

上海生物样本库
最佳实践规范及标准操作流程
文件汇编
(第二版)

2010年5月

上海生物样本库 质量管理体系文件				
文件名称	Western Blot 操作规程		编号	SOP-TQ-025-01
批准人		批准日期	实施日期	

Western Blot 操作规程

1. 目的

规定了 Western Blot 的操作。

2. 适用范围

适用于 Western Blot 的操作。

3. 定义和术语

无

4. 职责

4.1 样本库实验人员负责 Western Blot 的操作。

5. 设备和器材

见正文内容

6. 正文

6.1 原理

Western Blot 与 Southern 印迹杂交或 Northern 杂交方法类似，但 Western Blot 采用的是聚丙烯酰胺凝胶电泳，被检测物是蛋白质，“探针”是抗体，“显色”用标记的二抗。经过 PAGE 分离的蛋白质样品，转移到固相载体（例如硝酸纤维素膜 NC 膜或 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。该技术也广泛应用于检测蛋白水平的表达。

6.2 试剂及设备

6.2.1 分离胶缓冲液:1.5mmol/L Tris-HCl (pH8.8)

18.15g Tris 和 48ml 1mol/L HCL 混合,加水稀释到 100ml 终体积。过滤后 40C 保存。

6.2.2 浓缩胶缓冲液:0.5mmol/L Tris-HCl (pH6.8)

6.05g Tris 溶于 40ml H₂O 中,用约 48ml 1mol/L HCl 调至 pH6.8 加水稀释到 100ml 终体积。过滤后 40C 保存。这两种缓冲液必须使用 Tris 碱制备,再用 HCl 调节 PH 值。

6.2.3 水饱和异丁醇

6.2.4 1% Tris-HCl/SDS, pH8.8

6.2.5 蛋白质分子量标准混合物

6.2.6 1% SDS 电泳缓冲液

10%(w/v) 0.1g SDS, 1ml 去离子水配制,室温保存。

6.2.7 电泳装置及夹子、玻璃板、灌胶支架、缓冲液槽等附件

6.2.8 0.75mm 封边垫片

6.2.9 0.75mm 样品梳子

6.2.10 微量移液器

6.2.11 恒流电源

6.2.12 丙烯酰胺和 N, N' -亚甲双丙烯酰胺,应以温热(以利于溶解双丙稀酰胺)的去离子水配制含有 29%(w/v)丙稀酰胺和 1%(w/v)N, N' -亚甲双丙烯酰胺储存液丙稀酰胺 29g, N, N'-亚甲叉双丙稀酰胺 1g, 加 H₂O 至 100ml。)储于棕色瓶, 4℃避光保存。严格核实 PH 不得超过 7.0, 因可以发生脱氨基反应是光催化或碱催化的。使用期不得超过两个月, 隔几个月须重新配制。如有沉淀, 可以过滤。

6.2.13 TEMED 原溶液 N, N, N' N' 四甲基乙二胺催化过硫酸铵形成自由基而加速两种丙稀酰胺的聚合。PH 太低时, 聚合反应受到抑制。10%(w/v)过硫酸铵溶液。提供两种丙稀酰胺聚合所必须的自由基。去离子水配制数 ml, 临用前配制。

6.2.14 PAGE 加样缓冲液:pH6.8 0.5mol/L Tris 缓冲液 8ml, 甘油 6.4ml, 10%SDS 12.8ml, 巯基乙醇 3.2ml, 0.05%溴酚蓝 1.6ml, H₂O 32ml 混匀备用。按

1:1 或 1:2 比例与蛋白质样品混合，在沸水终煮 3min 混匀后再上样，一般为 20-25ul，总蛋白量 100 μg。

6.2.15 甘氨酸电泳缓冲液:30.3gTris, 188g 甘氨酸, 10gSDS, 用蒸馏水溶解至 1000ml, 得 0.25mol/L Tris-1.92mol/L 甘氨酸电极缓冲液。临用前稀释 10 倍。

6.2.16 转移缓冲液: 配制 1L 转移缓冲液, 需称取 2.9g 甘氨酸、5.8gTris 碱、0.37g SDS, 并加入 200ml 甲醇, 加水至总量 1L。

6.2.17 脱脂奶粉 5%(w/v)。

6.2.18 NaN_3 0.02% 叠氮钠(有毒, 戴手套操作), 溶于磷酸缓冲盐溶液(PBS)。

6.2.19 Tris 缓冲盐溶液(TBS):20mmol/LTris/HCL(pH7.5), 500mmol/LNaCl。

6.2.20 Tween20。

6.2.21 蛋白质抗体、过氧化物酶标记的第二抗体。

6.2.22 10%过硫酸铵

过硫酸铵提供驱动丙烯酰胺和亚甲丙烯酰胺聚合所必需的自由基。可用去离子水配制小量 10%(w/v) 的贮存液并保存于 4℃。由于过硫酸铵会缓慢分解, 故应隔周新鲜配制。

