

蛋白质水平检测基因沉默

6.1 Western blot

6.1.1 Western blot 的介绍

1) 原理

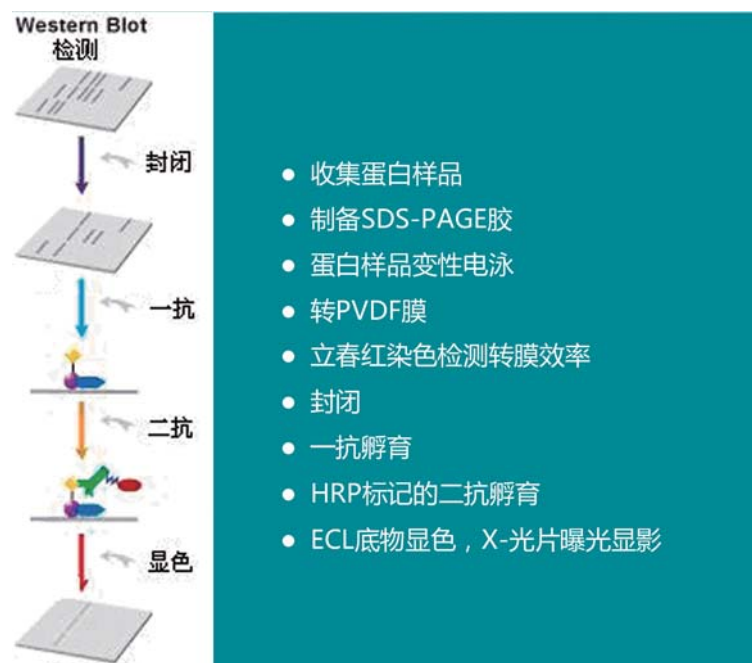
Western Blot 印迹法是把通过电泳分离的蛋白质组分从凝胶转移至一种固相支持物，通过抗体与附着于固相支持物的靶蛋白的抗原表位发生特异性反应进行检测。Western Blot 既可以定性，又可以半定量，是初步鉴定靶蛋白表达的最方便也是最通用的方法。



2) 特点

- 分辨率高，采用 SDS-PAGE 变性电泳
- 灵敏度高，可检测到 pg 级
- 准确性高，通过与内参蛋白比较对靶蛋白进行相对含量

3) 实验流程（本公司采用湿转法）



6.1.2 试剂耗材的准备:

1) 转膜缓冲液 (48 mM Tris-HCl, 39 mM 甘氨酸, 0.037% SDS, 20% 甲醇):

甘氨酸	2.9 g
Tris-HCl	5.8 g
SDS	0.37 g
甲醇	200 mL
纯水	至 1000 mL
溶解后室温保存, 溶液可重复使用 3 - 5 次	

2) 10 × 丽春红染液:

丽春红 S	2.0g
三氯乙酸	30.0 g
磺基水杨酸	3.0 g
纯水	至 100 mL
使用时将其稀释 10 倍。	

3) TBS 缓冲液:

1 mol/ L Tris-HCl (pH 7.5)	10.0 mL
NaCl	8.8 g
纯水	至 1000 mL

4) TBST 缓冲液 (含 20% Tween20 的 TBS 缓冲液):

20% Tween20	1.65 mL
TBS	700 mL
混匀后即可使用, 最好现用现配。	

5) 封闭液 (含 5% 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液):

脱脂奶粉	5.0 g
TBST	100 mL
最好现用现配, 用量以盖过膜面即可, 一次性使用	

6) 一抗、二抗及抗体稀释液: 参照说明书, 以封闭液或 TBST 进行稀释。

7) 底物显色液

ECL, 4°C 避光保存, 现用现配。

8) 显影液和定影液

用水稀释 10 - 20 倍于铝盒中, 可多次使用。室温避光存放。

6.1.3 实验步骤:

