

Western Blot 标准操作流程 (SOP)

● 规格: 5 WB Tests/试剂盒 或 10 WB Tests/试剂盒

● 效期: 见试剂盒标签

Mlbio WB湿转Kit

| Components | Quantity/ 5 Tests | Quantity/ 10 Tests | Storage Temp. |
|--|----------------------|-----------------------|----------------------------|
| NC膜 Nitrocellulose membrane | 5 sheet | 10 sheet | Room Temp. |
| 10X 湿转转膜缓冲液 Transfer Buffer(10X) | 500 mL | 1000 mL | Room Temp. |
| Goat anti-mouse IgG (HRP-conjugated) | 10 μ L | 20 μ L | $\leq -20^{\circ}\text{C}$ |
| Goat anti-rabbit IgG (HRP-conjugated) | 10 μ L | 20 μ L | $\leq -20^{\circ}\text{C}$ |

Mlbio WB 半干转Kit

| Components | Quantity/ 5 Tests | Quantity/ 10 Tests | Storage Temp. |
|--|----------------------|-----------------------|----------------------------|
| NC膜 Nitrocellulose membrane | 5 sheet | 10 sheet | Room Temp. |
| Goat anti-mouse IgG (HRP-conjugated) | 10 μ L | 20 μ L | $\leq -20^{\circ}\text{C}$ |
| Goat anti-rabbit IgG (HRP-conjugated) | 10 μ L | 20 μ L | $\leq -20^{\circ}\text{C}$ |

* 备注: 另外部分试剂和溶液需自行准备, ①可参照公开配方自行配制: 细胞裂解缓冲液、电泳缓冲液、封闭液、洗膜缓冲液、2X 蛋白上样缓冲液、阳极转膜液、阴极转膜液等;

②自行购买或准备: 蛋白 Marker、转膜滤纸(湿转滤纸建议用 WB 专用滤纸, 半干转建议用普通滤纸)、甲醇、显影发光液、1M Tris-Cl (pH6.8)、一抗溶液、阳性细胞裂解样品(适用时)等。

③以上自行购买物料中一抗溶液和阳性细胞裂解样品酶联生物均有供应, 客户如有需要可联系酶联生物销售咨询购买。

④试剂盒组份 3 和 4 分别是酶标山羊抗小鼠二抗和酶标山羊抗兔二抗, 需要根据一抗的性质选择使用。

试剂配制

1. 细胞裂解液(按100mL配制量)

| 组分 | 用量 |
|----------------------------|----------------|
| Tris | 0.61 g |
| NaCl | 0.88 g |
| SDS | 0.1 g |
| Triton-X-100 | 1 mL |
| 去离子水 | 至 80 mL |
| 以下试剂应在使用前现配现加: | |
| 用 HCl 调整 pH 值至 7.4 | 补加去离子水至 100 mL |
| 蛋白酶磷酸酶抑制剂 混合物(通用型, 50x) | 2 mL |
| PMSF | 1 mL |

* 备注: 以上组分充分混匀, 待用。

2. 电泳缓冲液(10X)(按1L配制量)

配制 10X 储液, 使用前稀释至 1X。

| 组分 | 用量 |
|------|--------|
| Tris | 30.5 g |
| 甘氨酸 | 144 g |
| SDS | 10 g |
| 去离子水 | 至 1 L |

* 备注: 以上组分充分混匀, 待用。

3. 2X 蛋白上样缓冲液(按300mL配制量)

| 组分 | 用量 |
|--------------------|-------|
| SDS | 12 g |
| 溴酚蓝 | 0.6 g |
| 丙三醇 | 60 mL |
| 1M Tris-Cl (pH6.8) | 30 mL |
| 去离子水定容至300 mL | |
| β -巯基乙醇 | 6 mL |

* 备注: 以上组分充分混匀, 待用。

4. 10X PBS(按1L配制量)

| 组分 | 用量 |
|--|-------|
| NaCl | 80 g |
| KCl | 2 g |
| KH_2PO_4 | 2 g |
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ | 29 g |
| 去离子水 | 至 1 L |

* 备注: 以上组分充分混匀, 待用。

5. 阳极转膜液(按200mL配制量)

| 组分 | 用量 |
|------|---------|
| 甘氨酸 | 21.6 g |
| Tris | 4.6 g |
| 甲醇 | 40 mL |
| 去离子水 | 至200 mL |

*备注：以上组分充分混匀，待用。

6. 阴极转膜液 (按200mL配制量)

| 组分 | 用量 |
|------|---------|
| 甘氨酸 | 2.9 g |
| Tris | 0.6 g |
| 去离子水 | 至200 mL |