6.2.23 100mmol/LTris-HCL(pH9.5)。

6.2.24 100mmol/L NaCl。

6.2.25 丽春红染液储存液: 丽春红 S 2g 三氯乙酸 30g 磺基水杨酸 30g 加水至 100ml 用时上述储存液稀释 10 倍即成丽春红 S 使用液。使用后应予以废弃。

6.3 SDS-PAGE

6.3.1 按厂商的使用指南用两块干净的玻璃, 平板和 0.75mm 垫片组装电泳装置中的玻璃平板夹层, 并固定在灌胶支架上。

6.3.2 配制分离胶液体并脱气, 然后加入 10%的过硫酸铵和 TEMED, 轻轻搅拌均匀。

聚丙烯酰胺分离胶的配制

试剂成分	配制不同浓度分离胶所需试剂(ml)				
	5%	8%	10%	12%	15%
Acry:Bis (30:0.8)	2.5	4	5	6	7.5

4%Tris-Cl/SDS, pH8.8	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75
水	8.75	7.25	6.25	5.25	3.75
10%过硫酸铵	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
TEMED	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01

按所需分离的蛋白质分子大小选择合适的丙烯酰胺百分比浓度，一般地，5%的凝胶可用于 60~200kDa 的 SDS 变性蛋白质分子的分离，10%用于 16~70kDa，15%用于 12~45kDa。

6.3.3 用一根巴斯德吸管立即将分离胶液体沿夹层中一条垫片的边缘加入于玻璃平板夹层中，至凝胶约 5cm 高为止。样品体积少于 10ul 不需灌制积层胶。

6.3.4 用另一根巴斯德吸管，先从一边的垫片，再从另一边垫片往夹层的液面顶部缓缓加入一层水饱和异丁醇（厚约 1cm）。让凝胶在室温聚合 30min。

聚合后，可见在顶层异丁醇与凝胶的界面间有一清晰的折光线，胶的聚合失败往往问题在于过硫酸铵或 TEMED，或两者都有。

6.3.5 倾去顶层的异丁醇，并以 1% Tris-Cl/SDS, pH8.8 缓冲液冲洗凝胶的顶部表面，尽量用吸水纸吸干。

6.3.6 配制积层胶液体，用吸管将液体沿一条垫片加入到玻璃平板夹层，直至夹层的顶部。

聚丙烯酰胺积层胶的配制

GEL% (3.9%) Total (10.05ml)

Acry:Bis(30:0.8) 1.30ml

4% Tris-Cl/SDS, pH6.8 2.50ml

水 6.10ml

10%过硫酸铵 0.05ml

TEMED 0.01ml

6.3.7 将 0.75mm 厚的梳子插入夹层的积层胶液体中，必要时，再补加积层胶液体充盈剩余空间。让积层胶室温聚合 30min。

6.3.8 在具螺口盖的微量离心管中，用 SDS 加样缓冲液按 1:1(v/v) 稀释待测蛋白质样品，于 100℃煮沸 5-10min。如样品是蛋白质沉淀物，加入 50~100 ml SDS 加样缓冲液溶解之，并同样在 100℃煮沸 5-10min。按供应商的使用指南用

SDS 加样缓冲液溶解蛋白质分子量标准混合物。

对于 0.3cm 宽的加样孔，推荐加样体积以不超过 20ul 为宜。用考马斯亮蓝染色法显迹，成分很复杂的蛋白质混合物需加 25~50ng，而样品中只有一种或不多的几种蛋白的话，只需 1~10ng 蛋白量。采用银染显迹时，样品用量可减小 10~100 倍（按样品的复杂程度在小于 20ul 的体积溶有 0.01~0.5ng 蛋白样品不等）。

SDS 加样缓冲液 (loading buffer) 配制：

0.5M Tris-Cl (pH6.8) 12.5ml

20% SDS 11.5ml

Glycerin 10ml

2% Blue-Bromo-phenol 2.5ml

β -巯基乙醇 5.0ml

加 H₂O 至总体积 50 ml，分装， β -巯基乙醇在临用前加入。

6.3.9 小心拔出梳子，避免撕裂聚丙烯酰胺凝胶加样孔。取出梳子后，以 1% SDS 电泳缓冲液冲洗加样孔，并以此缓冲液充满之。

6.3.10 按厂商指南将凝胶板固定到电泳装置的上缓冲液室（上槽），同时往下缓冲液室（下槽）加入推荐量的 1%SDS 电泳缓冲液。

6.3.11 将固定于上槽的凝胶板放入下槽中，并往上槽加入部分电泳缓冲液至刚好淹没凝胶的加样孔。

6.3.12 用带平嘴针头的 50ul 注射器将同样浓度的蛋白质样品等体积加入到样品孔中，小心加样使样品在孔的底部成一薄层，对照孔加入蛋白质分子量标准样品，如有空置的加样孔，须加等体积的空白 1%SDS 样品缓冲液，以防相邻泳道样品的扩散。

