

# 临床组织样本 western blotting

张晓红

2018-06-20

临床组织样本处理

对蛋白质进行定量

**Western Blotting**

# 临床组织样本处理

1. 临床组织样本包括心肝脾肺肾以及脑组织等，由于血液中成分比较复杂，为避免其对结果的影响，在收集样本时需要将组织中的**血液尽量排尽**；
2. 将组织至于研钵中，用剪刀将组织尽量剪碎，再放入适量的液氮，并迅速用钵杵研磨组织，用RIPA裂解液裂解组织。对于心肝脾肾等组织可每50~100mg加1ml RIPA裂解液，肺100~200mg加1ml RIPA裂解液。可用移液器反复吹打，或者将组织和裂解液的混合液放在振荡器上振荡以组织得到充分裂解。过程中须尽量保持低温，快速操作。
3. 裂解后，将裂解液移1.5ml 离心管中，于4℃离心机中，12000rpm离心20min，取上清分装于0.5ml 离心管中并置于-20℃保存（-80℃长期保存）。

**RIPA裂解液**：可购买，也可自己配制

配方：

试剂	浓度
Tris碱	50mmol/L, PH7.5
氯化钠	150mmol/L
SDS	0.1%
EDTA	1mmol/L
NP-40	1%
去氧胆酸钠(deoxycholate)	1%

**RIPA裂解液（强）**

1% Triton X-100,  
1% deoxycholate,  
0.1% SDS

**RIPA裂解液（中）**

1% NP-40,  
0.5% deoxycholate

**RIPA裂解液（弱）**

1% NP-40,  
0.25% deoxycholate

使用时还需要加入蛋白酶抑制剂等防止蛋白质降解

# 对蛋白质进行定量

BCA蛋白浓度测定试剂盒(增强型)—碧云天, 货号为P0009



产品编号	产品名称	包装
P0009-1	BCA试剂 A	500ml×2
P0009-2	BCA试剂 B	30ml
P0009-3	蛋白标准(BSA)	30mg×2
P0009-4	蛋白标准配制液	5ml

## 1. 蛋白标准品的准备

a. 取1.2ml蛋白标准配制液加入到一管蛋白标准(30mg BSA)中，充分溶解后配制成25mg/ml的蛋白标准溶液。配制后可立即使用，也可以-20°C长期保存。

b. 取适量25mg/ml蛋白标准，稀释至终浓度为0.5mg/ml。例如取20 $\mu$ l 25mg/ml蛋白标准，加入980 $\mu$ l稀释液即可配制成0.5mg/ml蛋白标准。蛋白样品在什么溶液中，标准品也宜用什么溶液稀释。但是为了简便起见，也可以用0.9% NaCl或PBS稀释标准品。稀释后的0.5mg/ml蛋白标准可以-20 °C长期保存。

## 2. BCA工作液的配制

根据样品数量，按50体积BCA试剂A加1体积BCA试剂B(50:1)配制适量BCA工作液，充分混匀。例如5ml BCA试剂A加100 $\mu$ l BCA试剂B，混匀，配制成5.1ml BCA工作液。BCA工作液室温24小时内稳定。

### 3. 蛋白浓度检测

a. 将标准品按0、1、2、4、8、12、16、20 $\mu$ l加到96孔板的标准品孔中，加标准品稀释液补足到20 $\mu$ l，相当于标准品浓度分别为0、0.025、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5mg/ml。

