枪头、离心管和移液器; 各种规格的烧杯、量筒和平皿等玻璃器材; 硝酸纤维素膜, 乳胶手套, 保鲜膜, 搪瓷盘(>20×20 cm), X-光片夹, X-光片, 玻棒长短各一根, 计时器, 吸水纸。

## 三. 实验步骤

### 1. 蛋白样品制备

#### 1.1 单层贴壁细胞总蛋白的提取

- 1) 倒掉培养液, 并将瓶倒扣在吸水纸上使吸水纸吸干培养液(或将瓶直立放置一会儿使残余培养液流到瓶底然后再用移液器将其吸走)。

- 2) 每瓶细胞加3 ml 4 °C预冷的PBS(0.01 M pH 7.2 ~ 7.3)。平放轻轻摇动1 min洗涤细胞, 然后弃去洗液。重复以上操作两次, 共洗细胞三次以洗去培养液。将PBS弃净后把培养瓶置于冰上。
- 3) 按1 ml裂解液加10  $\mu$ l PMSF(100 mM), 摇匀置于冰上。(PMSF要摇匀至无结晶时才可与裂解液混合。)
- 4) 每瓶细胞加400  $\mu$ l含PMSF的裂解液, 于冰上裂解30 min, 为使细胞充分裂解培养瓶要经常来回摇动。
- 5) 裂解完后, 用干净的刮棒将细胞刮于培养瓶的一侧(动作要快), 然后用枪将细胞碎片和裂解液移至1.5 ml离心管中。(整个操作尽量在冰上进行。)
- 6) 于4 °C下 12000 rpm 离心5 min。(提前开离心机预冷)
- 7) 将离心后的上清分装转移倒0.5 ml的离心管中放于-20 °C保存。

### 1.2 组织中总蛋白的提取

- 1) 将少量组织块置于1 ~ 2 ml匀浆器中球状部位, 用干净的剪刀将组织块尽量剪碎。
- 2) 加400  $\mu$ l单去污剂裂解液裂(含PMSF)于匀浆器中, 进行匀浆。然后置于冰上。
- 3) 几分钟后再碾一会儿再置于冰上, 要重复碾几次使组织尽量碾碎。
- 4) 裂解30 min后, 即可用移液器将裂解液移至1.5 ml 离心管中, 然后在4 °C下12000 rpm 离心5 min, 取上清分装于0.5 ml离心管中并置于-20 °C保存。

### 1.3 加药物处理的贴壁细胞总蛋白的提取

由于受药物的影响, 一些细胞脱落下来, 所以除按(一)操作外还应收集培养液中的细胞。以下是培养液中细胞总蛋白的提取:

- 1) 将培养液倒至15 ml离心管中, 于2500 rpm离心5 min。
- 2) 弃上清, 加入4 ml PBS并用枪轻轻吹打洗涤, 然后2500 rpm离心5 min。弃上清后用 PBS 重复洗涤一次。
- 3) 用枪洗干上清后, 加100  $\mu$ l裂解液(含PMSF)冰上裂解30 min, 裂解过程中要经常弹一弹以使细胞充分裂解。
- 4) 将裂解液与培养瓶中裂解液混在一起4 °C、12000 rpm离心5 min, 取上清分装于0.5 ml 离心管中并置于-20 °C保存。

## 2. 蛋白含量的测定

### 2.1 制作标准曲线

- 1) 从-20 °C取出1 mg/ml BSA，室温融化后，备用。
- 2) 取18个1.5 ml离心管，3个一组，分别标记为0  $\mu\text{g}$ ，2.5  $\mu\text{g}$ ，5.0  $\mu\text{g}$ ，10.0  $\mu\text{g}$ ，20.0  $\mu\text{g}$ ，40.0  $\mu\text{g}$ 。
- 3) 按下表在各管中加入各种试剂。

	0 $\mu\text{g}$	2.5 $\mu\text{g}$	5.0 $\mu\text{g}$	10.0 $\mu\text{g}$	20.0 $\mu\text{g}$	40.0 $\mu\text{g}$
1 mg/ml BSA	-	2.5 $\mu\text{l}$	5.0 $\mu\text{l}$	10.0 $\mu\text{l}$	20.0 $\mu\text{l}$	40.0 $\mu\text{l}$
0.15 mol/L NaCl	100 $\mu\text{l}$	97.5 $\mu\text{l}$	95.0 $\mu\text{l}$	90.0 $\mu\text{l}$	80.0 $\mu\text{l}$	60.0 $\mu\text{l}$
G250 考马斯亮蓝溶液	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml

