

# Western Blot Protocol

## sinocyte

### 蛋白质技术讨论版

#### 一. 配胶

1. 注意一定要将玻璃板洗净, 最后用 ddH<sub>2</sub>O 冲洗, 将与胶接触的一面向下倾斜置于干净的纸巾晾干。

2. 分离胶及浓缩胶均可事先配好(除 AP 及 TEMED 外), 过滤后作为储存液避光存放于 4°C, 可至少存放 1 个月, 临用前取出室温平衡(否则凝胶过程产生的热量会使低温时溶解于储存液中的气体析出而导致气泡, 有条件者可真空抽吸 3 分钟), 加入 10% AP (0.7~0.8:100, 分离胶浓度越高 AP 浓度越低, 15% 的分离胶可用到 0.5:100) 及 TEMED (分离胶用 0.4:1000, 15% 的可用到 0.3:1000, 浓缩胶用 0.8: 1000) 即可, 如室温较低可升高 10% AP 及 TEMED 浓度到《分子克隆》建议浓度。

#### 3. 封胶:

灌入 2/3 的分离胶后应立即封胶, 胶浓度 < 10% 时可用 0.1% 的 SDS 封, 浓度 > 10% 时用水饱和的异丁醇或异戊醇, 也可以用 0.1% 的 SDS。封胶后切记, 勿动。

待胶凝后将封胶液倒掉, 如用醇封胶需用大量清水及 ddH<sub>2</sub>O 冲洗干净, 然后加少量 0.1% 的 SDS, 目的是通过降低张力清除残留水滴。片刻后倒掉 SDS, 将玻璃板倒立放置片刻控净。

4. 灌好浓缩胶后 1h 拔除梳子, 注意在拔除梳子时宜边加水边拔, 以免有气泡进入梳孔使梳孔变形。拔出梳子后用 ddH<sub>2</sub>O 冲洗胶孔两遍以去除残胶, 随后用 0.1% 的 SDS 封胶。若上样孔有变形, 可用适当粗细的针头拨正; 若变形严重, 可在去除残胶后用较薄的梳子再次插入梳孔后加水拔出。30min 后即可上样, 长时间有利于胶结构的形成, 因为肉眼观的胶凝时其内部分子的排列尚未完成。

**10% 的 AP 最好现配现用, 如在 4°C 存放勿超过两周。30% 的丙烯酰胺如有沉淀, 最好弃掉。**

#### 二. 样品处理

##### 1. 培养的细胞 (定性):

- (1) 去培养液后用温的 PBS 冲洗 2~3 遍 (冷的 PBS 有可能使细胞脱落)。
- (2) 对于 6 孔板来说每孔加 200~300 $\mu$ l, 60~80°C 的 1 $\times$ loading buffer。
- (3) 100°C, 1min。
- (4) 用细胞刮刮下细胞后在 EP 管中煮沸 10min, 期间 vortex 2~3 次。
- (5) 用干净的针尖挑丝, 如有团块则将团块弃掉, 如果没有团块但有拉丝现象, 则可以将 EP 管置于 0°C 后在 14000~16000g 离心 2min, 再次挑丝。若无团块也无丝状物但溶液有些粘稠, 可通过使用 1ml 注射器反复抽吸来降低溶液粘滞度, 便于上样。
- (6) 待样品恢复到室温后上样。

##### 2. 培养的细胞 (定量):

- (1) 去培养液后用温的 PBS 冲洗 2~3 遍 (冷的 PBS 有可能使细胞脱落)。
- (2) 加入适量的冰预冷的裂解液后置于冰上 10~20min。
- (3) 用细胞刮刮下细胞, 收集在 EP 管后超声 (100~200w) 3s, 2 次。
- (4) 12000g 离心, 4°C, 2min。
- (5) 取少量上清进行定量。
- (6) 将所有蛋白样品调至等浓度, 充分混合沉淀后加 loading buffer 后直接上样最好, 剩余溶液 (溶于 1 $\times$ loading buffer) 可以低温储存, -70°C 一个月, -20°C 一周, 4°C 1~2 天, 每次上样前 98°C, 3min。

##### 3. 组织:

(1) 匀浆 对于心肝脾肾等组织可每 50~100mg 加 1ml 裂解液, 肺 100~200mg 加 1ml 裂解液。可手动或电动匀浆。注意尽量保持低温, 快速匀浆。

(2) 12000g 离心, 4℃, 2min。

(3) 取少量上清进行定量。

(4) 将所有蛋白样品调至等浓度, 充分混合沉淀加 loading buffer 后直接上样最好, 剩余溶液(溶于 1×loading buffer) 可以低温储存, -70℃ 一个月, -20℃ 一周, 4℃ 1~2 天, 每次上样前 98℃, 3min。

