

## Western blot 标准操作流程

## 试剂的配制

## (一) 母液

## 1.0mol/L Tris·HCl

1000 ml 体积

Tris (MW121.14)	121.1g
蒸馏水	800ml

溶解后, 用浓盐酸调 pH 至所需点 (见下所示), 最后用蒸馏水定容至 1000ml, 高温灭菌后室温下保存。

PH	HCl
7.4	约 70ml
7.6	约 60ml
8.0	约 42ml

250ml 体积

Tris (MW121.14)	30.29g
蒸馏水	200ml

溶解后, 用浓盐酸调 pH 至所需点 (见下所示), 最后用蒸馏水定容至 250ml, 高温灭菌后室温下保存。

PH	HCl
7.4	约 17ml
7.5	约 16ml
7.6	约 15ml
9.0	约 10ml

## 1.74mg/ml (10mmol/L)PMSF

PMSF	0.174g
异丙醇	100ml

溶解后, 分装于 1.5ml 离心管中,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。

0.2mol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 

$\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (MW119.98)	12g
蒸馏水至	500ml

溶解后, 高压灭菌, 室温保存。

0.2mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (MW 358.14)	71.6g
蒸馏水至	1000ml

溶解后, 高压灭菌, 室温保存。

## 10% SDS

SDS	10g
蒸馏水至	100ml

$50^{\circ}\text{C}$  水浴下溶解, 室温保存。如在长期保存中出现沉淀, 水浴溶化后, 仍可使用。

## 10% 过硫酸铵 (AP)

过硫酸铵	0.1g
------	------

超纯水 1.0ml

溶解后, 4°C 保存, 保存时间为 1 周。

### 1.5mol/L Tris·HCl (pH8.8)

Tris (MW121.14) 45.43g

超纯水 200ml

溶解后, 用浓盐酸调 pH 至 8.8, 最后用超纯水定容至 250ml, 高温灭菌后室温下保存。

### 0.5mol/L Tris·HCl (pH6.8)

Tris (MW121.14) 15.14g

超纯水 200ml

溶解后, 用浓盐酸调 pH 至 6.8, 最后用超纯水定容至 250ml, 高温灭菌后室温下保存。

### 10×PBS (137mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)

NaCl 8g×10

KCl 0.2g×10

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.44g×10

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24g×10

溶于 800 ml ddH<sub>2</sub>O 中, 用浓盐酸调整 pH 至 7.4, 用超纯水定容至 1L, 高温灭菌后室温下保存

### 20% Tween20

Tween20 20ml

蒸馏水至 100ml

混匀后 4°C 保存。

## (二) 使用液

### 蛋白提取试剂

#### RIPA buffer 蛋白裂解液

配方一	
50mM Tris-base	
1.0 mM EDTA	
150 mM NaCl	
0.1% SDS	
1% TritonX-100	
1% Sodium deoxycholate(去氧胆酸钠)	
1 mM PMSF(现加)	

### 蛋白定量试剂:

#### Coomassie Brilliant Blue G-250 (考马斯亮蓝 G250 溶液) (测蛋白含量专用):

考马斯亮蓝 G250: 100mg

95%乙醇: 50ml

磷酸: 100ml

蒸馏水至 1000ml

配制时, 先用乙醇溶解考马斯亮蓝染料, 再加入磷酸和水, 混匀后, 用滤纸过滤, 4°C 保存

### 0.15 mol/L NaCl

NaCl (MW58.44) 0.877g

蒸馏水至 100 ml  
高温灭菌后，室温保存。

**100mg/ml 牛血清白蛋白 (BSA)**

BSA 0.1g  
0.15 mol/L NaCl 1ml

溶解后，-20℃保存。制作蛋白标准曲线时，用 0.15 mol/L NaCl 进行 100 倍稀释成 1mg/ml，-20℃保存。标准蛋白 100μg/ml, 200μg/ml, 300μg/ml, 400μg/ml, 500μg/ml, 600μg/ml, 700μg/ml