- 4) 混匀后，室温放置2 min。在生物分光光度计(Bio-Photometer, Eppendorf)上进行比色分析。

### 2.2 检测样品蛋白含量

- 1) 取足量的1.5 ml离心管，每管加入4 °C储存的考马斯亮蓝溶液1 ml。室温放置30 min后即可用于测蛋白。
- 2) 取一管考马斯亮蓝加0.15 mol/L NaCl溶液100  $\mu\text{l}$ ，混匀放置2 min可做为空白样品，将空白倒入比色杯中在做好标准曲线的程序下按blank测空白样品。
- 3) 弃空白样品，用无水乙醇清洗比色杯2次(每次0.5 ml)，再用无菌水洗一次。
- 4) 取一管考马斯亮蓝加95  $\mu\text{l}$  0.15 mol/L NaCl溶液和5  $\mu\text{l}$ 待测蛋白样品，混匀后静置2 min，倒入扣干的比色杯中按Sample键测样品。

注意：每测一个样品都要将比色杯用无水乙醇洗2次，无菌水洗一次。可同时混合好多个样品再一起测，这样对测定大量的蛋白样品可节省很多时间。测得的结果是5  $\mu\text{l}$ 样品含的蛋白量。

## 3. SDS-PAGE 电泳

### 3.1 清洗玻璃板

一只手扣紧玻璃板，另一只手蘸点洗衣粉轻轻擦洗。两面都擦洗过后用自来水冲，再用蒸馏

水冲洗干净后立在筐里晾干。

### 3.2 灌胶与上样

- 1) 玻璃板对齐后放入夹中卡紧。然后垂直卡在架子上准备灌胶。(操作时要使两玻璃对齐, 以免漏胶。)
- 2) 按前面方法配10%分离胶, 加入TEMED后立即摇匀即可灌胶。灌胶时, 可用10 ml枪吸取5 ml胶沿玻璃放出, 待胶面升到绿带中间线高度时即可。然后胶上加一层水, 液封后的胶凝的更快。(灌胶时开始可快一些, 胶面快到所需高度时要放慢速度。操作时胶一定要沿玻璃板流下, 这样胶中才不会有气泡。加水液封时要很慢, 否则胶会被冲变形。)
- 3) 当水和胶之间有一条折射线时, 说明胶已凝了。再等3 min使胶充分凝固就可倒去胶上层水并用吸水纸将水吸干。
- 4) 按前面方法配4%的浓缩胶, 加入TEMED后立即摇匀即可灌胶。将剩余空间灌满浓缩胶然后将梳子插入浓缩胶中。灌胶时也要使胶沿玻璃板流下以免胶中有气泡产生。插梳子时要使梳子保持水平。由于胶凝固时体积会收缩减小, 从而使加样孔的上样体积减小, 所以在浓缩胶凝固的过程中要经常在两边补胶。待到浓缩胶凝固后, 两手分别捏住梳子的两边竖直向上轻轻将其拔出。
- 5) 用水冲洗一下浓缩胶, 将其放入电泳槽中。(小玻璃板面向内, 大玻璃板面向外。若只跑一块胶, 那槽另一边要垫一块塑料板且有字的一面面向外。)
- 6) 测完蛋白含量后, 计算含50  $\mu\text{g}$ 蛋白的溶液体积即为上样量。取出上样样品至0.5 ml离心管中, 加入5 $\times$ SDS上样缓冲液至终浓度为1 $\times$ SDS。(上样总体积一般不超过15  $\mu\text{l}$ , 加样孔的最大限度可加20  $\mu\text{l}$ 样品。)上样前要将样品于沸水中煮5 min使蛋白变性。
- 7) 加足够的电泳液后开始准备上样。(电泳液至少要漫过内测的小玻璃板。)用微量进样器贴壁吸取样品, 将样品吸出不要吸进气泡。将加样器针头插至加样孔中缓慢加入样品。(加样太快可使样品冲出加样孔, 若有气泡也可能使样品溢出。加入下一个样品时, 进样器需在外槽电泳缓冲液中洗涤3次, 以免交叉污染。