**裂解液配方: Tris-Cl (pH7.4) 20mM, EDTA 1mM**

由于蛋白酶抑制剂可影响蛋白定量, 且新鲜蛋白很少降解, 故可不加, 如加按建议比例即可。提取磷酸化的蛋白还需加  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  0.1mM 及 NaF 25mM)。

**1×loading buffer 配方: 10% 甘油, 50mM Tris · Cl (pH6.8), 2% β-巯基乙醇, 0.2~0.5% 溴酚蓝, 2% 或 5% 的 SDS。Buffer 可配成 2×~5×, 注意 SDS 终浓度勿超过 10%。**

对于心脏, 肌肉等碎屑较多的组织可用 5% 的 SDS, 肝肾等组织 2% 即可。

### 三. 电泳

1. 上样前将胶板下的气泡赶走。

2. 所有蛋白样品调至等浓度后上样, 样品两侧的泳道用等体积的 1×loading buffer 上样, Marker 也用 1×loading buffer 调整至与样品等体积。

2. 以初始电压为 45V 时的电流强度进行稳流电泳, 当电压达 65V 时改为稳压电泳。

3. 在目的蛋白泳动至距胶下缘 1cm 以上结束。

**电泳液配方: Tris-base 3g, glycine 14.4g, 0.1% SDS (10ml 10% SDS) /L  
Tris-base 1.5g, glycine 7.2g, 0.1% SDS (5ml 10% SDS) /0.5L**

### 四. 转膜

1. 电泳结束前 20 分钟左右戴上手套开始准备:

湿转使用常规电转液: Tris 3.0g, Gly 14.4g, M-OH 200ml, 加去离子水至 1,000ml。干转则取此转移液, 每 50ml 加入 10%SDS180ul。

浸泡 NC 膜: 将 NC 膜平铺于去离子水面, 靠毛细作用自然吸水后再完全浸入水中 10min 以排除气泡, 随后浸泡入转移液中。PVDF 膜则在 M-OH 中浸泡 20min 以上后转入转移液中。将滤纸也浸入转移液中。

2. 取胶:

将胶卸下, 保留 30-100KD 或分子量范围更广些的胶(以便以后杂其他感兴趣的蛋白), 左上切角, 在转移液中稍稍浸泡一下, 置于洁净玻璃板上, 按顺序铺上膜与每侧一张(干转每侧三张)滤纸。注意用玻棒逐出气泡, 剪去滤纸与膜的过多部分(尤其是干转, 以防止短路)

3. 转膜:

湿转: 电转槽用去离子水淋洗晾干, 加入 1,000ml 电转液。将胶平铺于海绵上, 滴加少许电转液再次驱赶气泡, 封紧后放入电转槽, 注意膜在正极一侧。降温, 将电转槽置于冰水混合物中。恒流 100mA 过夜, 或 400mA, 4h。注意不同蛋白的要求不同。

干转: 用电转液淋洗石墨电极, 滤纸吸干, 铺上胶, 再滴少许电转液, 以 1.5mA/cm<sup>2</sup> 凝胶面积转移 1-2 小时。负载电压不宜超过 1V/cm<sup>2</sup> 胶面积。

**电转液配方: Tris-base 3g, glycine 14.4g, 200ml 甲醇/1L**

## 五. 封闭及杂交

### 1. 封闭:

将膜从电转槽中取出, 去离子水与 PBST 或 TTBS 稍加漂洗, 浸没于封闭液中缓慢摇荡一小时。必要时可先用丽春红染色 (2% 乙酸, 0.5% 丽春红的水溶液) 观察蛋白条带, 再用去离子水和 TTBS 将丽春红洗脱后封闭, 如用蛋白 marker 则可省略此步。

### 2. 结合一抗:

一抗的准备: 使用反贴法时每张  $3 \times 9 \text{cm}^2$  膜约需 2ml 一抗稀释液。

反贴法的操作: 含一抗的封闭液滴加于摇床的塑料膜上, 将 Western 膜从封闭液中取出, 滤纸贴角稍吸干, 正面朝下贴在一抗上, 注意不要留下气泡, 室温下轻摇孵育一小时或  $4^\circ\text{C}$  静置过夜。在反应体系外面罩一湿润平皿以防止液体过多蒸发。

