蛋白质免疫印迹（WB）实验报告

一、实验材料

1. 细胞株

大鼠原代脊髓星形胶质细胞

2. 主要试剂

DMEM/F12 培养基（美国 Hyclone，SH30023.01/100 ml）

胎牛血清（美国 Hyclone，SH30070.03）

青霉素/链霉素（美国 Hyclone，SV30010/100 ml）

0.25%胰酶（美国 Hyclone，SH30042.01/100 ml）

30%聚丙烯酰胺（北京 Solarbio，A1010）

Tris-base（北京 Solarbio，T8060）

过硫酸铵（北京 Solarbio，A1030）

TEMED（上海 Alladin，T105496）

甘氨酸（北京 Solarbio，G8200）

SDS（北京 Solarbio，S8010）

Tween-20（北京 Solarbio，T8220）

蛋白 marker（北京 Solarbio，PR1910）

Protease inhibitor cocktail（美国 Sigma，P8340）

PVDF 膜（美国 Millipore，ISEQ00010）

ECL 发光液（上海 Tanon，180-5001）

BCA 蛋白浓度测定试剂盒（上海 Beyotime，P0010）

蛋白 marker（加拿大 Fermentas，SM0671）

脱脂奶粉（美国 BD，232100）

蛋白酶抑制剂 cocktail（瑞士 Roche，4693116001）

甲醇（南京化学试剂，C0690110281）

盐酸（南京化学试剂，C0680110228）

东极生物

3. 主要实验仪器

超纯水仪（美国密理博公司，Milli-Q synthesis）

-80℃超低温冰箱（澳柯玛 AUCMA，DW-86L500）

超净工作台（苏净集团安泰公司，SW-CJ-1F）

高压灭菌锅（西安仪创公司，BXM-30R）

离心机（美国 Eppendorf，5417R）

37℃孵育箱（北京福意联医疗设备，FYL-YS-50LK）

SDS-PAGE 电泳仪（美国 Bio-Rad，Mini Protean 3）

湿法转膜仪（美国 Bio-Rad，170-3930）

脱色摇床（金坛市医疗仪器，TY-80R）

化学发光检测系统（上海 Tanon，5200）

东极生物

二、实验方法

1. 细胞总蛋白的提取

（1）根据分组处理结束后，收集细胞，弃掉培养液，并用 1 ml 的 PBS 缓冲液清洗 1 次。

（2）按照 0.2 ml/孔加入细胞裂解液，置于-80℃超低温冰箱中，使细胞完全裂解。

（3）收集充分裂解后的细胞，置于 EP 管中离心（4℃，10,000 rpm，10 min），弃掉沉淀，留下细胞上清液，-20℃下保存备用。

2. BCA 法测定蛋白总浓度

（1）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 24 h 内稳定）。

（2）完全溶解蛋白标准品之后，取 10 μl 用 PBS 稀释至 100 μl，使终浓度为 0.5 mg/ml。

（3）将标准品按 0、1、2、4、8、12、16、20 μl 加到 96 孔板的标准品孔中，加用于稀释标准品的溶液补足到 20 μl。

（4）加入适当体积样品到 96 孔板的样品孔中，如果样品不足 20 μl，需加标准品稀释液补足到 20 μl。

（5）各孔加入 200 μl 的 BCA 工作液，37℃下孵育 30 min。

（6）于 562 nm 波长下测定每孔的吸光度值（OD 值），绘制标准曲线，最后通过公式计算出样品的蛋白浓度，单位为 mg/ml。

3. SDS-PAGE 电泳

本公司所用电泳系统由美国 Bio-Rad 公司出品的 Mini-PROTEAN 3（MP3）电泳槽和 Mini-PROTEAN 3 缓冲液槽及盖组成。

（1）清洗玻璃板：一只手扣紧玻璃板两侧，另一只手蘸点洗衣粉用软毛刷轻轻擦洗，两面都擦洗过后用自来水冲干净洗衣粉液，再用蒸馏水冲洗干净后立在筐里晾干。

（2）灌胶与上样

东极生物

①玻璃板对齐后放入夹中卡紧，然后垂直卡在架子上准备灌胶（操作时要使两玻璃对齐，以免漏胶）。

②配制所需浓度的分离胶（根据需要分离蛋白的分子量确定），加入 TEMED 后立即摇匀即可灌胶。灌胶时，可用枪吸取 3.5～4.0 ml 胶沿玻璃放出，待胶面升到绿带中间线高度时即可，然后胶上加一层水，等待胶凝。

③当水和胶之间有一条折光线时，说明胶已凝了，再等约 3 min 以使胶充分凝固即可倒去胶上层水并用吸水纸将水吸干。

④配制 4%的浓缩胶，加入 TEMED 后立即摇匀即可灌胶。将剩余空间灌满浓缩胶后立即将梳子插入浓缩胶中。灌胶时也要使胶沿玻璃板流下以免胶中有气泡产生。插梳子时要使梳子保持水平。由于胶凝固时体积会收缩减小，从而使加样孔的上样体积减小，所以在一定要把梳子压紧，待到浓缩胶凝固后，两手分别捏住梳子的两边竖直向上轻轻将其拔出。

⑤用蒸馏水冲洗一下浓缩胶孔，将其放入电泳槽中。

⑥测完蛋白含量后，计算含 30 μg 蛋白的溶液体积即为上样量。取出上样样品至 0.5 ml 离心管中，加入 5×SDS 上样缓冲液至终浓度为 1×，于沸水中煮 5 min 使蛋白变性。

