

# Western blot

## 1. 样品制备

- 1.1 提取总蛋白，BCA法测定蛋白浓度
- 1.2 蛋白变性：按4:1比例将蛋白样品与5×SDS上样缓冲液混合，99°C金属浴5 min

## 2. 制胶

- 2.1 根据蛋白分子量大小配制合适浓度的分离胶，待其聚合
- 2.2 配制浓缩胶，将胶液沿玻璃板内壁注入分离胶上方，插入干净的梳子，待浓缩胶完全聚合，小心垂直拔出梳子。

## 3. 电泳

- 3.1 将凝胶安装于电泳槽中，加入电泳缓冲液，向加样孔中加入蛋白Marker与样品
- 3.2 恒压80 V电泳20 min，待样品完全进入分离胶，调整电压为120 V继续电泳至溴酚蓝指示剂前沿到达胶底部约1 cm处。

## 4. 转膜

- 4.1 裁剪合适尺寸的PVDF膜，甲醇活化，按照滤纸—PVDF膜—凝胶—滤纸的顺序装转膜夹，每层均需排气泡
- 4.2 根据蛋白质分子的大小调节电转仪电压和转膜时间。

## 5. 封闭

- 5.1 5%脱脂牛奶室温孵育2 h。

## 6. 抗体孵育

- 6.1 一抗孵育：将封闭后的PVDF膜PBST洗涤3次，每次10 min，将膜放入一抗孵育液中，4°C过夜
- 6.2 二抗孵育：PBST洗涤膜3次，每次10 min，放入二抗稀释液孵育液中，室温水平摇床孵育2 h，PBST洗涤膜3次。

## 7. 显影

- 7.1 按1:1比例混合ECL发光试剂A液和B液，均匀滴加于膜上，暗室中采用化学发光成像系统采集信号。

## 8. 统计分析

- 8.1 采用ImageJ软件对条带灰度进行统计，以内参蛋白（如β-actin）为对照进行相对定量分析。

## 常见问题解析

### 1. 条带出现拖尾或弥散怎么办？

①优化上样量：减少过量上样，若条带信号弱可通过延长曝光时间弥补，避免过量上样导致的条带变形；②调整凝胶浓度：根据蛋白分子量选择合适浓度（小分子蛋白12%-15%，大分子蛋白8%-10%），浓度过高易导致迁移受阻、条带弥散；③改善样品处理：确保蛋白变性充分（95°C金属浴5 min）且避免反复冻融（建议分装保存）；上样前12000 g离心5 min，彻底去除沉淀性杂质；④检查电泳缓冲液：使用新鲜配制的缓冲液，电泳过程中若缓冲液发热明显，需冰浴降温，防止离子强度异常影响迁移。

### 2. 转膜后无条带或信号极弱怎么办？

①验证转膜效率：除观察预染Marker外，可对转膜后的凝胶进行考马斯亮蓝染色（5 min快速染色），若凝胶上仍有明显条带，提示转膜不完全；②排查膜处理问题：PVDF膜需用无水甲醇活化2 min至透明，未活化或活化时间不足会导致膜无法吸附蛋白，活化后立即转入转膜缓冲液平衡5 min，避免膜干燥。

### 3. 条带出现非特异性杂带怎么办？

①优化抗体浓度：降低一抗浓度，或缩短孵育时间，减少非特异性结合；②改善封闭效果：改用3% BSA封闭液，延长封闭时间至3 h；③排除样本交叉污染：确保不同样本上样时枪头不混用，避免高丰度蛋白样本污染低丰度样本；④选择特异性更高的单抗而非多抗。

## 参考文献

[1] Jia JZ, Kole T, Hai BZ, et al. STAT5 and STAT3 balance shapes dendritic cell function and tumour immunity [J]. Nature, 2025,643(8071):519-528.