ttt

**Western blot实验**

**检测结题报告**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **客户姓名** |  | **订单编号** |  |
| **项目启动日期** |  | **项目完成日期** |  |
| **报告撰写人** |  | **报告复核人** |  |
| **报告授权人** |  | **报告生效日期** |  |

尊敬的客户：

您好！

**成都奥创生物科技有限公司**是联合多家高校、科研院所发起，由一批基础生物学、生物医药、临床医学领域杰出的科学家带队组成。主营业务包括整体课题项目服务实验（分子、蛋白、细胞、动物、病理等），全方位生物、医学研究技术服务和科研设计咨询、生物医药企业CRO外包服务等。

**成都奥创生物**联合多位来自于了中山大学、四川农业大学、华中农业大学、四川大学、中科院等著名高校以及研究机构的专家学者担任企业顾问，其中专业覆盖肿瘤学、蛋白免疫学、分子生物学、细胞生物学、形态学等诸多领域，并与国内相关领域的专家以项目合作的方式联合开展转化医学研究，组成了一个优势交叉互补、高度专业的科研团队，负责研发课题的具体实施和推进，确保各项目的高效与质量。致力于实验科研平台互联，资源共享。借助此平台为广大科研院校，生物医药企业及个人提供分子、蛋白、细胞、病理等研究技术服务。

1. **整体项目平台**

能为广大客户提供从课题咨询，课题设计，项目实施到论文撰写，润色，发表等一站 式整体课题外包服务，强大的科研团队，全面的技术平台和完善的管理体系，让您的课题进展更加高效。

1. **核酸研究平台**

服务项目：核酸抽提，常规PCR，荧光定量PCR，微滴式数字PCR，载体构建，甲基化检测等。

1. **蛋白与免疫平台**

服务项目：Western blot，IP/COIP检测，无标记分子互作检测，ELISA，多因子蛋白悬液芯片检测，蛋白表达纯化，蛋白质谱等。

1. **细胞研究平台**

服务项目：细胞周期，细胞凋亡，细胞增殖，细胞共培养及趋化，细胞迁移及侵袭，细胞粘附检测，流式细胞检测，稳转细胞系构建，细胞单克隆形成检测，双荧光素酶检测，显微拍照检测等。

1. **病毒包装平台**

服务项目：慢病毒包装，逆转录病毒包装，腺病毒包装，腺相关病毒包装等。

1. **病理染色**

服务项目：各类切片及染色服务，电镜检测，免疫荧光，免疫组化，tunel，原位杂交染色，全景扫描，分析阅片等。

1. **动物模型平台：**

服务项目：常见疾病动物模型及肿瘤模型构建，肝功，肾功，血糖，血脂，无机离子，尿常规，凝血检测，血常规等生化检测。

**我们的服务承诺：** █ 唯一 █ 真实 █ 专业 █ 效率

欢迎科研院所、医院、生物医药企业的广大用户来我公司进行科研项目订制，我们将为您提供专业高效的一站式科研服务。

## 声明

为保证独立、客观、公正地从事检验检测工作，提高服务质量。现以奥创生物名义，向社会各界和客户作如下声明，并接受有关单位和客户的监督。

1、遵守国家的各项法律、法规、政策，严格执行有关标准，规范及细则等技术文件开展检测工作，以诚实、公正的态度确保检测工作质量，并对检测结果负责。

2、公司具有固定的工作和检验检测场所，拥有与开展的检测工作相匹配的专业技术、管理人员，拥有相关检测所需的设备设施。

3、承诺对客户的技术、资料、数据和其他商业机密严格保密，切实维护客户的权益，绝不利用客户的技术和资料从事技术开发和技术服务。

4、承诺对所有委托方一视同仁，提供相同的优质、高效服务，保证检测数据和结果的真实、客观、准确。

5、承诺出具的检验检测数据、结果独立于所涉及的利益相关方，不受任何可能干扰其技术判断因素的影响，确保检验检测数据、结果的真实、客观、准确。

以上声明，本公司全体人员必须严格遵守。

成都奥创生物科技有限公司

目录

[声明 4](#_Toc32418)

[一、 样本信息 7](#_Toc16974)

