

蛋白免疫印迹实验步骤

一、实验仪器及试剂

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、一抗二抗孵育及曝光试剂

- a. 1XTBST Buffer (RM00013)
- b. 1X Western Blocking Buffer (RK05742)
- c. Skimmed milk powder (RM00014)
- d. Bovine Serum Albumin (BSA) (RM02802)
- e. Western Antibody Dilution Buffer (RK05743)
- f. HRP 偶联二抗 (根据一抗情况选用, AS014/AS003等可供选择)
- g. SignalFire™ ECL Reagent (RM00020/RM00021)

二、实验步骤

1. 样本制备

(1) 细胞收集

a. 贴壁培养细胞收集

用细胞刮刮下细胞或用胰酶消化处理后， $400\times g$ ，离心5min，弃上清；用适量冰PBS溶液将离心后细胞沉淀重悬， 4°C ， $400\times g$ 离心5min, 弃上清，重复清洗步骤一次收集细胞沉淀。

b. 悬浮培养细胞收集

收集悬浮细胞， $400\times g$ 离心5min，弃上清，适量冰PBS溶液将离心后细胞沉淀重悬， 4°C ， $400\times g$ 离心5min, 弃上清，重复清洗步骤一次，收集细胞沉淀。

c. 组织样本收集

把组织在预冷的表面上剪切成细小碎块，然后用液氮或超低温冰箱中冷冻组织30min以上，迅速加液氮研磨，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:

根据收集的细胞数量、细胞种类添加适量的裂解液。

例如常规细胞沉淀可按照1mL裂解液/ 10^7 个细胞的比例加入相应体积的裂解液，加入裂解液后将沉淀吹打混匀。使用细胞破碎仪超声样本，每次超声时间4-5s, 间隔时间在5s左右，肉眼观察，样本为均一，不粘稠液体即可。或采用震荡裂解方式进行，每隔5min将离心管置于涡旋振荡仪上震荡10s，裂解20min。

组织碎片可按照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（裂解液中根据需要添加或不添加蛋白酶抑制剂）。所有裂解过程，务必在低温条件下进行。

b. 离心:

把裂解好的样品配平后，将裂解好的样本置于预冷的高速冷冻离心机中， 4°C ， $13000\times g$ 离心10min，收集上清

c. 蛋白变性:

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对应体积的 $5\times$ Loading Buffer（最终工作液为 $1\times$ ），待干式恒温器温度升至 95°C 后，将1.5mL离心管插入加热孔中， 95°C 加热变性10min，待液体完全冷却后置于 -20°C 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. BSA标准品梯度稀释

取10 μ l 蛋白标准品 (5 mg/mL BSA) 稀释至50 μ L, 使终浓度为1mg/mL。稀释后的蛋白标准品可以-20 $^{\circ}$ C长期保存。此标准品溶液的稀释液可使用去离子水或1 \times PBS。将标准品按0、1、2、4、8、12、16、20 μ L加入到96孔板中, 加稀释液补足到20 μ L。

c. 样本浓度测定

加适当体积样品到96孔板的样品孔中, 如果样本不足20 μ l, 需加稀释液补足到20 μ l。每孔加入 200 μ L BCA工作液, 37 $^{\circ}$ C放置20-30min。用酶标仪测定样本和标准品在562nm下的吸光度, 或在540-595nm之间波长下的吸光度。根据BSA蛋白浓度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) 凝胶配置

根据目标蛋白大小, 选择不同合适浓度的分离胶 (见附表)。注意该过程注意不能有气泡产生。

(3) 上样

待胶凝固好后, 用移液器吸取样品垂直梳孔上样, 建议总蛋白上样量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。

(4) 电泳

上样完成后, 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。建议浓缩胶电泳参数为恒压80V, 分离胶采用恒压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

- 转膜缓冲液可提前2h (即开始电泳后) 放入-20 $^{\circ}$ C冰箱预冷。
- 根据胶的面积大小, 将滤纸以及NC膜剪裁至合适尺寸。
- 建议目的蛋白大于20KD可选择0.45 μ m NC膜; 目的蛋白小于20KD可选择0.2 μ m的NC膜或0.22 μ m的PVDF膜。选择完毕后将膜放在Western Transfer Buffer中浸泡备用。注意使用PVDF膜需先放入甲醇中浸泡1min左右至均匀浸透, 没有白点即可放入Western Transfer Buffer中浸泡备用。

(2) 转膜

根据目的蛋白大小，选择合适的转膜条件（见附表）。

4. 封闭

转膜完成后，将膜取出，放入合适的抗体孵育槽中，加入Western Blocking Buffer 室温孵育1h。

5. 抗体孵育

根据所使用的一抗种类，选择进行下述其中1项的具体步骤

(1) 对于无偶联的一抗

- a. 将一抗用Western Antibody Dilution Buffer (RK05743) 按照抗体说明书推荐比例进行稀释, 室温孵育1.5h或4℃过夜孵育。
- b. TBST Buffer洗涤4次, 每次5min。
- c. 按一抗来源选取合适的HRP偶联二抗, 按照合适比例进行稀释, 室温孵育1h。
- d. TBST Buffer洗涤4次, 每次5min。
- e. 继续进行后续曝光操作。

(2) 对于偶联有HRP的一抗

- a. 将一抗用Western Antibody Dilution Buffer (RK05743) 按照抗体说明书推荐比例进行稀释, 室温孵育1.5h或4℃过夜孵育。
- b. 用TBST Buffer洗涤4次, 每次5 min。
- c. 继续进行后续曝光操作。

6. 曝光

a. 吸取等体积ECL Solution I 和Solution II 混匀, 配制成发光检测工作液。推荐用量为每10cm²的膜使用1-2 mL发光检测工作液即可。

b. 用镊子将膜取出, 膜的下缘轻轻接触吸水纸, 去除膜上多余的液体。用移液枪吸取工作液并均匀覆盖转印膜, 室温孵育 1-2 minutes, 此步骤可在洁净保鲜膜上或塑料盒中完成。

c. 获取WB结果:

1) 传统压片曝光显影: 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获取最佳信噪比图片。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。

2) 化学发光成像仪获取电子图片: 将膜放置到成像仪内, 参考仪器说明书设置合适的参数以获取优化图片。同时应根据靶蛋白的生物学性质如丰度等来调节成像参数。

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: 5%浓缩胶配方

	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)	1.37	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)	建议转膜条件 (湿转)
$X \leq 10$	恒流200mA, 30min
$10 < X \leq 15$	恒流200mA, 40min
$15 < X \leq 20$	恒流200mA, 50min

$20 < X \leq 50$	恒流200mA, 1kDa/min+20min
$50 < X \leq 100$	恒流200mA, 1kDa/min+30min
$100 < X \leq 150$	恒流250mA, 1kDa/min+20min
$150 < X \leq 180$	恒流270mA, 1kDa/min, 3h以内
$180 < X$	恒流270mA, 1kDa/min, 4h以内

备注：X为目的蛋白大小；以上为建议转膜条件，可根据使用转移设备的转膜效率、目的分子量大小等综合选择合适的转膜条件。针对大分子量或极小分子量蛋白，尤其注意需合理调整转膜液、转膜条件、转膜温度等问题。