

## 蛋白质印迹分步实验方案

### 蛋白质印迹简介

蛋白质印迹 (或免疫印迹) 是一种用于检测、表征和定量蛋白质的技术。该过程首先涉及在聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离蛋白质混合物, 包括靶蛋白。并将分离后的蛋白质转移或吸附到硝化纤维素或 PVDF 膜上, 以固定蛋白质。然后使用合适的抗体, 通过简单的抗原-抗体反应来检测靶蛋白。

### 蛋白质印迹分步实验方案

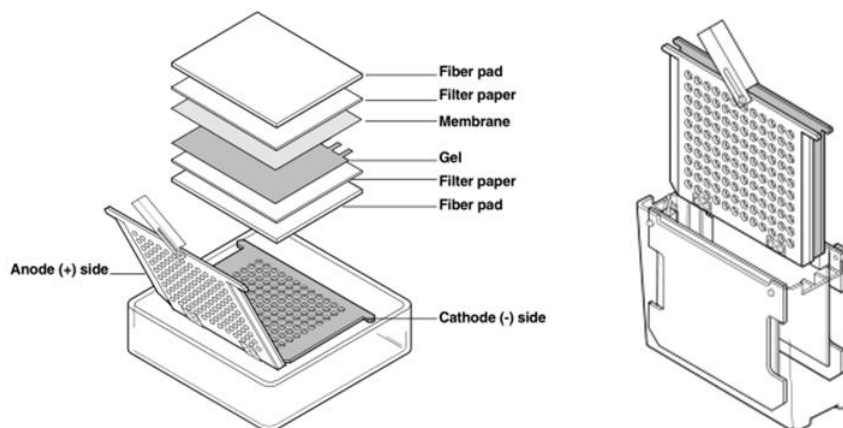
除非另有说明, 所有步骤均在室温下进行。

#### 1、聚丙烯酰胺凝胶电泳

- 根据目标蛋白的分子量 (MW) 配制 SDS-PAGE 凝胶。
- 样品制备: 根据 Bradford 或 BCA 蛋白测定法测量细胞裂解液或组织裂解液的蛋白浓度, 添加 4X SDS Sample Buffer, 混合样品, 然后 95-100°C 加热 5-10 分钟。
- 组装电泳装置并浸入 1x 电泳缓冲液中, 取凝胶梳并清除孔中残留的凝胶, 微量移液器将制备好的样品加入到凝胶孔梳中。
- 连接好电泳电源, 将电泳电源电压设置为 80V (浓缩胶), 然后当蛋白质前沿到达分离胶时将其增加到 120V。

#### 2、蛋白转印

- 强烈推荐使用 PVDF 膜 (或当目标分子量 < 30 kDa 时, 使用 0.22  $\mu\text{m}$  的膜)。
- PVDF 膜活化: 甲醇中浸泡 30 秒, 然后转移至转移缓冲液中。将滤纸和海绵浸泡在转移缓冲液中。
- 按顺序组装“三明治”装置: 在浅托盘中, 加入适量的预冷的 1X 电转液, 放好胶夹如下图, 阳极 (白色) 面朝上, 从下到上依次按照海绵—两张滤纸—分离胶—PVDF 膜—两张滤纸—海绵的顺序制作转移三明治, 并消除气泡。
- 根据制造商的说明使用半干式或湿式转印系统。



### 3、免疫印迹

- 转印完成后, 用蒸馏水清洗膜两次, 并用铅笔在膜上标记 MW 梯带。如果需要, 丽春红溶液染膜 1 分钟后可见蛋白质条带, 然后用 1x TBST 清洗去除膜上的残留丽春红。
- 封闭: 用含有 2-5% 脱脂奶粉的 1x TBST 进行封闭(检测磷酸化表位抗体时, 可用 1-5% BSA 封闭), RT 孵育 1 小时或过夜孵育。
- 一抗孵育: 可用封闭液(或商品化稀释液) 稀释一抗, 起始稀释比例推荐 1:1000 (最佳稀释度应通过预实验确定)。室温下孵育 2 小时或 4°C 过夜孵育(推荐)。
- 清洗: 1x TBST 洗膜 3 次, 每次 5-10 分钟。
- 二抗孵育: 封闭液稀释特定宿主物种的 HRP 偶联二抗, 按 1:5000-1:50000 稀释。RT 孵育 1 小时。
- 清洗: 1x TBST 洗膜 3 次, 每次 10 分钟。

### 4、信号检测

- 根据制造商的说明准备 ECL 发光液。
- 在合适的载体上, 将膜整齐摆放, 加上底物孵育 1-5 分钟(根据制造商说明进行调整)。
- 在暗室中将膜暴露于放射自显影胶片或使用化学发光成像系统读取。