蛋白质印迹法标准操作流程

一、 实验试剂及耗材

（1）样品制备试剂

a. RIPA 裂解液

b.蛋白酶抑制剂

c. BCA 工作液

d. BSA Standard Solution(5mg/ml)（RM00005）

e. 1×PBS 缓冲液（RM00012）

d. 5×loading buffer（RM00001）

（2）制胶试剂

a． 30% Acr-Bis (29:1)（RM00006）

b． 1 M Tris-HCl (pH6.8)（RM00003）

C． 1.5M Tris-HCl (pH8.8)（RM00002）

d． 10%SDS（RM00004）

e． 10%Ammonium persulfate (APS)（RM00007）

f． TEMED（RM00009）

（3）电泳、转膜试剂及耗材

a.1X Tris-Glycine SDS Running Buffer（RM00010）

b.1X Western Transfer Buffer（RM00011）

c.Filter Paper (7.5×10cm)（RM00019）

d.Nitrocellulose membrane（RM00017/ RM02801/ RM00018）

（4）封闭、一抗孵育及曝光试剂

a.1XTBST Buffer（RM00013）

b.1X Western Blocking Buffer（RM00015）

c.Skimmed milk powder（RM00014）

d. Bovine Serum Albumin (BSA)（RM02802）

e.Western Antibody Dilution Buffer（RM00016）

f.SignalFire™ ECL Reagent（RM00020/RM00021）

二、实验步骤

1、样品制备

（1）细胞收集

a. 贴壁培养细胞收集

去除贴壁细胞的培养液，用 PBS、NS 或无血清培养基清洗 1 次，低速离心，弃上清，留取沉淀。

b. 悬浮培养细胞收集

速离心悬浮细胞，弃上清，收集沉淀。手指轻弹细胞，使其松散。

c. 组织样本收集

把组织剪切成细小的碎片，越小越好。取液氮或超低温冰箱中冷冻 30min 以上的组织，迅速用液氮研磨，研磨过程尽量控制在 1~2min 之内，以减少蛋白的降解。

（2）总蛋白提取

a. 细胞/组织裂解

将装有细胞沉淀或组织碎片的容器完全插入冰中。细胞沉淀按照 1mL 裂解液/107 个细胞(1 个 T75 培养瓶细胞量)的比例加入相应体积的裂解液（细胞量足够时都加入 3mL，不足时根据细胞量计算），裂解 20min，每隔 5min 将离心管置于涡旋振荡仪上震荡 10s。组织碎片按照 0.5mL 裂解液/100mg 组织向匀浆器中加入蛋白裂解液，每 3min 研磨一次，重复 5 次，使组织尽量碾碎。（裂解液中根据需要选择添加或不添加蛋白酶抑制剂）。

b.离心

把裂解好的样品配平后，置于预冷的高速冷冻离心机中，12000 rpm，15min。

c. 蛋白变性

完成离心后，上清即为蛋白提取液。吸取少量蛋白提取液做蛋白浓度测定。向剩余的蛋白提取液的离心管中加入 1/5 上清体积的 5×Loading Buffer（最终工作液为 1X)，待干式恒温器温度升至 95℃后，将 1.5mL 离心管插入加热孔中，95℃加热变性 10min，待液体完全冷却后置于-20℃保存。

（3）蛋白浓度测定（BCA 法）

a. BCA 工作液的配置

根据样品数量，按 50 体积 BCA 试剂 A 加入 1 体积 BCA 试剂 B（50:1）配置适量 BCA 工作液，充分混匀。BCA 工作液室温 24h 内稳定。

b.标准品测定

取 10μl 蛋白标准品（5mg/ml BSA）稀释至 50μl，使终浓度为 1mg/ml。稀释后的蛋白标准品可以-20℃长期保存。此标准品溶液的稀释液可使用去离子水或 1*PBS。将标准品按 0、1、2、4、8、12、16、20μl 加入到 96 孔板中，加稀释液补足到 20μl（见附表）。加适当体积样品到 96 孔板的样品孔

中，如果样本不足 20μl，需加稀释液补足到 20μl。请注意记录样品体积。各孔加入 200μl BCA 工作液，37℃放置 20-30min。用酶标仪测定 A562，或 540-595nm 之间的其他波长吸光度。根据标准曲线和使用的样品体积计算出样品的蛋白浓度。

2、凝胶电泳

（1）制胶器安装

根据使用说明书安装。

（2）分离胶制备

根据不同蛋白大小，选择不同浓度的分离胶（见附件表）。将制备好的胶溶液注入预先安装好的制胶器中，加入异丙醇封胶。室温水平放置 30min 左右。注意防止胶溶液产生气泡并注入制胶器中；注胶前再加入 TEMED，防止注胶前凝固；注入异丙醇时需沿玻板一边缓慢拖动加入。

（3）浓缩胶制备

分离胶凝固后，沿玻板一边倒出异丙醇，并用滤纸吸干。再根据需要的体积制备浓缩胶（见附表）。将制备好的胶溶液注入制胶器中，并把准备好的样品梳沿玻板一端缓慢插入胶溶液中，室温水平放置 20-30min。注意样品梳与胶溶液之间避免气泡产生。

