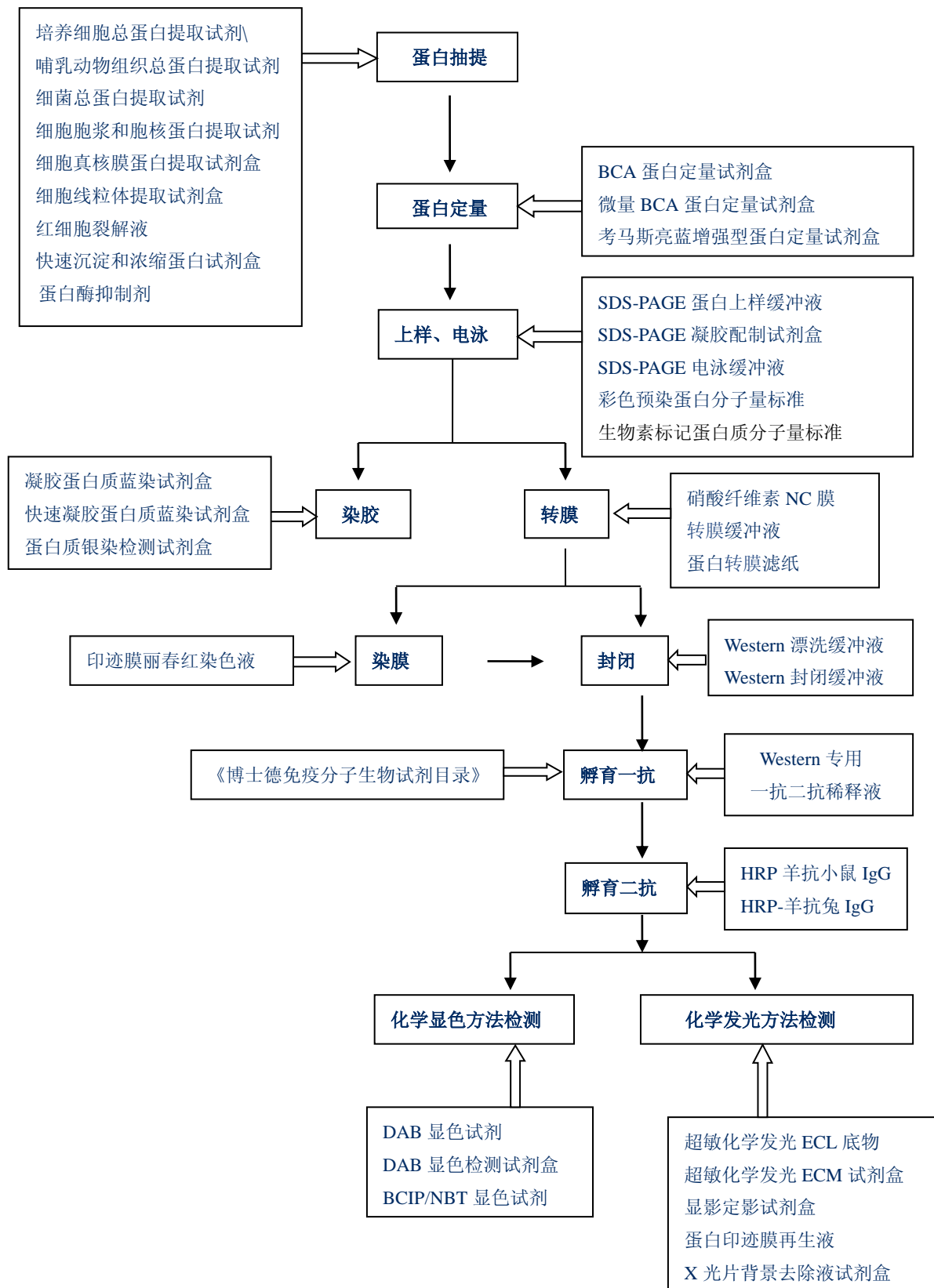




WB 实验流程



WB 实验流程图



Western blotting 实验详细步骤：

一、 蛋白样品的制备（蛋白抽提）

1. 培养细胞蛋白样品的制备

（1）细胞培养至 80%左右密度时，以含 0.05%胰蛋白酶（AR1007）消化经细胞刮处理，细胞经预冷的 PBS(AR0030)漂洗两次，3000 g/min 离心 2-3 分钟。去除上清，向沉淀中加入 5-7 倍沉淀体积的博士德培养细胞总蛋白提取试剂（AR0103），反复吹打混匀。

