

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

Absea WB湿转Kit (货号:WK-001)

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	$\leq -20^{\circ}\text{C}$

Absea WB 半干转Kit (货号:WK-002)

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爱博生均有供应, 客户如有需要可联系爱博生销售咨询购买。

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：

- 将细胞裂解液均匀分配至 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。

6. 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。

7. 将样品置于 95-100°C 的金属浴中煮沸 5 分钟，变性蛋白。

8. 将样品冷却至室温。

9. 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。