[二、 实验仪器 7](#_Toc14574)

[三、 实验步骤 8](#_Toc19601)

[1. 蛋白提取 8](#_Toc13778)

[贴壁细胞总蛋白提取 8](#_Toc11657)

[悬浮细胞总蛋白提取 8](#_Toc3109)

[2. 蛋白溶液变形 9](#_Toc15996)

[3. 制胶 10](#_Toc7840)

[4. 灌胶 10](#_Toc13223)

[5. 电泳 10](#_Toc17260)

[6. 转膜 10](#_Toc6655)

[7. 封闭 10](#_Toc27984)

[8. 一抗孵育 10](#_Toc29745)

[9. 二抗孵育 10](#_Toc2878)

[四、 发光检测 11](#_Toc30843)

# 样本信息

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 样本编号 | 样本来源 | 样本类型 | 样本量 |
|  |  |  |  |

# 实验仪器

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **仪器名称** | **品牌** | **型号** |
| 电泳仪 | HTJY | HT-300 |
| 高速离心机 | SciloEGX | CF1524R |
| 酶标仪 | PerkinElmer | Enspire |
| 电泳槽 | HTJY | HT-300 |
| 转膜槽 | HTJY | HT-ZY02 |
| 脱色摇床 | SciloEGX | SLK-R300-S |
| 化学发光成像仪 | 勤翔 | ChemiScope 6100 |
| 高通量多功能金属浴 | SciloEGX | SCI- 100HCM-Pro |
| 图像采集软件 | 勤翔 | ChemiScope Analysis |
| 酶标仪 | Servicebio | KZ-IH-F |
| 微量离心机 | Betie | HBS- 1096A |
| 手动单通道移液器 | 赛默飞 | S1010 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **试剂名称** | **品牌** | **货号** |
| Tween 20 | Bioforxx |  |
| 蛋白Marker | 雅酶 | MCT-001-150 |
| RIPA 裂解液（强） | Servicebio | HT-200-M |
| PMSF | Servicebio | BS-10-T |
| 磷酸化蛋白酶抑制剂 | Servicebio | T-001-200 |
| 转印滤纸 | Servicebio | BS-1000-T |
| 超敏 ECL 化学发光底物 | Biosharp | T-001-1250 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **耗材名称** | **品牌** | **货号** |
| PVDF 膜 | MILLIPORE | IPVH00010 |

# 实验步骤

## 蛋白提取

1. 蛋白酶抑制剂母液:配成 10x 母液，500μl溶解到 5 mL RIPA 中，分装 200μL管，

-20°C 保存，3 个月内有效;

1. 磷酸酶抑制剂母液:配成 10x 母液，溶解到 1 mL RIPA 中，1 个月内有效;
2. PMSF 配成 100mM 母液，分装成 60μL/每管，-20℃ 保存; RIPA 工作液配好后，放 在冰上预冷。

贴壁细胞总蛋白提取

用 TBS 缓冲液润洗贴壁细胞 2-3 次 ，最后一次尽量吸干残留液。加入适当体积的细胞总蛋白提取 试剂（使用前数分钟内加入蛋白酶抑制剂）于培养板/瓶内裂解 3-5min。期间反复晃动培养板/瓶 ，使 试剂与细胞充分接触。用细胞刮刀将细胞及试剂刮下 ，收集到 1.5mL 离心管中。 冰浴 30min ，期间用 移液器反复吹打 ，确保细胞完全裂解。4℃12000rpm 离心 5min ，收集上清 ， 即为总蛋白溶液。

悬浮细胞总蛋白提取

低速离心收集细胞 ， 加入适当体积的冷却的 PBS 缓冲液重悬 ， 2000rpm 离心 10 min ， 吸除上 清。重复以上操作两次 ，收集细胞沉淀。加入适当体积的细胞总蛋白提取试剂（使用前数分钟内加入 蛋白酶抑制剂） ，振荡。 冰浴30min ，期间用移液器反复吹打 ，确保细胞完全裂解。4℃12000rpm 离 心 5min ，收集上清 ， 即为总蛋白溶液。

