

Western Blot

宗伟, 程赛凤, 马斯琦, 熊立仲*

作物遗传改良国家重点实验室, 华中农业大学, 武汉

*通讯作者邮箱: lizhongx@mail.hzau.edu.cn

引用格式: 宗伟, 程赛凤, 马斯琦, 熊立仲. (2018). Western Blot. *Bio-101* e1010130. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010130.

How to cite: Zong, W., Cheng, S. F., Ma, S. Q. and Xiong, L. Z. (2018). Western Blot. *Bio-101* e1010130. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010130. (in Chinese)

实验原理: 通过 SDS-PAGE 将不同分子量大小的蛋白分开后, 将蛋白转移到固相载体 (例如 PVDF 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。

实验目的: 作为一个基础性的实验, 其主要目的是检测目的蛋白的特异性及丰度。

关键词: 蛋白质, Western, SDS-PAGE, 免疫反应

材料与试剂

1. 培养皿
2. 滤纸
3. PVDF 膜
4. 冷冻盒(冰盒)
5. 海绵
6. 保鲜膜
7. 各种型号的枪头
8. Ep 管
9. 辣根过氧化物酶(HRP)底物 (Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific, catalog number: 34077)
10. 显影液、定影液 (国产试剂, 按照其说明书配制)

11. SDS
12. 过硫酸胺(AP)
13. Tris base (FW: 121.14)
14. 浓盐酸
15. TEMED (N,N,N',N'-四甲基乙二胺)
注: TEMED 催化过硫酸铵形成自由基而加速两种丙烯酰胺的聚合。pH 太低时, 聚合反应受到抑制。
16. Tris-HCl
17. Glycerol
18. Bromophenol Blue
19. 甘氨酸
20. 甲醇
21. NaCl
22. KCl
23. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
24. KH_2PO_4
25. BSA (牛血清白蛋白)
26. 脱脂奶粉
27. Tween-20
28. ddH₂O
29. 30% [丙烯酰胺: N,N'-亚甲双丙烯酰胺=29:1 (BioRad, catalog number: 161-0156) 或 37.5:1 (BioRad, catalog number: 161-0158)]
注: 一般情况下两种比例都可以使用, 都可以在 BioRad 公司购买。为节约实验成本, 也可以自己配制, 方法 (以 29:1 为例) 见溶液配方 1。
30. 10% SDS (十二烷基磺酸钠) (w/v) (见溶液配方)
31. 10% AP(过硫酸胺) (w/v) (见溶液配方)
32. 1.5 mol/L Tris-HCl (pH 8.8) (见溶液配方)
33. 0.5 M Tris-HCl (pH 6) (见溶液配方)
34. 4x 蛋白上样缓冲液 (见溶液配方)
35. 10x Tris-甘氨酸电泳缓冲液 (见溶液配方)

36. 10x Tris-甘氨酸电泳缓冲液 (见溶液配方)
37. 转膜缓冲液 (见溶液配方)
38. 磷酸缓冲液 (PBS) (见溶液配方)
39. 分离胶配方 (见溶液配方)
40. 浓缩胶配方 (见溶液配方)
41. 封闭液配方 (见溶液配方)

仪器设备

1. 剪刀
2. 玻璃板
3. 超净工作台
4. 移液器
5. 摇床
6. 冰柜
7. Mini-PROTEAN® Tetra System (Bio-Rad) (电泳架, 梳子, 转膜槽, 电泳槽, 玻璃板, 切胶板等)

实验步骤

注: 使用 *Bio-Rad* 的 *Mini-PROTEAN® Tetra System* 进行以下操作。

一、SDS-PAGE

1. 加入少量洗涤剂清洗制胶用的玻璃板(Bio-Rad, 厚度: 1 mm & 0.75 mm)将洗净后的玻璃板竖直放于超净台上吹干。
2. 将吹干后的玻璃板装好后(底部对齐)放在制胶架上。在离心管中制备分离胶 (见溶液配方 10)。
3. 用移液器小心将配制好的分离胶, 加到玻璃板中至顶端 1.5-2 cm 处, 之后小心加入 ddH₂O 封胶 (加至玻璃板顶端), 使分离胶上方平整。室温下放置至出现分界线即可, 制备浓缩胶。
4. 将制胶用的梳子清洗干净, 晾干后备用。
5. 小心用滤纸将分离胶上面的 ddH₂O 吸干, 在离心管中制备浓缩胶 (见溶液配方 11)。