（2）若有粘稠物存在可用超声细胞破碎仪超声处理，超声时间为 2 秒，间歇 2 秒，功率为 100-120 瓦，至溶液无粘稠为止。处理完后置冰上裂解 4-5 小时。

（3）再次超声处理至无粘稠，10000 g/min 离心 10min。弃上层脂类和下层细胞碎片，取中层蛋白溶液，加入等体积的博士德 2x 蛋白上样缓冲液(AR0131)或 1/4 体积 5x 蛋白上样缓冲液(AR1112)，混匀，样品置 100°C水浴箱中变性 5 分钟。至此样品制备完成（样品可立即使用，也可以分装冻存。-20°C存放的样品可稳定维持数月，4°C可保存 1-2 星期）。

2. 组织蛋白样品的制备

（1）手术切除的组织块迅速置于预冷的生理盐水中，洗去表面的血迹，将组织称量后切成几个较小的组织块（0.1-1g），放入组织匀浆器中，按组织净重（g）：哺乳动物组织总蛋白提取试剂体积（ml）=1:10 的比例加入相应体积的哺乳动物组织总蛋白提取试剂（需提前加入博士德酶抑制剂）进行匀浆，至组织研磨完全。

（2）超声处理（同细胞蛋白样品的制备），处理完后置冰上裂解 4-5 小时。

（3）样品 10000 g/min 离心 10min，取中层蛋白溶液，加入等体积的博士德 2X 蛋白上样缓冲液(AR0131)或 1/4 体积 5X 蛋白上样缓冲液(AR1112)，混匀，置 100°C水浴箱中变性 5 分钟。

3. 蛋白定量

收集完蛋白样品后，为确保每个蛋白样品的上样量一致，需要测定每个蛋白样品的蛋白浓度。

常用蛋白定量试剂盒有博士德 BCA 蛋白定量试剂盒（AR0146），微量 BCA 蛋白定量试剂盒(AR1110)，考马斯亮蓝增强型蛋白定量试剂盒(AR0145)。

考马斯亮蓝增强型蛋白定量操作简便迅速，消耗样品量少，但不同蛋白质之间差异大，且标准曲线线性差。高浓度的 Tris、EDTA、尿素、甘油、蔗糖、丙酮、硫酸铵和去污剂可改变测定液的 pH 值，从而影响显色和干扰蛋白质定量。

BCA 蛋白定量操作更简单，试剂及其形成的颜色复合物稳定性更好，几乎没有干扰物质的影响，灵敏度高（微量检测可达到 0.5 μg/ml），应用更加灵活。与考马斯亮蓝增强型



蛋白定量法相比，BCA 法的显著优点是不受去垢剂的影响。

二、凝胶的制备：使用博士德凝胶制备试剂盒(AR0138)

蛋白分子量 (KD)	分离胶浓度(%)
>100	8%
30 ~ 100	10%
10 ~ 30	12%
<10	15%

1、根据目的蛋白的分子量按比例配制分离胶，轻缓摇动混匀，切勿过于剧烈而混入过多氧气。待凝胶溶液混合均匀，将凝胶溶液平缓注入灌胶装置的两层玻璃板中，在液面上小心注入一层水，以阻止氧气接触凝胶溶液影响凝胶的聚合，保持水平，在 37°C 恒温箱中静置约 1 小时，直至凝胶溶液完全聚合凝固。

2、按比例配制浓缩胶，轻缓摇动混匀，滤纸吸去已凝固分离胶上的水，平缓注入浓缩胶溶液，小心插入梳子，并注意齿尖不可有气泡。在 37°C 恒温箱中静置约 1h，直至凝胶溶液完全聚合凝固，小心拔出梳子，准备上样。