⑦加足够的电泳液后开始准备上样。用微量进样器贴壁吸取样品，将样品吸出不要吸进气泡。将加样器针头插至加样孔中缓慢加入样品。

⑧浓缩胶层所用电压 80V 电泳 30 min，样品进入分离胶后，改用 120V 电压电泳 90 min。电泳至溴酚兰刚跑出即可终止电泳，进行转膜。

4. 转膜

本公司所用之转膜仪为 Bio-Rad 公司出品的 Trans-Blot SD 湿转转印槽。

（1）转一张膜需准备 4 张比膜稍小或一样大的滤纸和 1 张 PVDF 膜。将切好的 PVDF 膜置于甲醇溶液中活化 1 min 才可使用。

（2）撬去小玻璃板将浓缩胶轻轻刮去，要避免把分离胶刮破，小心剥下分离胶。剥下来的胶也要在转膜液中浸泡。

（3）在半干转膜仪上，首先将已经泡好的两层滤纸叠放在转膜仪平台上，并用玻棒来回擀几遍以赶走中间的气泡，然后将 PVDF 膜放于滤纸上。

（4）将剥下分离胶盖于膜上，用手调整使其与滤纸对齐，轻轻用玻棒擀去气泡，在胶上盖 2 层滤纸并同上操作赶去气泡，膜两边的滤纸不能相互接触，否则会发生短路。

（5）将转膜仪盖子盖上，调好电压和时间开始转膜（电流设置为 0.32 mA，时间为 2 h）。

（6）转膜完毕后，将膜用 1×丽春红染液染 5 min（于脱色摇床上摇），然后用水冲洗掉没染上的染液就可看到膜上的蛋白，将膜晾干备用。

5. 免疫反应

（1）封闭：将膜用 TBS 从下向上浸湿后，移至含有封闭液（5%脱脂奶粉 TBST 溶液）的平皿中，室温下脱色摇床上摇动封闭 1 h。

（2）一抗孵育：将一抗用含 5% BSA 的 TBST 溶液按照说明书操作稀释（Protein A 1:500，Protein B 1:1000，β-actin 1:10000），于 4℃孵育过夜。之后用 TBST 在室温下脱色摇床上洗 3 次，每次 10 min。

（3）二抗孵育：将二抗用 TBST 按照 1:5000 稀释，室温下孵育 2 h 后，用 TBST 在室温下脱色摇床上洗 3 次，每次 10 min，进行化学发光反应。

6. 化学发光

本公司采用 Tanon ECL 进行化学发光，按照试剂盒说明书操作，于 Tanon 5200 化学发光成像仪下拍照，获取图片，运用 Image J 软件进行分析。

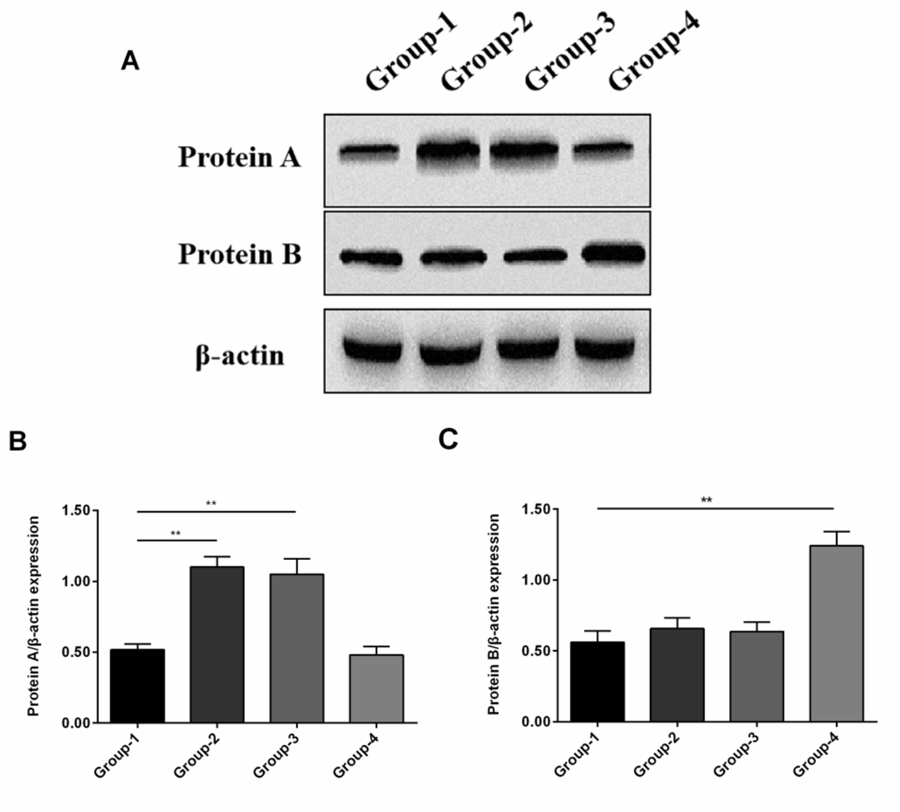
7. 数据处理及统计学方法

实验所得数据采用平均数±标准误（Mean±SEM）表示，所有的数据均使用 GraphPad Prism 6 处理及统计分析。两组样本均值之间的比较采用 *t* 检验，多组样本均值之间的比较采用 ANOVA 检验，$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

东极生物

三、实验结果

Western Blot 实验结果如图 1 所示。



A：WB 曝光条带；B：Protein A 蛋白表达水平；C：Protein B 蛋白表达水平

图 1 各组细胞中 Protein A、Protein B 蛋白表达水平比较

（* $P<0.05$，** $P<0.01$ vs. Group-1，$n=3$）