6.3.13 再往上槽加入余下的 1% SDS 电泳缓冲液。此操作缓慢小心，以防冲起样品孔中的样品。

6.3.14 连接电源，对于 0.75mm 厚的垂直板电泳，先在 60V 下电泳至溴酚蓝染料从积层胶进入分离胶，再将电压调至 120V 继续电泳至溴酚蓝到达凝胶底部为止。

6.3.15 关闭电源并撤去连接的导线，弃去电泳缓冲液。连同上槽一起将凝

胶夹层取出。

6.3.16 将凝胶定位以便识别加样的顺序，将凝胶板从上槽解离出来，放在一叠吸水纸或纸巾上。

6.3.17 小心将封边的垫片抽出一半，并以此为杠杆撬起上面的玻璃平板，使凝胶暴露出来。

6.3.18 小心从下面的玻璃平板上移出凝胶，在凝胶的一角切去一小块以便在染色及干胶后仍能认出加样次序，接着就可进行蛋白质的检测。

6.4 转印（硝酸纤维素膜）

6.4.1 当 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳行将结束时，用蒸馏水淋洗电极板，然后用不被吸收的纸巾揩干电极板上粘附的液滴。

6.4.2 戴上手套，切 6 张滤纸和 1 张硝酸纤维素滤膜，其大小都应和凝胶大小完全吻合。如果滤纸或滤膜面积大于凝胶，滤纸和滤膜伸出的边缘就大有机会相接触，造成电流短路而使蛋白质不能从凝胶向滤膜转移。用铅笔在滤膜一角作好标记。拿取凝胶、滤纸和硝酸纤维素滤膜时必须戴手套。因为皮肤上的油脂和分泌物会阻止蛋白质从凝胶向滤膜转移。

6.4.3 把硝酸纤维素滤膜漂浮于一盘去离子水的水面上，借毛细作用使之从下往上湿润后，将之浸没于水中，浸泡 5 分钟以上以驱除留于滤膜上的气泡。

6.4.4 在一浅托盘中加入少量转移缓冲液，把 6 张滤纸浸泡于其中。

6.4.5 戴上手套按如下方法安装转移装置：

A. 平放底部电极（阴极），放一张海绵垫片。

B. 在海绵垫片上放置 3 张用转移缓冲液浸泡过的滤纸，逐张叠放，精确对齐，然后用一玻璃移液管作滚筒以挤出所有气泡。

C. 从电泳槽上撤出放置 SDS 聚丙烯酰胺凝胶的玻璃，把凝胶转移到一盘去离子水中略为漂洗一下，然后准确平放于硝酸纤维素滤膜上。把凝胶左下角置于硝酸纤维素滤膜的标记角上，戴手套排除所有气泡。切记：为避免发生短路，不要切去凝胶的左下角。

D. 把硝酸纤维素滤膜放在聚丙烯酰胺凝胶上，要保证精确对齐，而且在硝酸纤维素滤膜与聚丙烯酰胺凝胶之间并不留有气泡。

E. 把最后 3 张滤纸放在硝酸纤维素滤膜上方，同样须确保各层精确对齐

并不留气泡。

6.4.6 将靠上方的电极（阳极）放于夹层物上，连接电源。根据凝胶面积按 300mA 接通电流，电转移 0.5-1.0 小时。

6.4.7 断开电源并拔下槽上插头，从上到下拆卸转移装置，逐一掀去各层。将凝胶转移至盛有考马斯亮蓝染液的托盘中，进行染色，以便检查蛋白质转移是否完全。

6.4.8 可做可不做：取出硝酸纤维素滤膜置于一张干净的滤纸上，于室温干燥 30—60 分钟，使硝酸纤维素滤膜干燥，据称可以改善滤膜在随后的处理中保留蛋白质的能力；但是，这也可能导致蛋白质进一步变性并因此改变其免疫反应性，只能针对具体靶蛋白根据实验来决定。

6.4.9 切去滤膜的左下角，以免铅笔标记被抹去。

6.5 抗体标记

6.5.1 膜在 5%脱脂奶粉溶液中室温孵育 1 小时以封闭膜上的非特异结合。

6.5.2 将转印完的滤膜放入有足够体积和浓度的抗体溶液中。使用摇床 37℃孵育 1 小时或着 4℃孵育过夜。

6.5.3 使用 TBS (10mM Tris, 154mM NaCl, 0.1% Tween 20, PH7.5) 洗涤滤膜 3 次，每次至少 5 分钟。

6.5.4 将滤膜放入二抗（连有 HRP 辣根过氧化酶）孵育。使用摇床 37℃孵育 1 小时或着 4℃孵育过夜。

6.5.5 使用 TBS (10mM Tris, 154mM NaCl, 0.1% Tween 20, PH7.5) 洗涤滤膜 3 次，每次至少 5 分钟。

6.6 染色

6.6.1 化学发光法检测，膜与化学发光底物孵育，经 X 胶片曝光显影。图片扫描保存为电脑文件后进行分析。

7. 相关文件

无

8. 参考标准与文献

《分子克隆实验指南》第三版，ISBN 7-03-010338-6