b. 加适当体积样品到96孔板的样品孔中。如果样品不足20 $\mu$ l，加标准品稀释液补足到20 $\mu$ l。请注意记录样品体积。

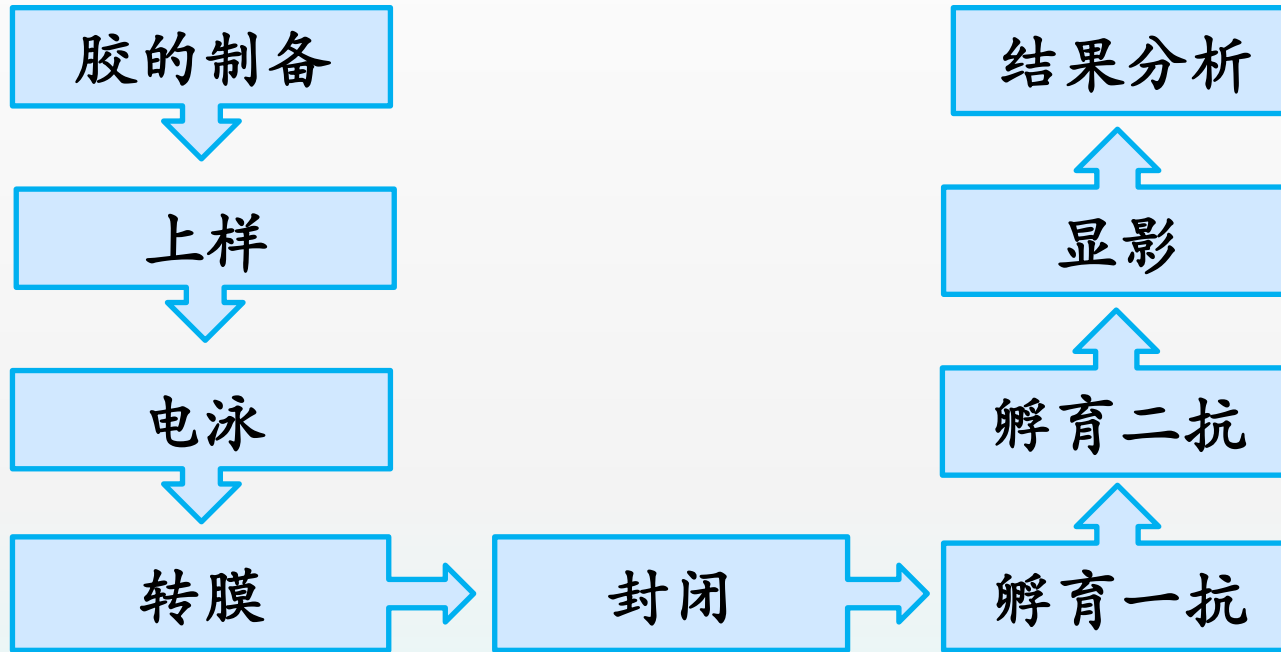
c. 各孔加入200 $\mu$ l BCA工作液，37 $^{\circ}$ C放置20-30分钟。

注：也可以室温放置2小时，或60 $^{\circ}$ C放置30分钟。BCA法测定蛋白浓度时，颜色会随着时间的延长不断加深。并且显色反应会因温度升高而加快。如果浓度较低，适合在较高温度孵育，或适当延长孵育时间。

d. 用酶标仪测定A562，或540-595nm之间的波长的吸光度，562nm最佳。

e. 根据标准曲线和使用的样品体积计算出样品的蛋白浓度。

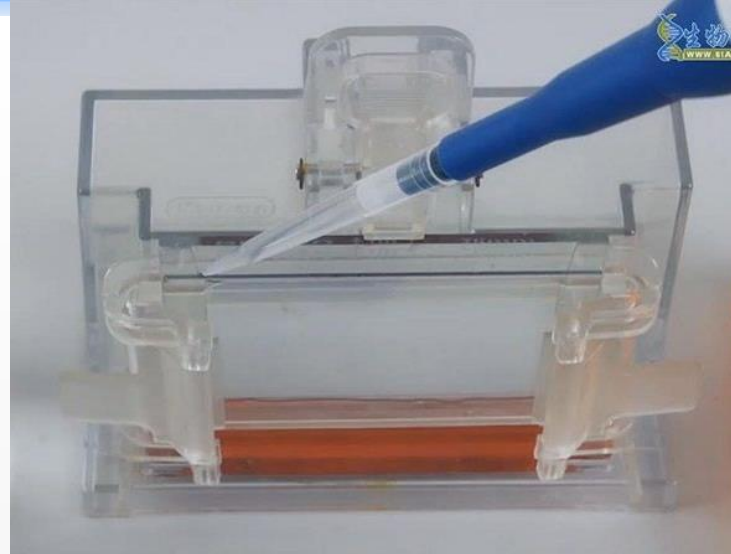
# Western Blotting





# 胶的制备

- 清洗玻璃板、胶条;
- 检漏: 用超纯水;
- 配制分离胶: 用水或者异丙醇液封, 大概需要30min~1h;
- 配制浓缩胶: 15孔或者10孔梳子, 梳子的厚度为10mm或者15mm, 大概需要15~30min;



