

实验报告书

项目名称: **Western blotting** 检测组织中蛋白表达

客户姓名:

合同号:

项目负责人

一、 实验仪器与试剂

表格一：实验仪器

仪器	厂家	型号
小型垂直电泳槽	Biorad	164-8001
转印槽	Biorad	Trans-Blot
脱色摇床	常州澳华	TY-80B
电泳仪	上海天能	EPS-200
低温高速离心机	64R	BECKMAN
酶标仪	Thermo Scientific	Multiskan Spectrum

表格二：试剂

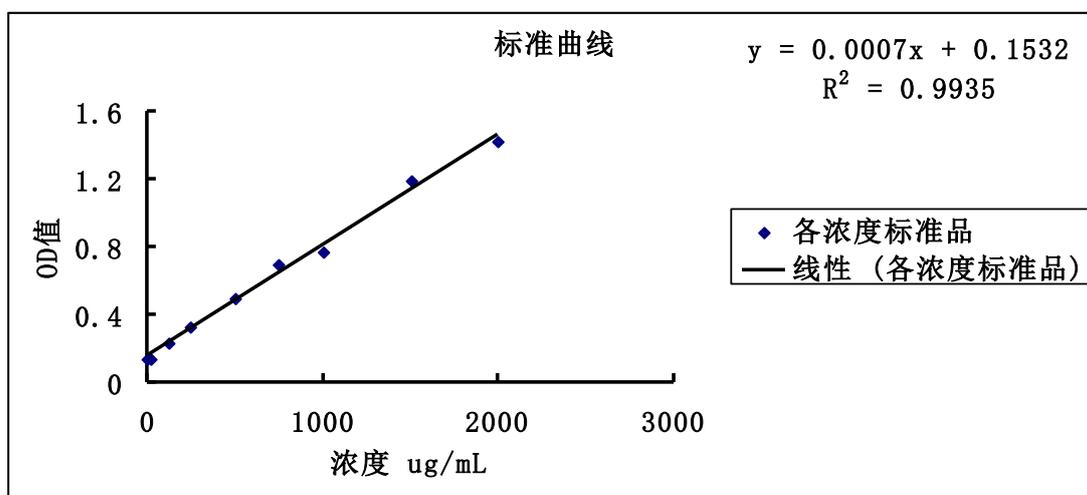
试剂	厂家
RIPA 裂解液	碧云天
PMSF	Amresco
BCA 蛋白定量试剂盒	Thermo
Tris	Amresco
甘氨酸	Amresco
盐酸	国药集团
甲醇	国药集团
Tween 20	国药集团
SDS	国药集团
TEMED	Sigma
BSA	Sigma
PVDF 膜	Millipore
HRP 标记的羊抗小鼠二抗	联科生物
化学发光检测试剂	Thermo
GAPDH 鼠单克隆抗体	联科生物
预染蛋白 marker	碧云天
X 光胶片	柯达

二、 实验步骤

1、组织中蛋白上清液的制备和浓度测定

- (1) 把组织剪切成细小的碎片；
- (2) 加入 200 μ L 裂解液，在匀浆机中研磨，直至裂解液中组织消失；
- (3) 充分裂解后，12000rpm 离心 5min，取上清。
- (4) 取部分上清蛋白用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度，按如下步骤：

- ①按试剂盒说明书将 A 液和 B 液以 50: 1 的比例配制成工作液;
- ②取 2000 $\mu\text{g/mL}$ 的 BSA 标准品, 用 PBS(pH 7.4)稀释成 2000 $\mu\text{g/mL}$ 、1500 $\mu\text{g/mL}$ 、1000 $\mu\text{g/mL}$ 、750 $\mu\text{g/mL}$ 、500 $\mu\text{g/mL}$ 、250 $\mu\text{g/mL}$ 、125 $\mu\text{g/mL}$ 、25 $\mu\text{g/mL}$ 、0 $\mu\text{g/mL}$ 共 9 个浓度梯度;
- ③取上清液 10 μL , 用 PBS 稀释 20 倍;
- ④每管中加 20 μL 蛋白标准品或稀释后的上清液, 再加上上述工作液 0.2mL, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30min, 562nm 处测吸光度, 记录 OD 值;
- ⑤根据蛋白标准品的浓度及相应 OD 值绘制标准曲线:



根据标准方程计算样品总蛋白浓度 (mg/mL)