6. 小心但快速的将浓缩胶加到玻璃板中的分离胶上，加满后立即小心的插入梳子，室温放置梳子与胶之间出现界限即可。
7. 将玻璃板从制胶架上取下后，装入电泳架，小心、直立的将梳子拔出，之后用 ddH₂O 冲洗点样孔，去除可能没有聚合的丙烯酰胺单体。
8. 向电泳架中加满新配制的 1x Tris-甘氨酸电泳缓冲液（见溶液配方 7），电泳架下方的 1x Tris-甘氨酸电泳缓冲液可重复使用多次。
9. 蛋白样品的准备，取待检测样品，加入终浓度为 1x 的蛋白上样缓冲液，混匀后，95 °C 以上变性 5 min，之后立即置于冰上冷却 2 min 以上，室温下 12,000 rpm 离心 3 min 后取适量点样，并根据要研究蛋白的大小选择合适的蛋白 Marker，取 3-5 μ l 上样。

注：

- 1) 蛋白的上样量不能超过点样孔的体积，一般不要超过点样孔体积的 2/3，否则容易溢出到邻近孔中。
 - 2) 蛋白 Marker 有未染色和预染的两种，预染的 marker 在电泳时可以清晰的看到 Marker 的条带，便于准确的监控蛋白分离的程度，此外，在后续蛋白转膜的过程中，也可作为一种指示物来检测蛋白转膜的效率，但价格较未染色的贵一倍。
10. 恒压蛋白电泳，开始时，在浓缩胶中用 100-120 V 电泳，待蛋白移动至分离胶中后可增加电压到 120-150 V 电泳。根据 Marker 的位置来确定蛋白分离的程度，以最大化的分离目标蛋白。
 11. 蛋白电泳开始后，准备转膜和后续杂交的物品和试剂。将转膜槽中的冷冻盒装满水(4/5 位置)后放入-70 °C 冰箱冷冻。配制转膜缓冲液（见溶液配方 8），配好后将其放入 4 °C 预冷，待用；配制 PBS 溶液（见溶液配方 9），短期使用可直接放置到室温下，长期放置须高温高压灭菌后保存在室温下。

二、蛋白转膜

1. PVDF 膜的预处理，在胶跑完前 30 min，将 PVDF 膜剪裁至合适大小，并在右上角剪一个角，然后在膜的右下角用记号笔或铅笔做一个简单的标记以说明此张膜的内容。准备干净的培养皿，其加入适量预冷的转膜缓冲液，另一个加入 ddH₂O。用镊

子小心的将膜夹起在甲醇中浸湿 10-15 sec, 然后立即转移 至 ddH₂O 中稍作漂洗, 之后将膜转移至冰上的转膜缓冲液中平衡 20-30 min。

2. 凝胶的处理, 胶跑好后, 拆开电泳槽, 将玻璃板小心撬开后, 用切胶板切去浓缩胶, 之后将分离胶小心转移至冰上的转膜缓冲液中平衡 10 min。

注:

- 1) 如果确切的知道目标蛋白的大小, 可只将对应大小的胶切开后再平衡, 这样可以节约 PVDF 膜, 也可以在一个转膜板上同时转几块胶。
- 2) 凝胶在转膜缓冲液中平衡的时间不能太长, 否则凝胶膨胀会导致胶变形, 影响对转膜结果的判断。

将转膜用海绵、厚滤纸在预冷的转膜缓冲液中充分浸湿, 之后按照下图所示在预冷的转膜液中安装好, 放入转膜装置中, 之后放入事先冰冻好的冰冻盒, 再向转膜装置中加满预冷的转膜缓冲液。之后将整个转膜装置置于一个大冰盒中, 周围用冰填充, 200 mA 恒流转膜 2 h。(转膜时间及电流大小选择依据目标蛋白大小而定, 一般恒流 200 mA-250 mA) (见图 1)