三、上样

向电泳槽中加入博士德电泳缓冲液，使两块玻璃内侧电泳液高于上样孔，外侧电泳槽内电泳液浸没凝胶底部。玻璃板内侧液面高于外侧。然后开始上样（已处理好的样品，博士德组织和细胞阳性对照蛋白样本和阳性对照重组蛋白，彩色蛋白预染 Marker），保证每孔总蛋白量在 30-50ug,总上样量小于 30ul,注意上样时间尽量短，避免样品扩散。

四、电泳

上样完毕，正确放置电泳槽盖，注意正负极，并选择适当的电压进行电泳。通常在不连续的系统，上层浓缩胶的电泳电压(建议 70-80V)要低于分离胶电泳电压(建议 90-110V)，以达到更好的浓缩效果，使样品进入分离胶时被压缩在同一水平线上。电泳直至溴酚蓝染料前沿下至凝胶末端处停止电泳，电泳时间约 2-3 小时。



五、染胶

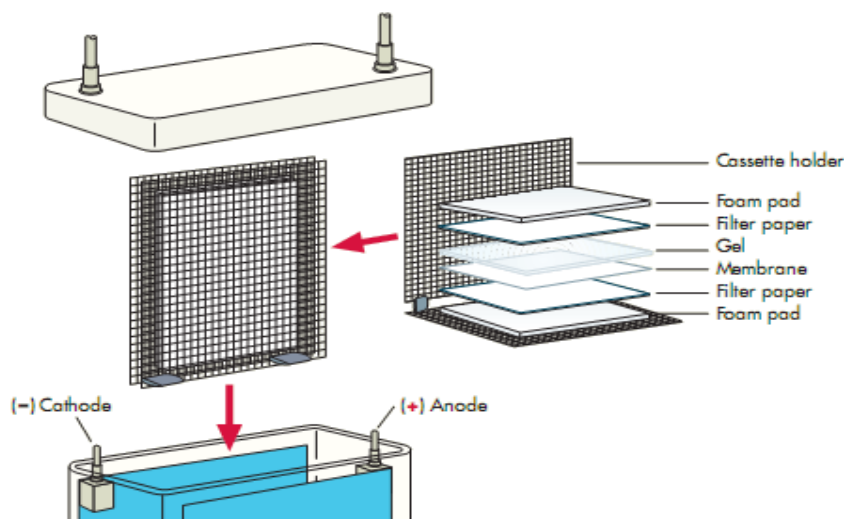
电泳完毕可通过使用博士德凝胶蛋白质蓝染试剂(AR0140)，凝胶蛋白质快速蓝染试剂(AR0170)，蛋白质银染检测试剂(AR0171)检测电泳是否成功。染胶只用于检测样品电泳是否成功。染胶检测后的凝胶不能进行后续转膜等操作。

六、转膜

湿式电转膜

1. 电泳结束后取出凝胶，在博士德转膜缓冲液中浸泡 15-30 分钟。

按“三明治”模型：打开电转印夹，每侧垫上一块专用的用转膜液浸泡透的海绵垫，再各放一块转膜液浸透的博士德快速高效蛋白转移垫(定性滤纸)，将凝胶平放在阴极侧滤纸上，最后将转膜液浸透博士德硝酸纤维素 NC 膜平放在凝胶上，去除气泡，夹好电转印夹，注意 NC 膜与胶，NC 膜与滤纸，滤纸与胶之间不可有气泡。



2. 槽加满转膜缓冲液，插入电转印夹，将转印槽放入冰箱内 (-20°C)，确保 NC 膜最靠近正极，带负电的氨基酸和蛋白质向正极迁移。

3. 选择恒流，每个转印槽建议电流为 150-300mA,时间依据胶的浓度适当调整。

4. 结束后，可染膜检测转膜效率：将 NC 膜置于博士德印迹膜丽春红染色液(AR0142)中,室温 5-10 分钟即可见红色条带,用洗涤缓冲液漂洗数次可洗去红色条带进行后续实验。