**组织总蛋白提取**

收集细胞悬浮液样本，1000 rpm离心10分钟弃培养基，用预冷PBS润洗3次；加入适量的预冷PBS重悬细胞，反复冻融破碎，收集样本，4 ℃ 10000×g离心10分钟，取上清，检测或者分装后-20 ℃或 -80 ℃保存，避免反复冻融。

**胞浆胞核蛋白提取**

收集细胞 ，将细胞重悬于适当体积的浆蛋白提取试剂（使用前数分钟内加入蛋白酶抑制剂） 中 ， 振荡混匀 15 秒 ，使细胞完全悬浮并分散开。如果细胞沉淀没有完全悬浮并分散开 ，可以适当延长振 荡混匀时间。 冰浴 30 min。高速振荡混匀 5 s ，4 ℃ 12000rpm 离心 10 min。 吸取上清至一预冷的离 心管中 ， 即为细胞浆蛋白。 吸尽上清（上清尽量去净 ，避免浆蛋白污染） ，加入适当体积的核蛋白提 取试剂（使用前数分钟内加入蛋白酶抑制剂） ，高速振荡混匀 15 秒 ，使沉淀完全悬浮并分散开。 冰 浴 30min ，每隔 5min 剧烈振荡混匀 10 ～20s ， 4 ℃ 12000rpm 离心 10 min。 吸取上清至一预冷的离心 管中 ， 即为细胞核蛋白。

## 蛋白溶液变形

每个样品总蛋白溶液加入 2\*loading buffer,涡旋混匀 ， 100 度加热 5min ，在加热前 30s ，注意要 打开盖子再合上继续煮 ，注意看煮完后蛋白的粘稠度 ，如果比较粘稠需要继续煮样本直至样本呈水 样。

**细胞样品**

离心 ，涡旋混匀后再离心 ，继续往后实验 ，如果不立即电泳 ，则放在-80 度保存 ，使用前 完全解冻后 ，涡旋混匀 ，离心后再点样；

**组织样品**

离心 ，将上清转移到一个新的 EP 管中 ， 混匀后再离心 ， 继续往后实验 ， 如果不立即电 泳 ，则放在-80 度保存 ，使用前完全解冻后 ，涡旋混匀 ，离心后再点样。

## 制胶

根据蛋白的分子量大小 ， 配制 10%的分离胶和 5 %的浓缩胶 ， 为防止胶凝固应在加入 TEMED 后 立即灌胶；

## 灌胶

将干净的玻璃板固定好 ，然后加入预先配制好的分离胶 ，并加水液封除去气泡。待胶凝固后 ，用 滤纸吸干玻璃板中水分 ，然后加入浓缩胶并插入梳子 ，待胶再次凝固后轻轻拔出梳子；

## 电泳

处理好的各组蛋白样品并开始电泳。浓缩胶电压为 80 V ，分离胶电压为 130 V ，待条带到达玻璃 板底部时结束电泳；

## 转膜

PVDF 膜于甲醇中活化 1 min ，将夹子的黑色面放入装有转移液的玻璃平皿中 ，从下到上依次放 入一层海绵垫 ，三层滤纸 ，分离胶 ， PVDF 膜 ，三层滤纸 ，最后盖上一层海绵垫 ，排掉气泡 ，夹紧夹 子 ，加入预冷的转膜液 ，设定电流为 250 mA ，于冰浴中转膜 1.0 h；

## 封闭

将上一步转好的 PVDF 膜放入适量 5 %脱脂奶粉中 ，于脱色摇床上振荡封闭 1 h；

## 一抗孵育

一抗按照试剂与耗材表中的比例用 TBST 稀释 ，将封闭后的 PVDF 膜装入孵育盒中 4 °C 孵育过 夜。用 TBST 洗 5 次 ，每次 5 min；

## 二抗孵育

二抗按照试剂与耗材表中的比例用 TBST 稀释 。将膜二抗中孵育 1 h 。 用 TBST 洗 5 次 ， 每次 5 min；

# 发光检测

1. 滴加新鲜配制的 ECL 混合溶液到膜的蛋白面侧 ，发光检测。
2. 根据不同的光强度调整曝光条件 ，显影。
3. 结果分析
4. 将图片进行存档 ， ImageJ 软件处理系统分析目标带的光密度值。

**详细实验结果见表格**