垂直槽样品梳子 (1.5mm, 10孔)



垂直槽样品梳子 (1.5mm, 15孔)



垂直槽样品梳子 (1.0mm, 10孔)



垂直槽样品梳子 (1.0mm, 15孔)

# 分离胶

根据目的蛋白的分子量大小选择合适的凝胶浓度，再按照下面的表格配制**SDS-PAGE**的分离胶(即下层胶)：不同浓度的SDS-PAGE分离胶的最佳分离范围

SDS-PAGE 分离胶浓度	最佳分离范围
6% 胶	50-150kD
8% 胶	30-90kD
10% 胶	20-80kD
12% 胶	12-60kD
15% 胶	10-40kD

如果配制**非变性胶**，参考分离胶配方，分离胶中不加10%SDS即可配制成非变性PAGE胶。

分离胶浓度	凝胶体积 (ml)	所需各组分体积 (单位: ml)				
		蒸馏水	30%Acr-Bis (29:1)	4×Tris-HCl-SDS 分离胶缓冲液, pH 8.8	10%APS	TEMED
6%	5	2.7	1.0	1.25	0.05	0.004
	10	5.4	2.0	2.5	0.1	0.008
	15	8.1	3.0	3.75	0.15	0.012
	20	10.8	4.0	5.0	0.2	0.016
	30	16.2	6.0	7.5	0.3	0.024
	50	27.0	10.0	12.5	0.5	0.040
8%	5	2.37	1.33	1.25	0.05	0.003
	10	4.7	2.7	2.5	0.1	0.006
	15	7.1	4.0	3.75	0.15	0.009
	20	9.5	5.3	5.0	0.2	0.012
	30	14.2	8.0	7.5	0.3	0.018
	50	23.7	13.3	12.5	0.5	0.030
10%	5	2.03	1.67	1.25	0.05	0.002
	10	4.07	3.33	2.5	0.1	0.004
	15	6.1	5.0	3.75	0.15	0.006
	20	8.1	6.7	5.0	0.2	0.008
	30	12.2	10.0	7.5	0.3	0.012
	50	20.3	16.7	12.5	0.5	0.020

## 浓缩胶

凝胶体积 (ml)	所需各组分体积 (单位: ml)				
	蒸馏水	30% Acr-Bis (29:1)	4×Tris-HCl-SDS 浓缩胶缓冲液, pH 6.8	10%APS	TEMED
2	1.14	0.34	0.5	0.02	0.002
4	2.28	0.68	1.0	0.04	0.004
6	3.42	1.02	1.5	0.06	0.006
8	4.56	1.36	2.0	0.08	0.008

### Calculate Polyacrylamide gel recipes for SDS-PAGE

Just enter the number of gels (18x16mm) and the percent polyacrylamide needed

Enter the number of gels:

Calculate

Enter Desired Percent:

8	ml	<b>Total Volume</b>
4.2	ml	ddH <sub>2</sub> O
1.6	ml	40% Acrylamide
2	ml	1.5M Tris pH 8.8
80	μl	10% SDS
80	μl	10% APS
8	μl	TEMED

5	ml	4% Stacking gel
3.1	ml	ddH <sub>2</sub> O
0.5	ml	40% Acrylamide
1.25	ml	0.5M Tris pH 6.8
50	μl	10% SDS
50	μl	10% APS
5	μl	TEMED

