

WB 实验报告

一、实验材料

试剂名称	试剂厂家	试剂货号
PVDF 膜	MerckMillipore	IPVH00010
β -Tubulin 抗体	赛维尔	GB15140
β -actin 抗体	赛维尔	GB15001
GAPDH 抗体	赛维尔	GB12002
HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG	赛维尔	GB23301
HRP 标记的山羊抗兔 IgG	赛维尔	GB23303
RIPA 裂解液	碧云天	P0013B
PMSF	碧云天	ST506
BCA 蛋白浓度测定试剂盒	索莱宝	PC0020
ECL 显色液	索莱宝	PE0010
脱脂牛奶		

二、实验仪器

仪器名称	仪器厂家	仪器型号
超净工作台	苏州安泰	SW-CJ-2FD
显微镜	江南永新	XD202
CO2 培养箱	Thermo	3111
超低温冰箱	Thermo	905- μ ITS (490L)
涡旋仪	杭州米欧	MINI-16K
化学发光	上海勤翔	4300
电泳仪	北京六一仪器厂公司	DYY-11
台式离心机	Thermo	Pico17

三、实验方法

1. 细胞样本 ($1-5 \times 10^6$) 每组加 500 μ l RIPA (含 1mM PMSF)。组织样本先用液氮研磨再按每 100mg 加入 1-2ml RIPA (含 1mM PMSF)；
2. 冰上裂解 30min；
3. 4 $^{\circ}$ C 12000rpm 离心 10min，收集上清即为裂解后蛋白液；
4. 使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒，按照试剂盒操作说明书，进行蛋白浓度检测。
5. 将实验样本的蛋白浓度调整到最适范围内，加变性 5 \times Loading Buffer，沸水煮 5~10min，冰上放置 5~10min，-20 $^{\circ}$ C 储藏，待后续实验备用；
6. 根据蛋白的大小，配置 SDS-PAGE 胶 (分离胶 10%-15%)；
7. 将制备好的目的蛋白，进行 SDS-PAGE 电泳，每个泳道总蛋白上样量约 20-40 μ g，80V，30min；120V，1-2h；从胶板上取下胶；
8. 转膜：将电泳后的 SDS-PAGE 胶在冰浴条件下，进行湿转印，恒流 300mA，60min。转膜前，PVDF 膜需在甲醇中浸泡 30s；

9. 封闭:转印后的PVDF膜,用TBST清洗一次;然后浸泡入封闭液(5%脱脂牛奶或5%BSA溶液)中,室温轻摇封闭2h,然后TBST洗1次;
10. 一抗:根据不同的抗体,进行合适比例的抗体稀释,用PBS、抗体稀释液或封闭液稀释,其中目标蛋白抗体按1:1000稀释;anti-GAPDH按1:2000稀释,4℃冰箱静置过夜,然后TBST洗3次,每10min,洗一次;
11. 二抗:二抗稀释度为1:2000,室温轻摇1h,然后TBST洗5次,每10min,洗一次;
12. 显色:将配好的ECL显色液加到PVDF膜上进行曝光拍照。

备注: BCA 蛋白浓度测定试剂盒步骤

1. 配制工作液: 根据标准品和样品数量,按50体积BCA试剂加1体积Cu试剂(50:1)配制成BCA工作液,充分混匀(混合时可能会有浑浊,但混匀后就会消失)。BCA工作液室温24小时内稳定。
2. 稀释标准品:取10微升BSA标准品用PBS稀释至100微升(样品一般可用PBS稀释),使终浓度为0.5mg/mL。将标准品按0, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20微升加到96孔板的蛋白标准品孔中,加PBS补足至20微升,相当于标准品浓度分别为0、0.05、0.1、0.15、0.2、0.3、0.4、0.5mg/ml。
3. 将样品作适当稀释(最好多做几个梯度,如作2倍、4倍、8倍稀释),加20微升到96孔板的样品孔中。由于移液器在取少量样品时误差偏大,标准线前面的点可能不很准确,所以尽可能的让样品点落在标准线1/2后。
4. 各孔加入200微升BCA工作液,37℃放置15-30分钟。用酶标仪测定A562nm,根据标准曲线计算出蛋白浓度。使用温箱孵育时,应注意防止因水分蒸发影响检测结果。