Western Blot 实验步骤

原理：蛋白质印迹法（免疫印迹试验）即 Western Blot。它是分子生物学、生物化学和免疫遗传学中常用的一种实验方法。其基本原理是经过 PAGE(聚丙烯酰胺凝胶电泳)分离的蛋白质样品，转移到固相载体（例如硝酸纤维素薄膜 NC 膜）上，固相载体以非共价键形式吸附蛋白质，且能保持电泳分离的多肽类型及其生物学活性不变。以固相载体上的蛋白质或多肽作为抗原，与对应的抗体起免疫反应，再与酶或同位素标记的第二抗体起反应，经过底物显色或放射自显影以检测电泳分离的特异性目的基因表达的蛋白成分。

流程图：

蛋白提取 → 浓度测定 → 电泳 → 转膜 → 封闭 → 一抗二抗孵育 → 曝光

一、蛋白提取（以细胞样品为例）

1. 用冰预冷 PBS 洗涤细胞一次，加入 200 uL RIPA 裂解液（AWB0136），用细胞刮刀刮下细胞，收集悬液，超声破碎 1.5min。
2. 冰上，裂解 10min；
3. 4℃，12000 rpm 离心 15 min。（提前开离心机预冷）
4. 将离心后的上清转移倒 1.5mL 的离心管中备用；

二、蛋白浓度测定

按照 BCA 蛋白定量试剂盒（AWB0104）使用说明操作，测定蛋白浓度。

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

2. 配制标准品：标准品用 RIPA 裂解液（或者和待测样品一致的稀释液）按照 50%梯度稀释。

3. 按照 BCA 蛋白定量试剂盒操作步骤进行到测定，并根据标准曲线计算出待测样品的蛋白浓度

三、电泳

1. 根据目的蛋白分子量(MW）配制 SDS-PAGE 胶(AWB0057)备用。

2. 在 EP 管中制备样品。按照蛋白样品和蛋白上样缓冲液（AWB0055）按 4:1 混合，沸水煮 5min，以充分变性蛋白，放入冰盒中速冷备用。

3.上样：左边第一孔加入蛋白 marker（AWB0236） 2 uL，其它每孔上样 10-20 uL。以蛋白定量结果为准，使每个孔总蛋白质量统一为 20~40ug。

4. 加入到 1X 电泳缓冲液（AWB0085）中，开始电泳，电泳恒定电压 80V，直至蛋白质迁移出浓缩胶区域， 再将电压调至 140V，继续电泳直至溴酚蓝迁移到分离胶底部 0.5cm 处，关闭电源。

四、转膜

1. 按照分子量分别切胶，并裁剪好转膜用的滤纸和 NC 膜，浸泡在 1X 转膜缓冲液中（AWB0207）

2. 按照 3 张滤纸+NC 膜+胶+另 3 张滤纸的顺序依次放好，要求中间没有气泡。

3. 盖上仪器，接通电源，300 mA 恒定电流转膜，根据蛋白分子量大小确定转膜时间，比如内参 actin，42kDa 转膜 60min。

4. 转膜完毕后，将膜取出放入 1*TBST（AWB0191）中洗 1 次。

五、封闭

将膜取出后，浸入 Western 封闭液（AWB0214）中，摇床上室温摇晃封闭 60min。

六、一抗二抗孵育

1. 根据抗体推荐稀释比例，用抗体稀释液（AWB0199）稀释一抗，将膜与一抗一起孵育，4℃过夜

2. 第二天，取出，室温恢复 30min。

3. 1*TBST 洗 3 次，每次 10min。

4. 用 1*TBST 稀释 HRP 标记的二抗，将稀释后的二抗与膜共同室温孵育 90min。

5. 孵育结束，1*TBST 洗 3 次，每次 15min。

七、显色曝光

1. 配制 ECL 发光液工作液：根据 ELC 发光液试剂盒（AWB0005）操作说明配制工作液

2. ECL 显色曝光：使用 ECL 化学发光液与膜充分反应，用滤纸吸尽多余液体，用塑封膜将膜包裹杂交膜，凝胶成像系统成像。