### 3. 洗涤:

一抗孵育结束后, 用 PBST 或 TTBS 漂洗膜后再浸洗三次, 每次 5-10min。

### 4. 结合二抗:

根据一抗来源选择合适的二抗, 根据鉴定方法选择 HRP 或 AP 标记的抗体, 按相应比例稀释 (1:1000~1:10000), 室温轻摇一小时。

### 5. 洗涤:

二抗孵育结束后, 用 PBST 或 TTBS 漂洗膜后再浸洗三次, 每次 5-10min。

<b>PBST:</b>	<b>1×PBS</b>	<b>TTBS:</b>	<b>Tris-HCl</b>	<b>20mM, pH 7.4 (25°C)</b>
	<b>Tween-20 0.01%~0.02%</b>		<b>NaCl</b>	<b>150mM</b>
			<b>Tween-20</b>	<b>0.05%</b>

封闭液与抗体溶剂均为含 5% 脱脂奶粉的 PBST 或 TTBS, 临用时取 200ml PBST 或 TTBS 加入 10g 脱脂奶粉即为封闭液。

## 六. 一般使用辣根过氧化物酶 HRP-ECL 发光法或碱性磷酸酶 AP-NBT/BICP 显色法。

### 1. HRP-ECL 发光法:

将 A、B 发光液按比例稀释混合。膜用去离子水稍加漂洗, 滤纸贴角吸干, 反贴法覆于 A、B 混合液滴上, 熄灯至可见淡绿色荧光条带 (5min 左右) 后滤纸贴角吸干, 置于保鲜膜内固定于片盒中, 迅速盖上胶片, 关闭胶盒, 根据所见荧光强度曝光。取出胶片立即完全浸入显影液中 1-2min, 清水漂洗一下后放在定影液中至底片完全定影, 清水冲净晾干, 标定 Marker, 进行分析与扫描。

### 2. AP-NBT/BICP 显色法:

每片 NBT/BICP 可溶解于 30ml 水中, 使用前将一片分装在 30 个 EP 管中, 每张  $3 \times 9 \text{cm}$  的膜取一管配成 1ml 即可。将 PBST 或 TTBS 洗涤过的膜用去离子水稍加漂洗, 滤纸贴角吸干, 反贴法覆于 NBT/BICP 溶液液滴上, 并用不透明物体 (如报纸) 遮挡光线, 显色 20s 后每 10s 观察一次, 至条带明显或有本底出现时将膜揭起置去离子水中漂洗后放滤纸上晾干即可观察与扫描。

背景深浅与一抗的质量及二抗的量有关, 当然如果暴光时间长达半小时, 出现背景是正常的。

## 七. 若目的条带未出现, 或很淡, 可试用以下方法增强发光强度:

1. 用清水漂洗膜数分钟, 重加发光液进行曝光, 可延长曝光时间。
2. 将膜在 PBST 或 TTBS 中洗涤 30min 或更长, 期间至少换 2 次液。
3. 封闭 40~60min
4. 一抗杂交, 室温 1h。37°C 1h 会更强, 但可能增加非特异条带。

5. PBST 或 TTBS 洗膜 20min, 期间换 2 次液。
6. 二抗杂交, 37°C 1h。
7. PBST 或 TTBS 洗膜 20min, 期间换 2 次液。
8. 发光鉴定。
9. 若条带仍未出现或很淡, 可以再用 PBST 或 TTBS 洗涤膜 20min, 期间换 2 次液。
10. 三抗杂交, 室温 1h。37°C 1h 会更强, 但可能增加非特异条带。三抗即抗二抗的二抗, 比如二抗用羊抗兔, 此时三抗可以选择兔抗羊或鼠抗羊等。
11. PBST 或 TTBS 洗涤膜 20min, 期间换 2 次液。
12. 发光鉴定。

一抗溶液中加入 0.2% 叠氮钠后可 4°C 存放至少 2 周 (一个月我也用过, 没问题, 再长时间还没试)

#### 八. NC 膜的多次使用

一张 NC 膜可使用多次, 对多种蛋白进行杂交, 步骤与“七. 增强敏感性”相近。

1. 如前次杂交结果条带距离本次杂交的蛋白的预计位置差别较大则只需用 PBST 洗涤掉发光液 (10min×3 次) 后从一抗杂交开始, 后续步骤同前。
2. 如前次杂交结果条带距离本次杂交的蛋白的预计位置较近则需更强的洗涤, 可用 strip 液 (可用杂交袋) 于室温摇动洗涤 30min~60min, 然后用 PBST 洗涤 10min×3 次, 再从封闭开始, 后续步骤同前。
3. 对于杂交若干次的膜, 如果常规洗涤方法不易去掉众多条带, 可用强度更强的自配的 strip 液 (可用杂交袋) 于 50°C 洗涤 30min, 然后用 PBST 洗涤 10min×3 次, 再从封闭开始, 后续步骤同前。