（4）上样

待浓缩胶凝固好后，双手垂直拔出样品梳，并用 Tris-Glycine SDS Running Buffer 注入到内外槽中，形成闭合回路。用移液器吸取样品垂直梳孔上样，蛋白含量 25ug/孔。注意内槽 Tris-Glycine SDS Running Buffer 需注满，外槽 Tris-Glycine SDS Running Buffer 没过底部 3~5cm 即可。

（5）电泳

上样完以后，连通电泳仪电源，注意正负极需连接正确，设定适宜的电泳参数，浓缩胶电泳参数为恒压 80V，待样本进入分离胶是，可将电泳调至 120V。当溴酚蓝电泳到凝胶底部时，停止电泳，关闭电泳仪电源。

3、转膜

（1）准备工作

a. 转膜缓冲液至少提前 2h （即开始电泳后）放入-20℃冰箱预冷。

b.根据胶体大小选择,将 Filter Paper 及 Nitrocellulose membrane 剪裁至合适尺寸。

c. 目的蛋白＞20KD 选择 0.45μm NC 膜；目的蛋白＜20KD 选择 0.2NCμm 膜或 0.22μm 的 PVDF 膜，选择完毕后将 NC 膜放在 Western Transfer Buffer 中浸泡备用，注意如使用的是 PVDF 膜需先放入甲醇中浸泡 5-10min，再放入 Western Transfer Buffer 中浸泡备用。

（2）转膜

取出玻板中的凝胶，在夹板上依次放一块多孔垫、三张滤纸、凝胶、NC 膜、三张滤纸、一块多孔垫（“三明治”结构），将转好的膜放在转膜槽，按一定的条件进行转膜。（见附表）

4、封闭

将膜从“三明治”结构中取出，放入合适的抗体孵育槽中，加入 Western Blocking Buffer 室温孵育 1ml，一张 6.3×8.3cm 大小的膜加入 6~7ml 即可。

5、HRP 标记一抗孵育

a.将带有 HRP 标记的一抗用 Western Transfer Buffer 按照合适比例进行稀释。

b.封闭结束后，将稀释好的一抗工作液倒入孵育槽中，室温 2h 或 4℃过夜。

6、洗涤

一抗孵育结束后，加入 TBST Buffer 洗涤 4 次，5min/次。

7、曝光

a. 根据膜的大小，按每 10cm2 膜使用 1-2ml 工作液，按比例吸取等体积的 Solution Ⅰ和 Solution Ⅱ混匀，配制成发光检测工作液。

b. 用平头镊子将膜取出，膜的下缘轻轻接触吸水纸，去除膜上多余的液体。用移液器将工作液加到转印膜上，使其均有覆盖，室温孵育 1-2min，此步骤可在洁净保鲜膜上或塑料盒中完成。

c. 压片检测：将膜固定于片夹内。暗室内压片 1 分钟，立即显影定影，根据结果再调整压片时间。或直接分别压片 30 秒、1、3、 5 分钟，然后一起显影定影观察结果。

d. 荧光成像仪检测：将膜放置到荧光成像仪内，参考仪器说明书进行检测。

附表 1：BSA 标准品稀释

1mg/ml BSA(μl)	稀释液(μl)	对应的蛋白含量（mg/ml）
0	20	0
1	19	0.05
2	18	0.1
4	16	0.2
8	12	0.4
12	8	0.6
16	4	0.8
20	0	1

附表 2：分离胶浓度的选择

分子量（kDa）	分离胶浓度
X≤10	15%
10 < X≤15	13.5%

15< X≤25	12%
25< X≤35	11%
35< X≤40	10%
40< X≤55	9%
55< X≤70	8%
70< X≤100	7%
100< X	6%
备注：X 为目的蛋白大小	

附表 3：分离胶配制

分离胶浓度	6%	7%	8%	9%	10%	11%	12%	13.5%	15%
去离子水（mL）	5.3	4.9	4.6	4.3	4.0	3.65	3.3	2.8	2.3
30%丙烯酰胺（mL）	2	2.4	2.7	3.0	3.3	3.65	4.0	4.5	5.0
1.5M Tris-HCL(pH8.8)（mL）					2.5				
10%SDS（mL）					0.1				
10%AP（mL）					0.1				
TEMED（mL）					0.01				
总体积（mL）					10				

附表 4：浓缩胶配制

	5%浓缩胶	5%浓缩胶	5%浓缩胶	5%浓缩胶	5%浓缩胶
去离子水（mL）	1.1	2.1	2.7	3.4	4.1
30%丙烯酰胺（mL）	0.33	0.5	0.67	0.83	1.0
1.0M Tris-HCL(pH6.8)（mL）	0.25	0.38	0.5	0.63	0.75
10%SDS（mL）	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06
10%AP（mL）	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06
TEMED（mL）	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006
总体积（mL）	2	3	4	5	6

附表 5：转膜条件选择

分子量（kDa）	分离胶浓度
X≤10	恒流 200mA,30min
10 < X≤15	恒流 200mA,40min
15< X≤20	恒流 200mA,50min

20< X≤50	恒流 200mA, 1kDa/min+20min
50< X≤100	恒流 200mA, 1kDa/min+30min
100< X≤150	恒流 250mA, 1kDa/min+20min
150< X≤180	恒流 270mA, 1kDa/min(时间控制在 3h 内)
180< X	恒流 270mA, 1kDa/min(时间控制在 4h 内)
备注：X 为目的蛋白大小	