# 上样

1. 配制好的聚丙烯凝胶放置于电泳槽中，并向电泳槽中加入适量的电泳缓冲液；
2. 调整蛋白样品的浓度，使各个实验组、空白组和Model组蛋白浓度保持一致，并使其在后续的上样中，每孔样品所含的蛋白总抽提物在20-40 $\mu\text{g}$ 左右；
3. 蛋白变性：5 $\times$ SDS上样缓冲液20 $\mu\text{L}$ +1M二硫苏糖醇（DTT）10 $\mu\text{L}$ +适量纯水统一成浓度为1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的蛋白样品混匀；
4. 样品混匀后，水浴或者金属浴加热变性5min（或70 $^{\circ}\text{C}$ 加热5-10min），简短离心，取上清，-20 $^{\circ}\text{C}$ 短期或-70 $^{\circ}\text{C}$ 长期保存。
5. 20-40 $\mu\text{g}$ 蛋白质也就是20-40 $\mu\text{l}$ 定量好的样品，用移液器缓慢加入，防止样品溢出，同时在一个样品孔中加入2-5 $\mu\text{l}$ 预染蛋白marker。



# 电泳

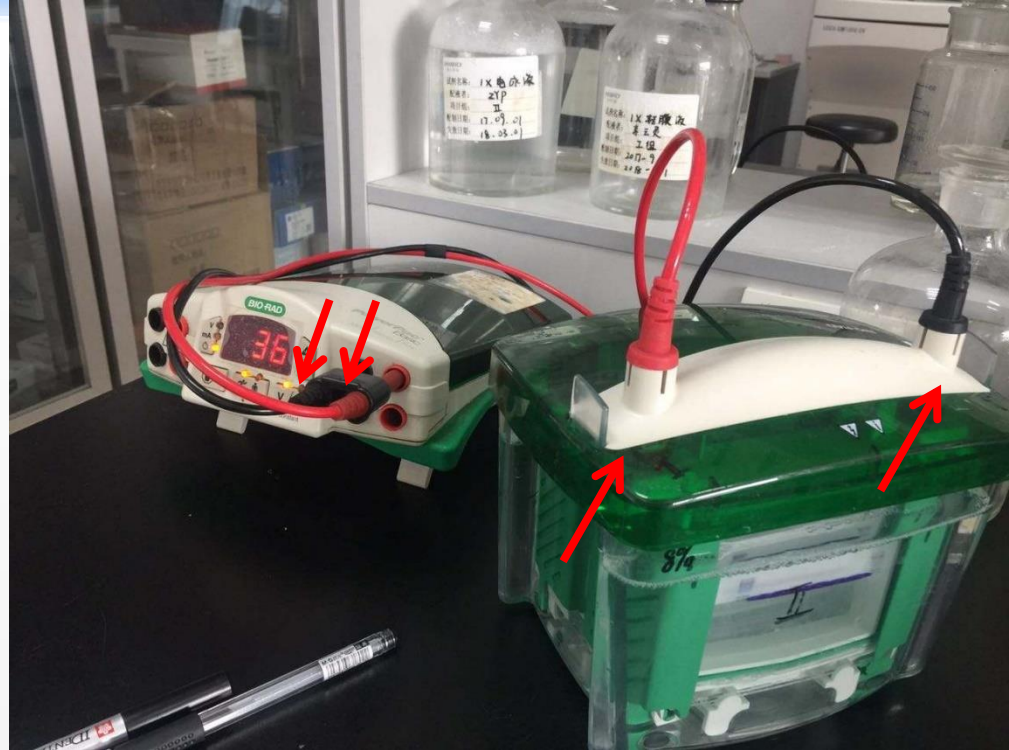
## ➤ 10× 电泳缓冲液 (1L)

Tris碱 33g

甘氨酸 144g

10%SDS 100ml

- ## ➤ 盖好电极盖 (红-红, 黑-黑), 设置为恒压80V, 电泳约30min, 各样本跑至积层胶末端 (浓缩胶和分离胶的分界面) 后, 调节电压至120~160V, 继续电泳约90min, 待溴酚蓝前沿距电泳槽底部1cm时, 停止电泳。



# 转膜

## 准备

1. 长10cm,宽8.5cm的滤纸若干和长8.5cm, 宽5.5cm的硝酸纤维素膜若干;

注: 剪裁滤纸和硝酸纤维素膜是一定要戴一次性手套, 防止手上的蛋白和手套上的杂志污染滤纸和膜;

2. 硝酸纤维素膜一定要用甲醇激活, 方法是将硝酸纤维素膜放置于甲醇中1min;