**SDS-PAGE 凝胶电泳****30% (w/v) 丙烯酰胺溶液**

丙烯酰胺 29g

甲叉双丙烯酰胺 1g

加去离子水，定容至 100ml 调整溶液 pH 值不超过 7.0，置棕色瓶中贮存于室温

**10% 过硫酸铵 (-20℃保存)**

过硫酸铵 1g

加去离子水，定容至 10ml

分装，每管 1ml，共 10 管

**1.5M Tris-HCl (pH 8.8)**

Tris 18.2g

滴加 HCl 调 pH 至 8.8

加去离子水，定容至 100ml

再次调 pH 至 8.8

**1M Tris-HCl (pH 6.8)**

Tris 12.12g

滴加 HCl 调 pH 至 6.8

加去离子水，定容至 100ml

再次调 pH 至 6.8

**10× 蛋白电泳缓冲液**

Tris 30g

Glycine (电泳级) 144g pH8.3

SDS 10g

去离子水定容至 1000ml

**6、2×SDS loading buffer**

成分	
0.5M Tris, PH6.8	5ml
20% SDS	4ml
β-巯基乙醇 (2-mercaptoethanol)	1ml
50% 甘油	4ml
溴酚蓝 (bromophenol blue)	4mg
ddH <sub>2</sub> O	6ml

**考马斯亮蓝染色-脱色****0.1% 考马斯亮蓝 R250 染色液**

CBB-R250 0.5g

甲醇 125ml

乙酸 35ml  
去离子水 定容至 500ml  
过滤, 滤去不溶沉淀, 棕色瓶室温保存

**蛋白电泳脱色液**

甲醇 250ml  
乙酸 70ml  
去离子水定容至 1000ml, 室温保存

**Western Blot****蛋白电泳转移液**

半干	浸渍 (湿转)
24mmol/L Tris (MW: 121.14) 1.4536 g	48mmol/L Tris 2.375g
192mmol/L 甘氨酸 (MW: 75.07) 7.20672 g	39mmol/L 甘氨酸 11.25g
20% 甲醇 100 ml	20% 甲醇 200ml
去离子水定容至 500ml	0.0375% SDS 加至 1000 ml

**封闭液 (含 5% 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液)**

脱脂奶粉 5g  
TBST 100ml  
(3% 封闭剂)

1.5g 脱脂奶粉 + TBS 至 50ml

溶解后 4℃ 保存。使用时, 恢复室温, 用量以盖过膜面即可, 一次性使用。

**TBS 《分子克隆》 p1571**

用 800ml 蒸馏水溶解 8g NaCl, 0.2g KCl 和 3g Tris 碱, 调 pH 值至 7.4, 用蒸馏水定容至 1L, 高压灭菌, RT 保存。

10×TBS: NaCl 80g, KCl 2g 和 Tris 碱 30g, 调 pH 值至 7.4, 用蒸馏水定容至 1L

**TBST 缓冲液 (含 0.05% Tween20 的 TBS 缓冲液)**

20% Tween20 1.65ml  
TBS 700ml

混匀后即可使用, 最好现用现配。

**DAB 显色**

DAB: 在 45ml 的 0.01mol/L Tris-HCl (pH 7.6) 溶液中溶解 30mg 的二氨基联苯胺, 分装为 900ul/支

0.3% (W/V) 的 NiCl<sub>2</sub>: 300mg NiCl<sub>2</sub> 溶于去离子水定容至 100ml, 分装为 1ml/支

**二氨基联苯胺溶液须在临用前配制**

900ul DAB + 100ul NiCl<sub>2</sub> 溶液 + 1ul 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

**操作步骤:****(一) 蛋白样品制备**

单层贴壁细胞总蛋白的提取:

- 1、倒掉培养液, 并将瓶倒扣在吸水纸上使吸水纸吸干培养液 (或将瓶直立放置一会儿使残余培养液流到瓶底然后再用移液器将其吸走)。

- 2、每瓶细胞加 3ml 4℃ 预冷的 PBS (0.01M pH7.2~7.3)。平放轻轻摇动 1min 洗涤细胞, 然后弃去洗液。重复以上操作两次, 共洗细胞三次以洗去培养液。将 PBS 弃净后把培养瓶置于冰上。
- 3、按 1ml 裂解液加 10 μl PMSF (100mM), 摇匀置于冰上。(PMSF 要摇匀至无结晶时才可与裂解液混合。)
- 4、每瓶细胞加 400 μl 含 PMSF 的裂解液, 于冰上裂解 30min, 为使细胞充分裂解培养瓶要经常来回摇动。
- 5、裂解完后, 用干净的刮棒将细胞刮于培养瓶的一侧 (动作要快), 然后用枪将细胞碎片和裂解液移至 1.5ml 离心管中。(整个操作尽量在冰上进行。)
- 6、于 4℃ 下 12000rpm 离心 5min。(提前开离心机预冷)
- 7、将离心后的上清分装转移倒 0.5min 的离心管中放于 -20℃ 保存。

#### 组织中总蛋白的提取:

- 1、将少量组织块置于 1~2ml 匀浆器中球状部位, 用干净的剪刀将组织块尽量剪碎。
- 2、加 400 μl 单去污剂裂解液裂 (含 PMSF) 于匀浆器中, 进行匀浆。然后置于冰上。
- 3、几分钟后再碾一会儿再置于冰上, 要重复碾几次使组织尽量碾碎。
- 4、裂解 30 min 后, 即可用移液器将裂解液移至 1.5ml 离心管中, 然后在 4℃ 下 12000rpm 离心 5min, 取上清分装于 0.5ml 离心管中并置于 -20℃ 保存。

1、

#### (二) 蛋白含量的测定

测定蛋白含量的方法 (Bradford assay, BCA 等)

#### (三) 实验流程

1.制胶: 夹紧电泳玻板, 按次序灌胶, 分离胶在下层, 浓缩胶在上层; 分离胶灌完后, 用水封, 使其表层平整; 浓缩胶灌完后, 立即插入上样梳子。

不同浓度的胶配方一览表

分离胶

各种组份名称	各种凝胶体积所对应的各种组份的取样量			
	5ml	10ml	15ml	20ml
<b>6%Gel</b>				
H <sub>2</sub> O	2.6	5.3	7.9	10.6
30% Acrylamide	1	2	3	4
1.5M Tris-Hcl(pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0
10%SDS	0.05	0.10	0.15	0.20
10% AP	0.05	0.10	0.15	0.20
TEMED	0.004	0.008	0.012	0.016
<b>8%Gel</b>				
H <sub>2</sub> O	2.3	4.6	6.9	9.3
30% Acrylamide	1.3	2.7	4	5.3
1.5M Tris-Hcl(pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0
10%SDS	0.05	0.10	0.15	0.20
10% AP	0.05	0.10	0.15	0.20
TEMED	0.003	0.006	0.009	0.012

<b>10%Gel</b>				
H <sub>2</sub> O	1.9	4.0	5.9	7.9
30% Acrylamide	1.7	3.3	5	6.7
1.5M Tris-Hcl(pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0
10%SDS	0.05	0.10	0.15	0.20
10% AP	0.05	0.10	0.15	0.20
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008
<b>12%Gel</b>				
H <sub>2</sub> O	1.6	3.3	4.9	6.6
30% Acrylamide	2	4	6	8
1.5M Tris-Hcl(pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0
10%SDS	0.05	0.10	0.15	0.20
10% AP	0.05	0.10	0.15	0.20
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008
<b>15%Gel</b>				
H <sub>2</sub> O	1.1	2.3	3.4	4.6
30% Acrylamide	2.5	5.0	7.5	10.0
1.5M Tris-Hcl(pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0
10%SDS	0.05	0.10	0.15	0.20
10% AP	0.05	0.10	0.15	0.20
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008