### 3.3 电泳

电泳时间一般4~5h, 电压为40 V较好, 也可用60 V。电泳至溴酚蓝刚跑出即可终止电泳, 进行转膜。

#### 4.转膜

- 1) 转一张膜需准备6张7.0~8.3 cm的滤纸和1张7.3~8.6 cm的硝酸纤维素膜。切滤纸和膜时一定要戴手套，因为手上的蛋白会污染膜。将切好的硝酸纤维素膜置于水上浸2 h才可使用。(用镊子捏住膜的一边轻轻置于有超纯水的平皿里，要使膜浮于水上，只有下层才与水接触。这样由于毛细管作用可使整个膜浸湿。若膜沉入水里，膜与水之间形成一层空气膜，这样会阻止膜吸水。
- 2) 在加有转移液的搪瓷盘里放入转膜用的夹子、两块海绵垫、一支玻棒、滤纸和浸过的膜。将夹子打开使黑的一面保持水平。在上面垫一张海绵垫，用玻棒来回擀几遍以擀走里面的气泡。(一手擀另一手要压住垫子使其不能随便移动。)在垫子上垫三层滤纸(可三张纸先叠在一起在垫于垫子上)，一手固定滤纸一手用玻棒擀去其中的气泡。
- 3) 要先将玻璃板撬掉才可剥胶，撬的时候动作要轻，要在两个边上轻轻的反反复复撬。撬一会儿玻璃板便开始松动，直到撬去玻板。(撬时一定要小心，玻板很易裂。)除去小玻璃板后，将浓缩胶轻轻刮去(浓缩胶影响操作)，要避免把分离胶刮破。小心剥下分离胶盖于滤纸上，用手调整使其与滤纸对齐，轻轻用玻棒擀去气泡。将膜盖于胶上，要盖满整个胶(膜盖下后不可再移动)并除气泡。在膜上盖3张滤纸并除去气泡。最后盖上另一个海绵垫，擀几下就可合起夹子。整个操作在转移液中进行，要不断的擀去气泡。膜两边的滤纸不能相互接触，接触后会发生短路。(转移液含甲醇，操作时要戴手套，实验室要开门以使空气流通。)
- 4) 将夹子放入转移槽中，要使夹的黑面对槽的黑面，夹的白面对槽的红面。电转移时会产热，在槽的一边放一块冰来降温。一般用60 V转移2 h或40 V转移3 h。
- 5) 转完后将膜用1×丽春红染液染5 min(于脱色摇床上摇)。然后用水冲洗掉没染上的染液就可看到膜上的蛋白。将膜晾干备用。

#### 5.免疫反应

- 1) 将膜用TBS从下向上浸湿后，移至含有封闭液的平皿中，室温下脱色摇床上摇动封闭1 h。
- 2) 将一抗用TBST稀释至适当浓度(在1.5 ml离心管中)；撕下适当大小的一块儿保鲜膜铺于实验台面上，四角用水浸湿以使保鲜膜保持平整；将抗体溶液加到保鲜膜上；从封闭液

中取出膜，用滤纸吸去残留液后，将膜蛋白面朝下放于抗体液面上，掀动膜四角以赶出残留气泡；室温下孵育1~2 h后，用TBST在室温下脱色摇床上洗两次，每次10 min；再用TBS洗一次，10 min。

- 3) 同上方法准备二抗稀释液并与膜接触，室温下孵育1~2 h后，用TBST在室温下脱色摇床上洗两次，每次10 min；再用TBS洗一次，10 min，进行化学发光反应。

## 6.化学发光，显影，定影

- 1) 将A和B两种试剂在保鲜膜上等体积混合；1 min后，将膜蛋白面朝下与此混合液充分接触；1 min后，将膜移至另一保鲜膜上，去尽残液，包好，放入X-光片夹中。
- 2) 在暗室中，将1×显影液和定影液分别到入塑料盘中；在红灯下取出 X-光片，用切纸刀剪裁适当大小(比膜的长和宽均需大1 cm)；打开X-光片夹，把X-光片放在膜上，一旦放上，便不能移动，关上X-光片夹，开始计时；根据信号的强弱适当调整曝光时间，一般为1 min或5 min，也可选择不同时间多次压片，以达最佳效果；曝光完成后，打开X-光片夹，取出X-光片，迅速浸入显影液中显影，待出现明显条带后，即刻终止显影。显影时间一般为1~2 min(20~25 °C)，温度过低时(低于16 °C)需适当延长显影时间；显影结束后，马上把X-光片浸入定影液中，定影时间一般为5~10 min，以胶片透明为止；用自来水冲去残留的定影液后，室温下晾干。应注意的是：显影和定影需移动胶片时，尽量拿胶片一角，手指甲不要划伤胶片，否则会对结果产生影响。

## 7.凝胶图象分析

将胶片进行扫描或拍照，用凝胶图象处理系统分析目标带的分子量和净光密度值。