3. 配制1×转膜缓冲液, 并将适量1×转膜液倒入搪瓷盘中, 同时放入转膜用的夹子、镊子、两块海绵垫、一支玻璃棒、滤纸和激活的膜;

4. 将夹子打开, 使黑色的一面保持水平。在上面垫一张海绵垫, 用玻璃棒来回擀几遍以擀走里面的气泡 (一手擀另一手要压住垫子使其不能随便移动)。

10×转膜缓冲液 (1L)

Tris碱 33g

甘氨酸 144g

1×转膜缓冲液 (1L)

10×转膜缓冲液 100mL

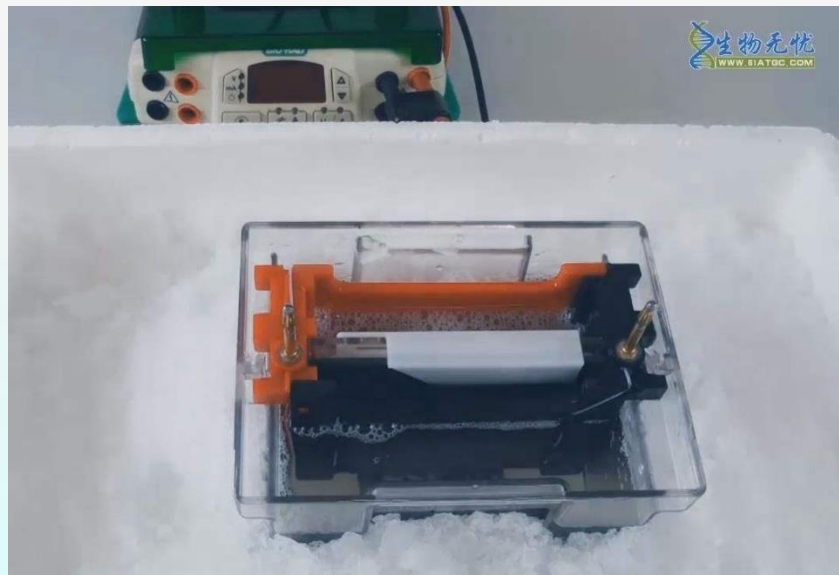
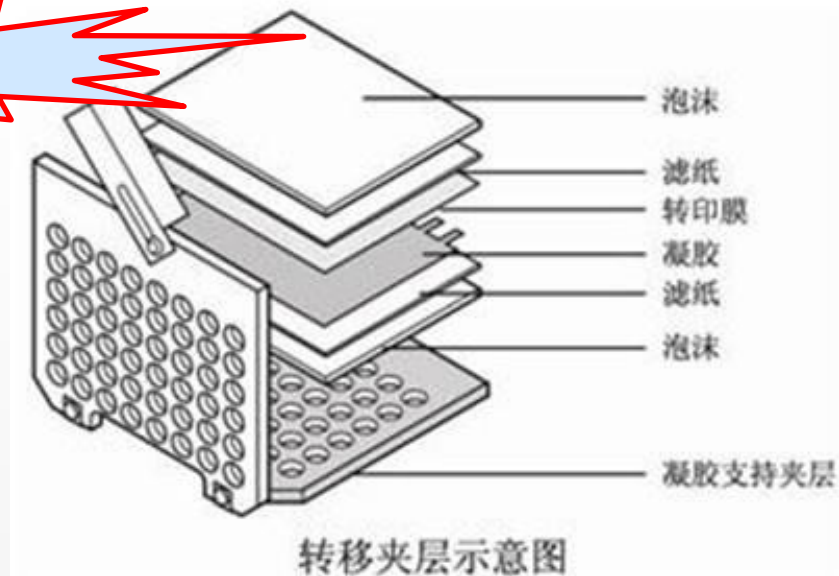
甲醇 200mL

超纯水 700mL

# 转膜（湿转）

干转/半干转?