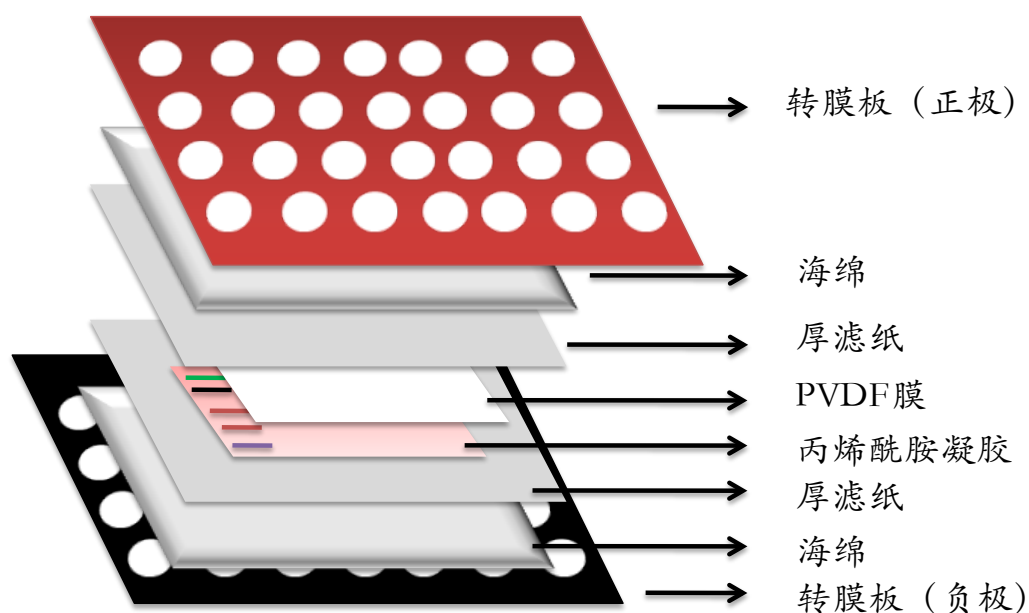


图 1. 三明治转膜结构示意图

3. 封闭, 转膜完成前 15 min, 配制封闭液 (见溶液配方 12)。

4. 转膜后将膜小心放入封闭液中，摇床上轻微摇晃，室温下封闭 1-1.5 个小时，或 4 °C 封闭过夜。

注：如果转膜之后不立即进行封闭以及后续操作，可将膜直接以保鲜膜包好放于 4 °C。

5. 加一抗，按照和封闭液一样的配方配制一定量的封闭液(如 20 ml)，然后加入对应比例的一抗 (待检测蛋白的抗体或相关标签的抗体) 混匀后，将封闭液中的膜迅速转移至一抗中，摇床上轻微摇晃，室温下杂交小时或者将摇床搬至冰柜中，在 4 °C 杂交过夜。

注：

- 1) 一抗的比例与 **Western Blot** 结果的“美观”相关性较大。因此如果第一次使用某一个蛋白的抗体，可以先用不同的封闭条件来尝试，一抗稀释的比例根据抗体的类型，抗血清：1:500-1:2,000，纯化的抗体：1:1,000-1:5,000，商业化的抗体：1:2,000-1:10,000。
- 2) 一抗孵育之后，可以加入一定量的叠氮化钠 (终浓度，0.02%) 或者在配制一抗溶液时就加入含有 0.02% 叠氮化钠的 PBS 配制，之后在 4 °C 保存。
6. 洗膜，将膜快速的从一抗中取出，以 PBS/PBST 溶液交替洗膜 10 min/次，5-6 次。
7. 加二抗，按照和封闭液一样的配方配制一定量的封闭液(如 20 ml)，根据一抗的种类选择对应的二抗，然后加入对应比例(如 2 μ l，1:10,000)的二抗，混匀，立即将洗好的膜加入到二抗溶液中，摇床上轻微摇晃，室温下杂交 1-2 小时 (不建议二抗过夜杂交)。

注：

- 1) 二抗的浓度会影响到 **Western Blot** 结果的“美观”，因此，根据实验结果，如果背景、杂带较多，可以考虑增加二抗的稀释倍数来优化实验结果。
- 2) 二抗上带有的标签会直接影响到后续的检测手段，这里以最常用的辣根过氧化物酶(HRP) 标签来做。
8. 洗膜，将膜快速的从一抗中取出，以 PBS/PBST 溶液交替洗膜 10 min/次，5-6 次。

9. 显影, 将洗好的膜浸泡在 PBS 中带到暗室, 此外, 准备一下物品: 剪刀、镊子、小块的滤纸、保鲜膜、移液器、枪头、Ep 管、辣根过氧化物酶(HRP)底物(Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific)、X-光片(富士)、显影液、定影液 (国产试剂, 按照其说明书配制)。
10. 先将保鲜膜铺在台面上, 然后将 PVDF 膜放在保鲜膜上, 用小块的滤纸将 PVDF 膜表面的水擦干, 在黑暗条件(安全红灯下)下配制显色底物, 取少量试剂盒中两种试剂等体积混合后, 用枪加到 PVDF 膜表面, 之后用枪头把显色底物小心涂抹均匀 (如果信号较强, 肉眼则可以看到绿色的荧光), 用保鲜膜小心、平整的将膜覆盖一次, 将剪裁好的 X-光片, 平整的压在 PVDF 膜上, 不要移动, 等待一段时间后迅速的移开, 放入预先倒出来的显影液中, 不停的摇晃显影液盒待其条带清晰后, 移到水中漂洗下后, 然后立即放入到定影液中。

注:

- 1) 切勿直接将 X-光片直接压在 PVDF 膜上, 一定要先盖一层保鲜膜使 PVDF 膜和 X-光片分开, 否则整个实验都会失败。
- 2) X-光片、显影液一定得在黑暗条件下或安全红灯下打开, 否则会使整包 X-光片曝光而报废, 显影液也会因此而变黑、失效。
- 3) X-光片在膜上压的时间根据荧光信号的强度来定, 一搬如果手动压 5-10 min 仍然没有信号, 可以换用暗夹来操作, 但是荧光信号的发光也是有时间限制的, 一般可以维持两个小时。
- 4) 为了得到一张曝光程度正好的 X-光片, 可以同时几张 X-光片叠加在一起压片, 这样可以从中选择一张比较好的。

