

此为临时链接，仅用于预览，将在短期内失效。

口袋教材：蛋白质印迹（Western blot）实验方案

abcam abcam 2017-10-19

提示：使用抗体，怎么能不关注 "[Abcam](#)" ↑

[请收藏本文](#)，以便您实验时快速参考：

蛋白质印迹流程

溶液和试剂

裂解缓冲液

这些缓冲液可在 4 °C 下保存数周，或者以分装形式在 -20 °C 下保存长达 1 年。

Nonidet-P40 (NP40) 缓冲液

150 mM NaCl

1.0% NP40（可用 0.1% Triton X-100 替代）

50 mM Tris-HCl pH 8.0

蛋白酶抑制剂

RIPA 缓冲液（放射免疫沉淀试验缓冲液）

150 mM NaCl

1.0% NP-40 或 0.1% Triton X-100

0.5% 脱氧胆酸钠

0.1% SDS（十二烷基硫酸钠）

50 mM Tris-HCl pH 8.0

蛋白酶抑制剂

Tris-HCl 缓冲液

20 mM Tris-HCl pH 7.5

此为临时链接，仅用于预览，将在短期内失效。

蛋白酶抑制剂

电泳、转膜、封闭缓冲液

Laemmli 2× 缓冲液/上样缓冲液

4% SDS

10% 2-巯基乙醇

20% 甘油

0.004% 溴酚蓝

0.125 M Tris-HCl

测定 pH 并调节至 pH 6.8。

电泳缓冲液 (Tris-甘氨酸/SDS)

25 mM Tris 碱

190 mM 甘氨酸

0.1% SDS

测定 pH，pH 应为约 8.3。必要时进行调节。

转膜缓冲液 (湿转)

25 mM Tris 碱

190 mM 甘氨酸

20% 甲醇

测定 pH，pH 应为约 8.3。必要时进行调节。

对于大于 80 kDa 的蛋白质，我们推荐加入最终浓度为 0.1% 的 SDS。

转膜缓冲液 (半干转)

48 mM Tris

39 mM 甘氨酸

20% 甲醇

0.04% SDS

此为临时链接，仅用于预览，将在短期内失效。

封闭缓冲液

5% 奶粉或 BSA（牛血清白蛋白）

加入 TBST 缓冲液中。混匀并过滤。过滤失败可能导致出现“斑点”，其中微小的黑色颗粒会在显色过程中污染印迹。

实验步骤

样品裂解

1. 制备细胞培养物裂解物

将细胞培养皿置于冰上，用冰冷的 PBS 洗涤细胞。

吸出 PBS，然后加入冰冷的裂解缓冲液（每 107 细胞/100 mm 培养皿/150 cm² 培养瓶加入 1 ml；每 5×10⁶ 细胞/60 mm 培养皿/75 cm² 培养瓶加入 0.5 ml）。

用预冷的塑料细胞刮棒刮下贴壁细胞，然后轻轻地将细胞悬浮液转移至预冷的微量离心管中。

在 4 °C 下持续搅拌 30 分钟。

在 4 °C 预冷的离心机中以 16,000 × g 的转速离心 20 分钟。

轻轻地从离心机中取出离心管，置于冰上。将上清液转移至放置在冰上的新离心管中，弃去沉淀。

2. 制备组织裂解物

用干净的工具切取目标组织，此操作最好在冰上进行，并且应尽快完成，以防止样品被蛋白酶降解。

将组织置于圆底微量离心管或 Eppendorf 管中，并浸入液氮中进行“速冻”。将样品保存在 -80 °C 下以备后续使用，或放置在冰上直接进行匀浆。对于约 5 mg 的组织，向离心管中快速加入约 300 μL 裂解缓冲液，然后用电动匀浆器进行匀浆，用另外 300 μL 裂解缓冲液冲洗刀片两次，然后在 4 °C 下持续搅拌（例如，在回旋振荡器上）2 小时。

4 °C 下在微型离心机中以 16,000 × g 离心 20 分钟。轻轻地从离心机中取出离心管，置于冰上。将上清液转移至放置在冰上的新离心管中。弃去沉淀。

样品制备

此为临时链接，仅用于预览，将在短期内失效。

取出小部分 (50 µL) 裂解物，用于蛋白分析。确定每种细胞裂解物的蛋白浓度。

向剩余体积的细胞裂解物中加入等体积的 2× Laemmli 样品缓冲液。我们推荐采用以下方法来还原样品和使样品变性，除非在线抗体数据表指明应使用非还原和非变性条件。