1. 将胶板从电泳槽中取出，用超纯水冲洗干净，撬开胶板，将浓缩胶轻轻刮去，要避免把分离胶刮破，取出凝胶，放在装有转膜缓冲液的搪瓷盘中浸泡10min；
2. 将准备好的转膜用夹层水平置于搪瓷盘中，按照顺序：夹子黑色一面—滤纸—凝胶—硝酸纤维素膜—滤纸—透明夹子一面，整齐叠放，小心清除叠层中的气泡；
3. 将夹子放入转移槽中，要使夹子的黑色一面对着槽的黑面，夹子的白色一面对着槽的红面。电转仪过程中会产热，需要将转移槽放置在装有冰水混合物的容器中。
4. 转膜电压一般为80V，转移1.5h，可根据目的蛋白分子量的大小进行调整。







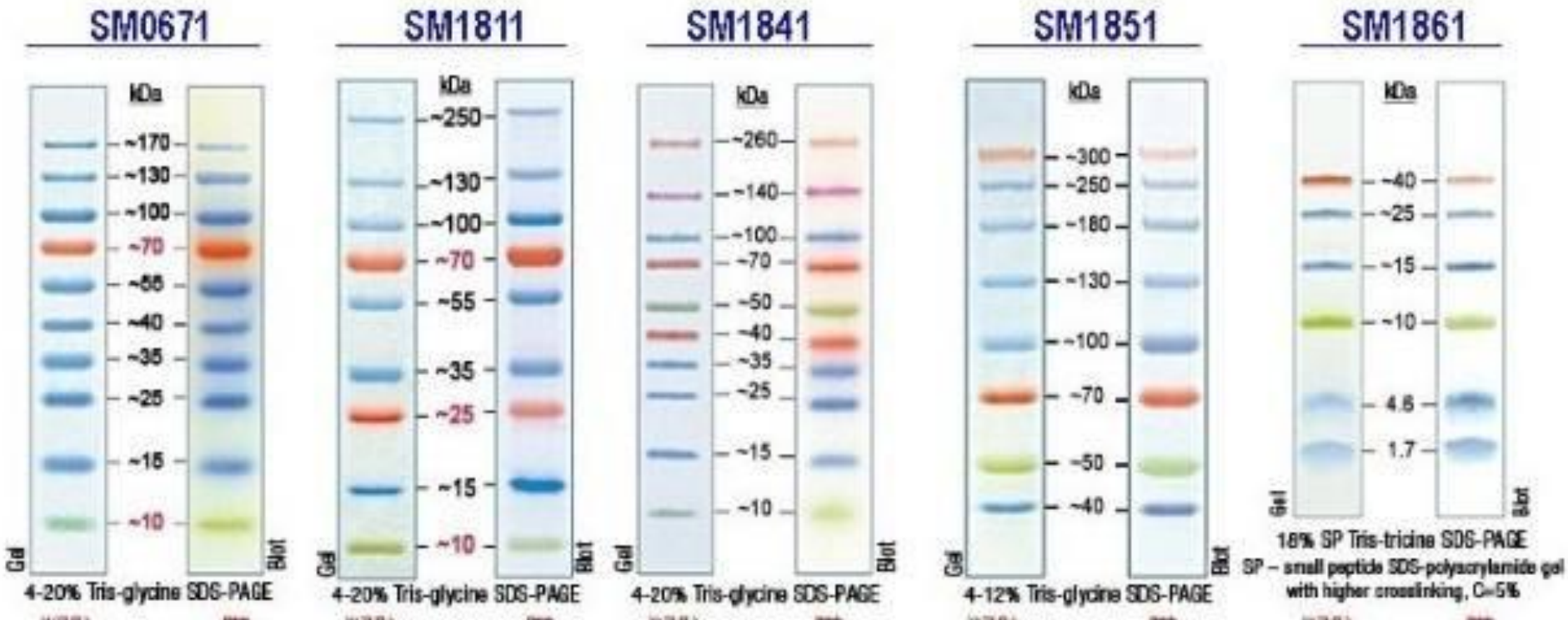
# 封闭

1. 为防止一抗/二抗与膜的非特异性结合产生的高背景，因此需要进行膜的封闭。  
传统上有两种封闭液：**脱脂奶粉**和**牛血清白蛋白（BSA）**，脱脂奶粉因含有酪蛋白，而该蛋白本身是一种磷酸化蛋白，因此脱脂奶粉不能用于磷酸化蛋白，使用脱脂奶粉会结合磷酸化抗体而易产生高背景，但是脱脂奶粉的成本比较低，所以如果不是磷酸化蛋白可使用脱脂奶粉。某些抗体用BSA封闭时因不明原因可能会产生比脱脂奶粉更强的信号，请仔细阅读说明书注明的注意事项和膜的特殊封闭方法。
2. 将PVDF膜放入盛有5%封闭液的小盒中，膜与胶紧密结合的一面朝上，置于摇床上，室温孵育1h.