- 1) 蛋白样品制备: 用细胞裂解液抽提蛋白, 并测蛋白浓度。
- 2) 取 1 mg 蛋白进行 SDS-PAGE。
- 3) 转膜: (转膜缓冲液 4 °C 预冷备用, 冷却装置于 -80 °C 冰箱冷冻备用)。
- 4) 将 2 张海绵垫、2 张滤纸、转膜夹子及玻棒浸泡在盛转膜缓冲液的铝盒中。
- 5) 戴上手套, 剪一张与凝胶尺寸相近的 PVDF 膜 (83 mm × 75 mm), 左上角剪一缺口作为标记, 浸泡在盛有 20 mL 甲醇的平皿中约 15 sec, 直到膜变半透明。用纯水冲洗膜 2 次。浸泡在盛转膜缓冲液的铝盒中。
- 6) SDS-PAGE 结束后, 小心地剥下两块凝胶, 一块用于考马斯亮兰染色观察电泳情况, 另一块浸泡在转膜缓冲液中预平衡。海绵垫、滤纸、PVDF 膜及凝胶的预平衡时间在 15 min - 1 hr 之间。
- 7) 将转膜夹子打开, 使黑的一面保持水平。按照海绵垫、滤纸、凝胶、膜、滤纸和海绵垫的先后顺序铺垫, 制备凝胶转移夹层。将膜与凝胶对齐。用玻璃棒赶走气泡。
- 8) 将夹子夹起来, 扣紧, 小心不要移动内层。放入电转槽中。使夹子的黑面对槽的黑面, 夹子的白面对槽的红面。
- 9) 将电转槽放在冰水盒中。将预冻的冷却装置放入槽内。缓慢倒入约 650 mL 转膜缓冲液。
- 10) 盖好盖子, 接上电源。根据蛋白分子量来调节工作电流, 一般使用 100 V (350 mA), 转移 60 - 90 min。
- 11) 转膜结束后, 断开电源, 拆卸转膜夹子, 逐一掀去各层。将膜用 1 × 丽春红染色 5 min, 用水冲洗 3 次, 观察蛋白转印是否完全。同时也可将凝胶用考马斯亮蓝染色, 胶上无蓝色条带则说明蛋白转印完全。
- 12) 免疫反应:
 - I 封闭: 用镊子将膜移至含有 25 mL 封闭液的平皿中, 用脱色摇床室温缓慢摇匀 2 hrs, 或 4 °C 过夜。封闭完用 TBST 冲洗 5 sec。用吸水纸吸去残余液。
 - II 一抗孵育: 按照一抗说明书的推荐比例稀释一抗, 使用 TBST 或封闭液稀释。在一容器中, 将 PVDF 膜浸没在抗体溶液里, 室温下 2 hrs 或 4 °C 过夜, 摇床缓慢摇匀。
 - III 一抗孵育完后, 用 TBST 室温下在摇床上洗 3 次, 每次 10 min。
 - IV 二抗孵育: 同上方法准备二抗稀释液并与膜接触, 室温下摇床缓慢摇匀 1 - 2 hrs。
 - V 二抗孵育完后, 用 TBST 室温下在摇床上洗 3 次, 每次 10 min。
- 13) 显影和定影:
 - I 将 ECL Plus 显色液的 A 液和 B 液在容器里体积混合, 根据膜的大小来确定显色液的量, 1 min 后, 将膜与显色液充分接触。
 - II 反应 1 - 5 min 后, 吸去膜上残余液, 将膜转移至一干净保鲜膜上, 包好, 放入压片夹中。
 - III 剪一张比膜尺寸稍大的 X 光片, 打开压片夹, 将 X 光片放在膜上, 一旦放上, 便不能移动。关上压片夹, 开始计时。
 - IV 根据信号强弱调整曝光时间, 一般 1 - 5 min, 也可选择不同时间多次压片以达最佳效果。
 - V 曝光结束后, 打开压片夹, 将 X 光片迅速浸入备好的显影液中显影, 待出