*备注：以上组分充分混匀，待用。

7. 1X PBS

取 10X PBS 1 份,加入 9 份去离子水,充分混匀。

8. 洗膜缓冲液

每升 1X PBS 加入 1 mL 的吐温 20,充分混匀溶解即为洗膜缓冲液。

9. 封闭液

每升 1X PBS 加入 1 mL 的吐温 20 与 50 g (5%) 的脱脂奶粉,充分混匀溶解即为封闭液。

样本处理

1. 试剂准备:

- 将细胞裂解液准备好备用(蛋白酶磷酸酶抑制剂需现配现加),如需自配可参照上述配方。
- 将 1X PBS 置于冰上预冷。

2. 细胞裂解:

- 悬浮细胞:

- 从培养箱中取出细胞,在冰上加入细胞裂解液(每 20-30 毫升细胞培养液加入 1 mL 裂解液),充分吹打细胞,避免产生气泡。
- 将培养基倒入离心管中,2-8°C、2000 rpm 离心 5 分钟,回收细胞,弃去培养基。
- 用冷 1X PBS 洗涤细胞 3 次,弃去 PBS,用移液器彻底吸去残余 PBS。

- 半贴壁细胞:

- 用胶头塑料移液管吹打细胞,使其脱离培养瓶底。其余操作同悬浮细胞。

- 贴壁细胞:

- 倒去培养基,加入冷 1X PBS 润洗 3 次,弃去 PBS。最后一次洗涤后彻底吸去残留 PBS。
- 向细胞培养物中加入裂解缓冲液(100 uL/6 孔板每孔或 500 uL/10 cm 培养皿),轻轻摇晃,使裂解缓冲液完全覆盖细胞。
- 在冰上静置 5 分钟(期间轻轻摇晃 1-2 次),用细胞刮将细胞刮下,转移至预冷离心管中。
- 用剩余裂解液润洗培养瓶,转移至预冷离心管中。

- 组织或细胞块:

- 从 -80°C 冰箱中取出组织或细胞块,在冰上化冻。
- 用手术刀将组织或细胞块切碎,根据其质地选择性使用液氮速冻后研磨(适用于骨骼肌、心肌、皮肤、韧带等组织)。
- 加入适量细胞裂解液(具体加入量以将组织研碎而不太稀为标准,可少量多次加入),在冰上用研磨器研磨,直至无明显肉眼可见残留物。

3. 超声裂解:

- 将细胞裂解物均匀分配至 2 mL 离心管中,每管 0.8-1.2 mL,离心管置于冰水浴中。
- 设置超声功率为 60%,超声处理 5 次,每次 2 秒,间隔 20 秒。
- 超声结束后,在显微镜下观察细胞裂解情况,应大部分裂解。

4. 离心:

- 2-8°C,15000 rpm 离心 10 分钟,将上清液(Lysate)转移至预冷离心管中。

5. BCA定量(此步客户可以根据自身的具体需求进行调整):

- 将 Lysate 用细胞裂解液稀释 10 倍。
- 参照 BCA 检测试剂盒的使用方法,测定 Lysate 浓度。
- 根据 BCA 测定的 Lysate 浓度,将其分装成 2 mg/ 管的样品用于后续实验。

注意: 如果无需 BCA 定量可以跳过上述的 3-5 步骤。

- 取含有预期总蛋白量的细胞裂解液与等体积的 2X 蛋白上样缓冲液充分混匀。
- 将样品置于 95-100°C 的金属浴中煮沸 5 分钟,变性蛋白。
- 将样品冷却至室温。
- 短暂离心后即可装样进行电泳。

SDS-PAGE

1. 凝胶准备和上样:

- 安装胶板并加入电泳缓冲液,确保底部无气泡。
- 室温平衡上样样品和蛋白 Marker 30 分钟,混匀后上样,样品推荐上样量为 15-30 µg/ 泳道。
- 当电泳染料前沿接近胶板底部时停止电泳,拆出凝胶。

2. 电泳条件:

- 电流(恒流): 60 mA
- 时间: 直至染料前沿到达胶底部,时间约为 1 小时

凝胶转膜

转膜效率和结果与目的蛋白分子量,转膜仪器,转膜电流有密切关系。用户可根据分子量大小,采取以下两种方法进行转膜,也可根据样品情况两种方法都进行检测。针对 30 kD 以下的目标蛋白检测优先推荐半干法转膜。

▶▶ A. 湿转法

1. 准备工作:

- 配制 1X 湿转转膜缓冲液: 取 100 mL 的 10X 湿转转膜液浓缩液,加入 200 mL 的甲醇,使用去离子水定容至 1 L。
- 在托盘内加入一定量的湿转转膜液,及时把凝胶放入转膜液中,转膜液需没过凝胶。
- 裁剪 NC 膜,使其与凝胶大小匹配。

2. 转膜装置组装:

- 湿转转膜液中放置好转膜夹,阴极在下,依次放入:海绵、湿转转膜滤纸、凝胶、NC 膜、湿转转膜滤纸、海绵,阳极在上,每层之间排除空气泡。
- 将转膜夹插入电转槽中,阴极对阴极,阳极对阳极。在电转槽的两个空位中放入冰盒,加入 1X 湿转转膜缓冲液,使液面覆盖转膜夹。

3. 转膜条件:

- 电流(恒流): 200 mA
- 时间: 视蛋白分子量大小而定,推荐如下:

| 分子量范围 (kD) | 建议转膜时间 |
|------------|------------|
| 34~55 | 40~45 分钟 |
| 55~72 | 50~55 分钟 |
| 72~130 | 1 小时 |
| 130~250 | 1 小时 15 分钟 |
| >250 | 1 小时 30 分钟 |

* 注: 分子量越大, 转膜所需时间越长。建议根据自身实际情况摸索最适合的转膜时间。

▶▶ B. 半干转法

1. 准备工作:

- 根据胶大小裁出 NC 膜。

2. 转膜装置组装:

- 使用阴极转膜液润湿转膜槽阴极, 依次放入 9 层半干转膜滤纸(使用阴极转膜液浸润)、凝胶(使用阴极转膜液浸泡平衡)、NC 膜(使用阳极转膜液浸泡润湿)、9 层半干转膜滤纸(使用阳极转膜液浸润)、转膜槽阳极(预先使用阳极转膜液润湿)。

3. 转膜条件:

- 电流(恒流): 80 mA
- 时间: 3 小时
- 温度: 室温

注意事项:

- 转膜液必须现配现用。
- 转膜所需的转膜槽, 托盘, 架子, 镊子等仪器必须干净, 转膜过程应带干净手套操作, 避免外源蛋白污染。

抗体检测

1. 准备工作:

- 洗膜缓冲液配置: 每升 1X PBS 加入 1 mL 的吐温 20, 混匀溶解即为洗膜缓冲液。
- 显影发光液配置: A 液与 B 液 1:1 混匀配置, 本溶液请在显影前现配现用。(显影发光液应该在使用前进行配置, 如果提前配置可能会导致背景过高。)
- 一抗溶液: 使用封闭液稀释一抗。
- 二抗溶液: 使用适量封闭液或洗膜缓冲液按说明书推荐比例稀释 HRP 二抗。

2. 封闭:

- 从转膜夹上取下 NC 膜, 放入去离子水中漂洗一次。
- 将 NC 膜放入封闭液中, 封闭液用量以盖过 NC 膜为准, 室温封闭 1 小时或于 2~8°C 下过夜。

3. 洗膜:

- 将洗膜缓冲液倒入容器中, 放入封闭好的 NC 膜, 左右摇晃后倒出洗膜缓冲液。

4. 一抗孵育:

- 将洗涤好的 NC 膜放入一抗溶液中, 使其结合蛋白的一面朝上, 确保抗体溶液可完全覆盖 NC 膜。
- 室温摇动孵育 1 小时, 或 2~8°C 孵育过夜。

5. 洗膜:

- 取出 NC 膜, 使用洗膜缓冲液摇动漂洗膜 5 分钟, 共重复三次。

6. 二抗孵育:

- 将洗涤好的 NC 膜放入二抗溶液中, 使其上结合蛋白的一面朝上, 确保抗体溶液可完全覆盖 NC 膜。
- 室温摇动孵育 1 小时。

7. 洗膜:

- 取出 NC 膜, 使用洗膜缓冲液摇动漂洗膜 5 分钟, 共重复三次, 以去除所有未结合的二抗。

8. 显影:

- 使用显影发光液孵育印迹膜 30 秒, 将印迹膜从底物工作液中取出, 用镊子夹住一角, 使膜自然垂下, 以去除多余的发光液, 可使用吸水纸或滤纸等纸张吸去膜上多余的发光液。
- 将印迹膜置于透明塑料膜上或方皿上, 注意膜与支撑物之间不要有气泡。
- 使用成像系统进行印迹成像。

注意事项:

- 确保所有试剂新鲜配制, 缓冲液 pH 值正确。
- 使用干净、无外源蛋白的实验用具, 防止污染。
- 小心处理 NC 膜, 避免撕裂和污染。
- 洗膜过程中, 洗膜缓冲液不可重复使用。
- 说明书提供的稀释比为参考值, 客户可根据自身需求设置不同比例的稀释比以达到最佳实验结果。
- 当使用动物组织时或者血液时, 内源性抗体是造成非特异条带的重要因素之一, 通常可设置无一抗对照, 仅用二抗与膜孵育, 以排除组织中内源性的抗体干扰。
- 根据 WB 样本和一抗种类选择二抗。
- 发光液需避光保存, 现用现配。
- 将发光液淋在膜上直接显影往往造成较高的背景。