## 5% 浓缩胶

各种组份名称	各种凝胶体积所对应的各种组份的取样量							
	1ml	2ml	3ml	4ml	5ml	6ml	8ml	10ml
H <sub>2</sub> O	0.68	1.40	2.10	2.70	3.40	4.10	5.50	6.8
30% Acrylamide	0.17	0.33	0.50	0.67	0.83	1.00	1.30	1.7
1.5M Tris-Hcl(pH 8.8)	0.13	0.25	0.38	0.50	0.63	0.75	1.00	1.25
10%SDS	0.01	0.02	0.03	0.38	0.05	0.06	0.08	0.10
10% AP	0.01	0.02	0.03	0.03	0.05	0.06	0.08	0.10
TEMED	0.001	0.002	0.003	0.003	0.005	0.006	0.008	0.010

2.样品处理：样品中加入 1 倍体积的 2×SDS 上样缓冲液，沸水浴 5min

3.待胶凝固以后，放入电泳槽中固定，加入电泳缓冲液，将已处理好的样品上样，接通电源，电泳时电压为 180V。

4. 电泳转移步骤：

(1) 取一块 PAGE 胶，浸泡于电转缓冲液中，同时把两张同样大小的 Whatman 滤纸，两张海绵也浸泡在缓冲液中。

(2) 剪一块同样大小的 PVDF 膜，做如下处理：

1) 浸于 100% 甲醇溶液中 10 秒

2) 浸于去离子水中 3 分钟

3) 浸于转移缓冲液中 3 分钟

(3) 电转三明治顺序如下：

+极 (白色)

海绵

滤纸  
PVDF 膜  
PAGE 胶  
滤纸  
海绵

-极 (黑色)

5. 三明治夹子放入预装有电转缓冲液的电泳槽中, 加盖, 接通电源, 恒压 100V, 30min.

6. 完成后的 PVDF 膜用去离子水冲洗一下, 放入 3% 的脱脂奶粉中, 室温 30 min。用洗涤液洗膜 3 次, 每次 5 分钟。

7. 加入一抗, 室温 1 小时或 4°C 过夜。用洗涤液洗膜 3 次, 每次 5 分钟。

8. 加入酶标二抗, 室温 1 小时。用洗涤液洗膜 3 次, 每次 5 分钟。

9. ECL 显色: A 液和 B 液按 1: 1 混合, 加到膜上。暗室压片 1~10min, 显影液 1min, 定影液 1 min。

DAB 显色: 加入配制好的 DAB 显色液, 室温平缓摇动显色, 观察颜色反应, 一旦特异性蛋白带颜色深度达到要求, 即用去离子水漂洗终止颜色反应, 密度扫描并进行拍照。

#### 凝胶图象分析

将胶片进行扫描或拍照, 用凝胶图象处理系统分析目标带的分子量和净光密度值

和光纯药 (WAKO) 官方授权代理机构 “西宝生物”

更多 wako 产品 推荐, 请访问西宝生物网:

[http://www.cxbio.com/news/news\\_search.asp?type=新品推荐](http://www.cxbio.com/news/news_search.asp?type=新品推荐)

WAKO 电子版产品英文目录及 SeeBio 最新目录, 请访问网站:

<http://www.cxbio.com>

此外, 我们诚邀代理商加盟 WAKO 产品合作, 互惠互利, 共图发展!

若您有任何其他问题, 请勿吝垂询! 谢谢!

祝: 好!

张广华

上海西宝生物科技有限公司

地址: 上海浦东华夏东路 1866 号 607#

邮编: 201200

电话: 021-50922171, 50922172, 50922173-118

传真: 021-50922173-119

E-mail: [sales@cxbio.com](mailto:sales@cxbio.com)

<http://www.seebio.cn>

<http://www.cxbio.com>——西宝生物网

西宝生物作为一家面向生命科学领域, 一直致力于为广大科研和工业用户提供高品质实验室试剂和生产原料的专业进出口公司。

目前主要从事以下产品的进出口和销售: 分子生物学试剂、生化试剂、免疫试剂、诊断试剂、医药原料及中间体、食品添加剂、精细化学品、实验室耗材、仪器设备等产品。