现明显条带后，终止显影。一般 1 - 2 min (20 - 25 °C)。

VI 显影结束后，用水冲洗 X 光片，放到定影液中，定影时间一般为 5 - 10 min，以胶片透明为止。

VII 用水冲洗去底片上残留的定影液，室温下晾干。

附 1: 细胞蛋白抽提 protocol

1 细胞裂解:

悬浮生长细胞: 细胞冰水浴预冷，4 °C，200g 离心 10 min，用 1 倍培养基体积的预冷 PBS 离心洗细胞 1 次，加入 1/5 - 1/10 培养基体积的预冷细胞裂解液，根据需要加入蛋白酶抑制剂。反复吹吸数次，冰上静置 10 min。

贴壁生长细胞: 培养板 4 °C 预冷，用 1 倍培养基体积的预冷的 PBS 洗细胞 1 次，加入 1/5 - 1/10 培养基体积的预冷细胞裂解液，根据需要加入蛋白酶抑制剂。用细胞刮子将细胞刮下来，转移至干净的离心管，反复吹吸数次，冰上静置 10 min。

2 在 4 °C，14,000 g 离心 10 min。将离心管轻轻转移至冰上，转移上清至干净的离心管，分装后保存于 -80 °C。

附 2: SDS-PAGE Protocol:

1 原理:

SDS 是一种阴离子去污剂，破坏蛋白质分子间以及其它物质分子间的非共价键。蛋白质分子与 SDS 充分结合形成带负电荷的复合物，其所带的负电荷大大超过了蛋白质分子原有的电荷量，消除了不同蛋白质分子之间原有的电荷差异。因此 SDS-PAGE 蛋白质电泳迁移率主要取决于蛋白质及其亚基分子量的大小。

2 试剂:

2.1 考马斯亮兰染色液 (1 L):

考马斯亮兰 R- 250	1.0 g
甲醇	450 mL
冰醋酸	100 mL
纯水	450 mL

2.2 考马斯亮兰脱色液 (1 L):

甲醇	100 mL
冰醋酸	100 mL
纯水	800 mL

2.3 5× 蛋白上样缓冲液 (10 ml) 保存于 4 °C:

Tris-HCl (1M, pH 8.0)	0.6 mL
50 % 甘油	5.0 mL
10 % SDS	2.0 mL
2 - 巯基乙醇	0.5 mL
1 % 溴酚蓝	1.0 mL

纯水	0.9 mL
----	--------

3 步骤:

3.1 根据目的蛋白的分子量大小选择合适的凝胶浓度:

分离胶浓度 (X %)	5 %	7.5 %	10 %	12.5 %	15 %
分离范围 (KDa)	60 - 212 KDa	30 - 120 KDa	18 - 75 KDa	15 - 60 KDa	15 - 45 KDa

3.2 配 X % 分离胶 (10 mL):

A 液	X/3 mL
B 液	2.5 mL
D-H ₂ O	(7.5 - X/3) mL
10 % AP	50 μL
TEMED	5 μL (10 μL, 若 X % < 8 %)

3.3 配 5 % 堆积胶 (4 mL):

A 液	0.67 mL
C 液	1 mL
D-H ₂ O	2.3 mL
10 % AP	30 μL
TEMED	5 μL

3.4 蛋白样品的准备:取 20 μL 蛋白样品于干净的 1.5 mL 离心管, 加 5 μL 蛋白上样缓冲液后混匀, 封口膜包裹离心管, 沸水煮沸 10 分钟。

3.5 上样: 吸取蛋白样品 10 μL 于电泳孔中, 静置 10 min。

3.6 电泳:

3.6.1 堆积胶: 80 V 恒压电泳, 至溴酚蓝染料跑出堆积胶。

3.6.2 分离胶: 180 V 恒压电泳, 至溴酚蓝跑出胶即可停止电泳。