## 孵育一抗

1. 根据目的蛋白的分子量大小剪裁PVDF膜；
2. 根据抗体说明书或者自己做实验摸索的比例用一抗稀释液稀释一抗，选择大小合适的容器，将剪裁好的PVDF膜和稀释好的一抗放在容器中；
3. 用保鲜膜封闭容器或者直接盖上盖子，置于4℃冰箱的摇床上孵育过夜（12~16小时）。
4. 将容器中的一抗收集起来，放在4℃或者-20℃冰箱保存；
5. 用PBST冲洗三遍，每遍10分钟。

# Protein Marker



## 孵育二抗

1. 将按比例用二抗稀释液稀释好的二抗放在容器中，放在常温摇床上，孵育30分钟~1小时；
2. 将容器中的一抗收集起来，放在4℃或者-20℃冰箱保存；
3. 用PBST冲洗三遍，每遍10分钟；
4. 最后用PBS冲洗一遍，然后将PVDF膜浸泡在PBS中，等待显影或者扫膜。

# 显影 (化学发光)

二抗是HRP偶联的

- 1) 将两种显色底物(ECL A&ECL B)1:1等体积混合 (一般1ml/membrane)。
- 2) 将混合物覆盖在膜表面, 1-2分钟, 摇晃使均匀。
- 3) 用保鲜膜把膜包起来, 放入夹板中。
- 4) 在暗室中将X光片, 覆盖在膜的上面, 夹好夹子, 曝光1min。
- 5) 显影、定影。
- 6) 根据结果调整曝光时间和曝光区域, 得到最佳结果。



须避光

显影 (荧光)

二抗是荧光的



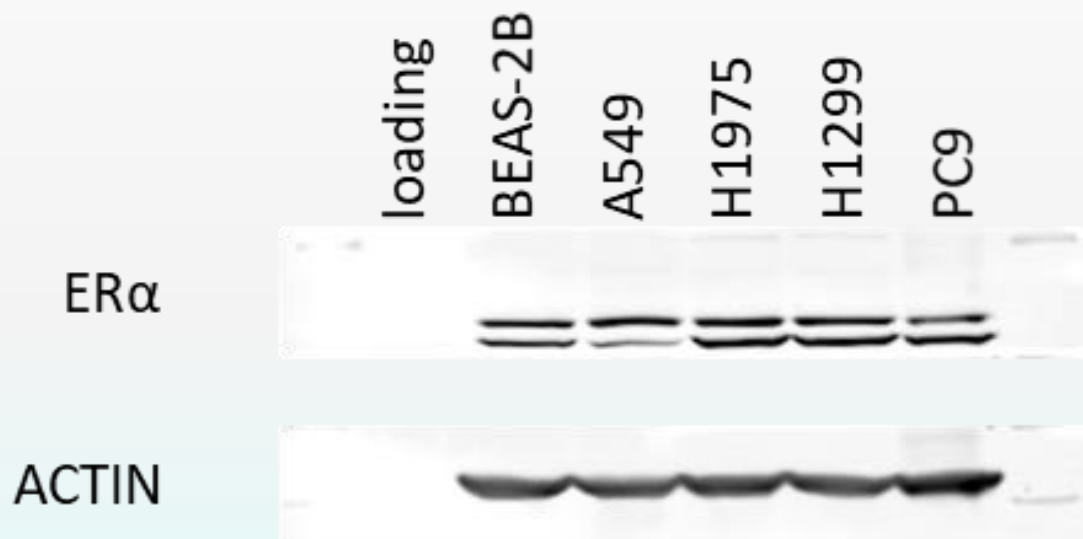
荧光



电化学

# 结果分析

软件: image J 灰度分析





**Thank you!**