还原和变性：在 100 °C 下将样品缓冲液中的每种细胞裂解物煮沸 5 分钟，并进行分装。在 -20 °C 下保存裂解物。注意：分装细胞裂解物 (50 - 100 µL)，避免反复冻融循环。

在 37 °C 下解冻装有细胞裂解物的离心管。在微型离心机中以 16,000 × g 离心 5 分钟。

上样和电泳

将等量的蛋白质和分子量标准上样到 SDS-PAGE 凝胶孔中。来源于细胞裂解物或组织匀浆的总蛋白的上样量为 20 - 30 µg，纯化蛋白的上样量为 10 - 100 ng。

在 100 V 下电泳 1 至 2 小时。

可能需要对时间和电压进行一些优化。我们推荐按照制造商的说明进行操作。应使用还原型凝胶，除非抗体数据表中推荐使用非还原性条件。

凝胶百分比取决于蛋白质的大小：

4 - 40 kDa	20%
12 - 45 kDa	15%
10 - 70 kDa	12.5%
15 - 100 kDa	10%
25 - 200 kDa	8%

将蛋白质从凝胶转移到膜上

如下制备转移堆叠体：

此为临时链接，仅用于预览，将在短期内失效。

膜可以是硝酸纤维素或 PVDF，两者各具优点。用甲醇“活化”PVDF 1 分钟，并在制备堆叠体之前用转膜缓冲液冲洗 PVDF。可能需要对时间和电压进行一些优化。我们推荐按照制造商的说明进行操作。可在封闭步骤之前用丽春红染色法检查转膜。

所得膜可用于抗体染色。

抗体染色

用 5% 封闭溶液在室温下封闭膜 1 小时，或在 4 °C 下封闭过夜。

用适当稀释度的一抗在 5% 或 2% 封闭溶液中 4 °C 过夜孵育膜，或在室温下孵育 2 小时。

用 TBST 洗涤膜 3 次，每次 5 分钟。

用推荐稀释度的标记二抗在含 5% 封闭缓冲液的 TBST 中室温孵育膜 1 小时。

用 TBST 洗涤膜 3 次，每次 5 分钟，然后用 TBS 冲洗。

要产生信号，请遵循试剂盒制造商的建议。

移除多余的试剂，并用透明塑料膜覆盖膜。

利用暗室显影技术采集化学发光图像，或利用常规图像扫描法采集比色检测图像。

相关链接

查看所有 Abcam 上样对照

示例上样对照：[ab8227 beta actin](#)：

此为临时链接，仅用于预览，将在短期内失效。

所有泳道：beta Actin 抗体 - 上样对照 (ab8227)，稀释度为 1/5000

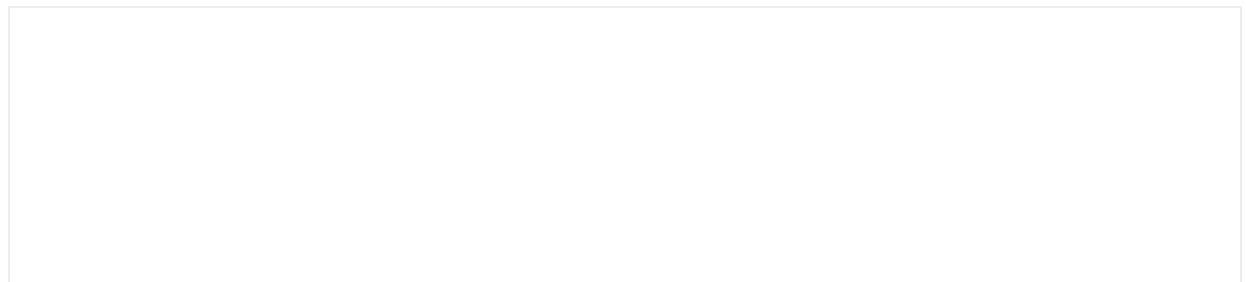
泳道 1：HeLa 全细胞提取物

泳道 2：酵母细胞提取物

泳道 3：小鼠脑组织裂解物

查看可获得的[阳性对照裂解物](#)、[封闭肽](#)和阳性对照蛋白列表。

如果您想要观看视频操作，请点击阅读全文。



[阅读原文](#)