样品	1	2	3	4	5	6	7	8	9
OD 值	0.817611	0.438412	0.657716	0.675617	0.362568	0.817774	0.688089	0.477546	0.627511
	0.991314	0.517018	0.814846	0.748083	0.460470	0.622999	0.574448	0.404516	0.700393
均值	0.904462	0.477715	0.736281	0.711850	0.411519	0.720386	0.631268	0.441031	0.663952
浓度 mg/mL	21.46	9.27	16.66	15.96	7.38	16.21	13.66	8.22	14.59

2、Western-Blot 检测总蛋白中目的蛋白表达。

(1) 灌胶

- ①蒸馏水清洗灌胶玻璃板, 竖直晾干。
- ②配制 13%分离胶 10mL, 加 TEMED10 μL 、10%过硫酸铵 100 μL , 混匀后立即灌胶, 灌至齿梳下缘 2~3mm (事先做好标记), 用异丙醇封闭液面以去除气泡并隔绝空气, 室温静置 45min 待胶完全聚合。

- ③待分离胶完全聚合后，倾去其顶部的去离子水，用滤纸将水吸干。
- ④配制 4%浓缩胶 5 mL，加 TEMED 5 μ L、10%APS 50 μ L，混匀立即灌胶，灌至顶部，并垂直插入 Teflon 齿梳，室温静置 20 min 待胶聚合。
- ⑤待胶完全聚合后拔出梳子，将凝胶置于电泳槽中，加入电泳缓冲液，用电泳缓冲液冲洗上样孔以去除气泡。

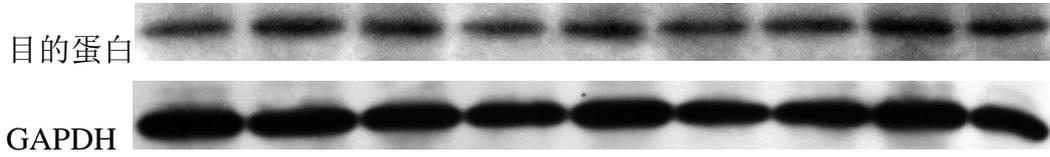
(2) 电泳

- ①取各个处理组蛋白提取液，调整蛋白浓度为 6 μ g/ μ L，和等体积 2 \times 上样缓冲液混合，即为上样液。
- ②将上样液于 100 $^{\circ}$ C 沸水中煮沸 5min，使蛋白变性，冰上骤冷，3000 转/min 离心 1min。
- ③每孔加上样液 15 μ L，留一孔加 10 μ L 预染的 Marker。加满电泳缓冲液，盖上槽盖，接通电源，先用 80v 恒压电泳，约 20min，当指示剂溴酚蓝进入分离胶后改用 110v 恒压电泳，当指示剂到达距凝胶下端约 0.5cm 处时关闭电源，取出胶板。

(3) 转印蛋白及免疫检测

- ①在电泳即将结束前，预先将 PVDF 膜浸泡在甲醇中 15s，然后用 ddH₂O 漂洗 2min，浸泡于转移缓冲液中 5min 后开始后续操作。
- ②在水中撬胶，修胶后将胶浸泡于转移缓冲液中平衡 15min。
- ③按黑面（负极）→海绵→滤纸→胶→PVDF 膜→滤纸→海绵→红面（正极）的顺序制备转膜“三明治”，每层铺好后先赶走气泡再铺另一层。在转移缓冲液中制备三明治可避免气泡的产生。
- ④接上正负极，按膜向正极的方向将转移盒放入电转仪中，加入转膜缓冲液。
- ⑤将电转仪置于冰水中，100V 恒压转膜 1h。
- ⑥转膜结束后，快速取出 PVDF 膜，放入 5%BSA 室温封闭 2h。
- ⑦取出膜，于摇床上用 TBST 洗膜 5min \times 3 次。
- ⑧孵育袋中加入 TBST 稀释的一抗（1：500）4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。
- ⑨TBST 洗膜 5min \times 3 次，辣根过氧化物酶（HRP）标记的羊抗小鼠二抗（1：3000），室温孵育 1h。
- ⑩TBST 洗膜 10min \times 3 次。膜于化学发光检测试剂反应至暗处出现亮条带，取出膜，甩去多余的液体，用保鲜膜包好 PVDF 膜，暗室中用 X 胶片感光、显影、定影。

三、 实验结果



样本编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
目的蛋白	6602	5696	13726	7770	13600	12574	21220	16237	4175
GAPDH	48888	40549	37709	31531	39644	28507	32620	40223	25951
目的蛋白 /GAPDH	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	0.135	0.1405	0.364	0.2464	0.3431	0.4411	0.6505	0.404	0.1609