溶液配方

1. 30%丙烯酰胺配方(29:1)

在通风厨中称取 29 g 丙烯酰胺和 1 g N, N-亚甲叉双丙稀酰胺, ddH₂O 溶解后, 定容至 100 ml。用干净的滤纸过滤至棕色瓶中, 置于 4 °C 保存。

2. 10% SDS (十二烷基磺酸钠) (w/v)

称取 10 g SDS 粉末

加 ddH₂O 至 100 ml

溶解后，高温高压灭菌后待用

3. 10% AP(过硫酸胺) (w/v)

称取 0.1 g 粉末

加入 1.5 ml Ep 管中

再加 ddH₂O 至 1 ml 刻度处

混匀后置于制胶架上待用

注：AP 提供两种丙稀酰胺聚合所必须的自由基。

4. 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)

18.17 g Tris base (FW: 121.14)和 70 ml ddH₂O

用浓盐酸调至 pH 8.8

加 ddH₂O 定容至 100 ml

用干净的滤纸过滤后室温保存

5. 0.5 mol/L Tris-HCl (pH 6.8)

6.07 g Tris base 和 70 ml ddH₂O

用浓盐酸调至 pH 6.8

加 ddH₂O 定容至 100 ml

用干净的滤纸过滤后室温保存

6. 4x 蛋白上样缓冲液(Laemmli buffer)

终浓度

For 100 ml

250 mM Tris-HCl, pH 6.8

50 ml (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8)

40% (v/v) Glycerol

40 ml (100% Glycerol)

5% (p/v) SDS

5 g

0.005% (p/v) Bromophenol Blue

5 mg

7. 10x Tris-甘氨酸电泳缓冲液(1 L)

Tris base

30.3 g

甘氨酸

144 g

SDS

10 g

加 dH₂O(蒸馏水)定容至 1 L，用前稀释至 1x 使用。

8. 转膜移缓冲液 (1 L)

终浓度

2.9 g 甘氨酸	39 mmol/L
5.8 g Tris base	48 mmol/L
0.37 g SDS	0.037%
200 ml 甲醇	20%

加 ddH₂O 定容至 1 L，储存于 4 °C 待用

9. 磷酸缓冲液(PBS) (2 L)

16 g	NaCl
0.4 g	KCl
7.256 g	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O
0.48 g	KH ₂ PO ₄

NaOH 或 HCl 调至 pH 7.4，加 ddH₂O 定容至 2 L

10. 分离胶配方:

分离胶	16.50%	15%	12%	10%		15%	12%	10%
Glass Plate	1 mm					0.75 mm		
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	1.25 ml	1.25 ml	1.25 ml	1.25 ml		1 ml	1 ml	1 ml
ddH ₂ O (fresh)	0.95 ml	1.2 ml	1.7 ml	2.05ml		0.96 ml	1.36 ml	1.64 ml
30% Acrylamide/Bis	2.75 ml	2.5 ml	2 ml	1.65 ml		2 ml	1.6 ml	1.32 ml
10% SDS	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl		40 µl	40 µl	40 µl
10%AP	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl		20 µl	20 µl	20 µl
TEMED	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl		2 µl	2 µl	2 µl
Total	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml		4ml	4 ml	4 ml

注:

- 1) 丙烯酰胺具有很强的神经毒性，并可通过皮肤吸收，其作用具有积累性，配制和使用时应戴手套操作。聚丙烯酰胺无毒，但也应谨慎操作，因为有可能还有少量的未聚合的成份。
- 2) 表中都是按一块胶的量来计算的，每块 1 mm 厚的凝胶总体积为 5.6 ml，每块 0.75 mm 厚的凝胶总体积为 4.2 ml，如一次需制备多块凝胶，按比例扩大即可。

11. 浓缩胶配方

浓缩胶	5%	
Glass Plate	1 mm	0.75 mm
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	0.625 ml	0.375 ml
ddH ₂ O (fresh)	1.425 ml	0.855 ml
30% Acrylamide	425 μ l	255 μ l
10% SDS	25 μ l	15 μ l
10% AP	12.5 μ l	7.5 μ l
TEMED	5 μ l	3 μ l
Total	2.5 ml	1.5 ml

12. 封闭液

含 2% (m/V) BSA 或 3%-5%脱脂奶粉的 PBST 溶液 (PBS 中按 1:500-1:1,000 加入 Tween 20)

注：按照需要选择合适的封闭液类型，或者也可以选用 TBST，即 Tris 缓冲液代替 PBS。