七、封闭

1、印迹膜：使用博士德Western洗涤缓冲液室温漂洗10分钟×3次。

2、迹膜，放入博士德封闭缓冲液中，摇床摇动，4°C封闭 1.5-2 小时。



八、 抗体的孵育

先加入未标记的博士德特异性一抗抗体，抗体与膜上的抗原蛋白结合，再加入博士德酶标（过氧化物酶和碱性磷酸酶）二抗抗体进行孵育检测。

1、封闭后的印迹膜加入博士德 Western 专用一抗二抗稀释液（AR1017）稀释后的一抗，4℃孵育过夜。

2、缓冲液洗膜 10 分钟 ×3 次。

3、Western 专用一抗二抗稀释液（AR1017）稀释后二抗，4 度孵育 2h，洗膜 3-6 次，每次 10 分钟。

九、 蛋白检测（显色）

根据标记二抗的标记物的不同，其杂交的结果检测方法也不同，常用的检测系统有博士德的化学发光检测（ECL）和化学显色 DAB 检测系统。

博士德的化学发光检测（ECL）：利用 HRP 催化化学发光物质，生成一种不稳定的中间物质，其衰变时在暗室内形成明显的肉眼可见的化学发光带，利用胶片感光原理，将结果记录下来。

1、L 显色试剂配制 按 1ml 水加入博士德超敏化学发光底物(浓缩型)A.B 各 50ul 混匀；博士德超敏 ECL 化学发光即用型底物 A，B 等体积混匀。

2、合好的显色底物覆盖印迹膜 1-5min。

3、在暗室用放射自显影胶片或化学发光成像系统记录结果。

4、放射自显影胶片，曝光几秒到数分钟，以显影效果确定所测抗原的正确曝光时间。

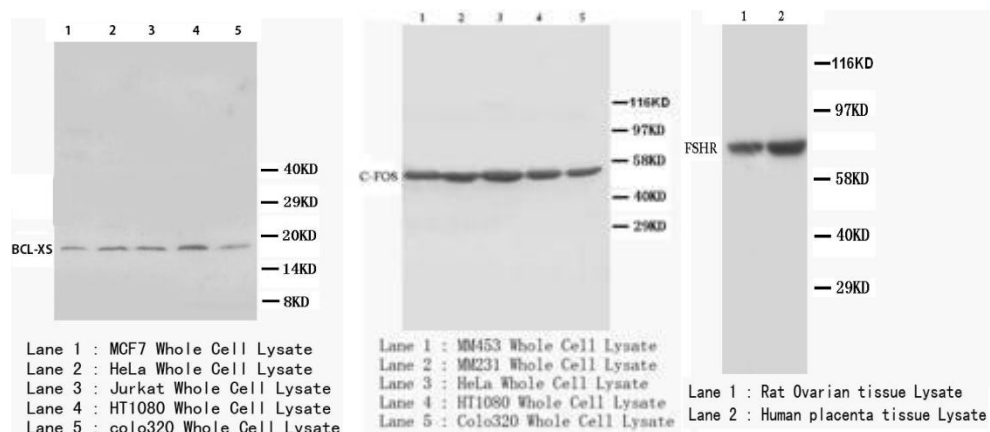
5、完的胶片先在博士德显影液中冲洗至出现条带为止，再放入定影液中漂洗（显影定影试剂盒 AR0132）。

6、片背景较高或有阴影杂点，推荐用博士德 X 光片背景去除液试剂(AR0154)去除胶片的高背景和阴影杂点，可得到理想效果的胶片。

7、膜上蛋白如需重复使用，推荐用博士德 Western Blot 蛋白印迹膜再生液(AR0153)去除膜上一抗二抗，重新进行抗体杂交。



ECL 发光检测图例



博士德化学显色 DAB 检测：

- 1、德 DAB 显色液的配制：按照 1ml 水加显色剂 A.B.C 各一滴混匀。
- 2、将适量的 DAB 显色液平铺在杂交后的印迹膜上，室温放置观察，可出现明显的棕黄色蛋白条带。

DAB 显色检测图例

