

## 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. 3% 脱脂牛奶: 将skimmed milk powder (RM00014) 加入到1xTBST中, 配置成3% 脱脂牛奶
- d. Bovine Serum Albumin (BSA) (RM02802)
- e. HRP 偶联二抗 (根据一抗情况选用, AS014/AS003等可供选择)
- f. 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， $4^{\circ}\text{C}$ ， $400\times g$  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， $4^{\circ}\text{C}$ ， $400\times g$  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， $4^{\circ}\text{C}$ ， $13000\times g$ 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×Loading Buffer（最终工作液为1×），待干式恒温器温度升至 $95^{\circ}\text{C}$ 后，将1.5mL离心管插入加热孔中， $95^{\circ}\text{C}$ 加热变性10min，待液体完全冷却后置于 $-20^{\circ}\text{C}$ 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  $\mu$ L 蛋白标准品（5 mg/mL BSA）稀释至50  $\mu$ L，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、20  $\mu$ L加入到96孔板中，加稀释液补足到20  $\mu$ 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  $\mu$ L，需加稀释液补足到20  $\mu$ L。每孔加入 200  $\mu$ L BCA工作液，37℃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25  $\mu$ g/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

a. 转膜缓冲液可提前2h（即开始电泳后）放入-20℃冰箱预冷。

b. 根据胶的面积大小，将滤纸以及NC膜剪裁至合适尺寸。

c. 建议目的蛋白大于20kDa可选择0.45  $\mu$ m NC膜；目的蛋白小于20kDa可选择0.2  $\mu$ m的NC膜或0.22  $\mu$ 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，无白点即可放入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

- 将一抗用3% 脱脂牛奶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。
- TBST Buffer洗涤4次，每次5min。
- 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。
- TBST Buffer洗涤4次，每次5min。
- 继续进行后续曝光操作。

### (2) 对于偶联有HRP的一抗

- 将一抗用3% 脱脂牛奶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。
- 用TBST Buffer洗涤4次，每次5 min。
- 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10cm<sup>2</sup>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 min，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 30s、60s、180s、300s，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。

| 1mg/ml BSA ( μ L) | 稀释液 ( μ L) | 对应蛋白量 (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：分离胶浓度选择

| 分子量 (kDa)         | 分离胶浓度 |
|-------------------|-------|
| $X \leq 10$       | 15%   |
| $10 < X \leq 15$  | 13.5% |
| $15 < X \leq 25$  | 12%   |
| $25 < X \leq 35$  | 11%   |
| $35 < X \leq 40$  | 10%   |
| $40 < X \leq 55$  | 9%    |
| $55 < X \leq 70$  | 8%    |
| $70 < X \leq 100$ | 7%    |
| $100 < X$         | 6%    |

备注：X为目的蛋白大小

附表3：分离胶配制

|           | 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)<br>（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)<br>（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。