



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 38477—2020

---

## 基因表达的测定 蛋白印迹法

Determination of gene expression—Western blot

2020-11-19 发布

2020-11-19 实施

国家市场监督管理总局  
国家标准化管理委员会 发布

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中国标准化研究院提出并归口。

本标准起草单位：河北医科大学、中国标准化研究院、河北省食品检验研究院、中国科学院遗传与发育生物学研究所农业资源研究中心、中国医科大学、河北师范大学。

本标准主要起草人：吕品、马爱进、张岩、赵伟东、曹鹏秀、赵美丞、王宁。



# 基因表达的测定 蛋白印迹法

## 1 范围

本标准规定了用蛋白印迹(Western blot)法测定基因表达的方法原理、试剂或材料、仪器设备、测定步骤和结果分析。

本标准适用于动植物组织或体外培养细胞目的基因表达测定。

## 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

## 3 术语、定义和缩略语

### 3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

#### 3.1.1

**基因表达 gene expression**

将储存在 DNA 分子中的遗传信息经过转录和翻译,转变成具有生物活性的蛋白质分子的过程。

### 3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

BSA:牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin)

ECL:增强型化学发光(Enhanced Chemiluminescence)

SDS:十二烷基硫酸钠(Sodium Dodecyl Sulfate)

SDS-PAGE:十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

TBS:Tris 缓冲盐溶液(Tris Buffered Saline)

TBST:吐温-20/Tris 缓冲盐溶液(Tween-20/Tris Buffered Saline)



## 4 原理

SDS-PAGE 分离的蛋白质转移到转印膜上后,先用抗目的蛋白质的一抗与转印膜上的蛋白质反应,然后利用带标记的二抗与一抗反应,最后根据二抗标记物的特性,检测微量蛋白质。

## 5 试剂或材料

### 5.1 总则

除非另有规定,仅使用分析纯试剂。

### 5.2 水

GB/T 6682,二级。

### 5.3 1 mol/L Tris-盐酸溶液

称取 12.1 g Tris 加入 80 mL 水溶解,用盐酸调至所需 pH,加水定容至 100 mL。

### 5.4 2 mol/L 氯化钠溶液

将 117 g 氯化钠加水溶解,定容至 1 000 mL。

### 5.5 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸溶液

称取 18.61 g 乙二胺四乙酸二钠二水合物,加入 80 mL 水,充分搅拌,用氢氧化钠调 pH 至 8.0,然后定容至 100 mL。

### 5.6 动物细胞/组织总蛋白裂解液

取 5 mL 1 mol/L Tris-盐酸溶液(pH 8.0)、7.5 mL 2 mol/L 氯化钠溶液、1 mL 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸溶液、1 mL 乙基苯基聚乙二醇、0.1 g 十二烷基硫酸钠、1 g 脱氧胆酸钠、加水定容至 100 mL。使用前加入蛋白酶抑制剂。

### 5.7 植物总蛋白抽提试剂盒

含裂解液和蛋白酶抑制剂。

### 5.8 1.5 mol/L Tris-盐酸(pH 8.8)溶液

将 18.15 g Tris 加入 80 mL 水溶解,用 1 mol/L 盐酸调 pH 至 8.8,加水定容至 100 mL。

### 5.9 丙烯酰胺溶液

称取 29 g 丙烯酰胺单体和 1 g  $N,N'$ -甲叉双丙烯酰胺,加水溶解并定容至 100 mL,过滤,置于棕色瓶,4 °C 避光保存,2 个月内使用。

### 5.10 0.1 g/mL 十二烷基硫酸钠溶液

称取 10 g 十二烷基硫酸钠,加水溶解并定容至 100 mL,室温保存。

### 5.11 0.1 g/mL 过硫酸铵溶液

称取 1 g 过硫酸铵,加水溶解并定容至 10 mL,分装后,于-20 °C 保存。

### 5.12 蛋白浓度测定试剂盒

含蛋白质标准品 BSA 和染料试剂。

### 5.13 5×SDS 上样缓冲液

取 2.5 mL 1 mol/L Tris-盐酸(pH 6.8)缓冲液、2 g 十二烷基硫酸钠、1.2 mL  $\beta$ -巯基乙醇、4 mL 甘油、0.2 g 溴酚蓝加入水中溶解,定容至 40 mL。

### 5.14 5×SDS-PAGE 电泳缓冲液

称取 23.5 g 甘氨酸和 3.775 g Tris,加水溶解,定容至 250 mL。使用时按如下比例稀释至使用浓度:取 133 mL 5×SDS-PAGE 电泳缓冲液,7 mL 0.1 g/mL 十二烷基硫酸钠溶液,加水定容至 700 mL。

### 5.15 转膜缓冲液

称取 3.03 g Tris,14.4 g 甘氨酸,加水溶解,再加 200 mL 甲醇混匀,定容至 1 L,4 ℃ 保存。

### 5.16 TBS 溶液

量取 75 mL 2 mol/L 氯化钠溶液和 10 mL 1 mol/L Tris-盐酸(pH 7.5)缓冲液,加水定容至 1 L。

### 5.17 TBST 溶液

量取 75 mL 2 mol/L 氯化钠溶液、10 mL 1 mol/L Tris-盐酸(pH 7.5)缓冲液和 1 mL 吐温-20,加水定容至 1 L。

### 5.18 封闭液

称取 5 g 脱脂奶粉,溶于 100 mL TBST 溶液,混匀,现用现配。

## 6 仪器设备

- 6.1 电泳仪。
- 6.2 转膜仪。
- 6.3 垂直电泳槽。
- 6.4 分析天平,感量 0.001 g。
- 6.5 平板摇床。
- 6.6 低温离心机,最大离心力 25 910 g。
- 6.7 化学发光仪/红外荧光成像系统。
- 6.8 振荡器。
- 6.9 真空干燥器。
- 6.10 2.45 mm 超厚滤纸。
- 6.11 1.5 mL 离心管。
- 6.12 磁力搅拌器。

## 7 测定步骤

### 7.1 总蛋白的提取

#### 7.1.1 动物总蛋白的提取

将 20 mg 体外培养的细胞或研碎的组织转移至 1.5 mL 的离心管中,加 150  $\mu$ L~250  $\mu$ L 预冷的细胞裂

解液(含蛋白酶抑制剂),振荡器震荡 15 s,冰浴 5 min,重复震荡-冰浴 30 min 后,4 ℃,12 000 r/min 离心 10 min,得上清液。

### 7.1.2 植物总蛋白的提取

按照植物总蛋白提取试剂盒说明进行。

## 7.2 蛋白浓度的测定

按照蛋白浓度测定试剂盒说明进行。

## 7.3 SDS-PAGE

### 7.3.1 蛋白变性

测完蛋白浓度后,计算含 100  $\mu\text{g}$  总蛋白的溶液体积即为上样量。取出上样样品于离心管中,加入  $5\times$  SDS 上样缓冲液至终浓度为  $1\times$ ,将样品于沸水中煮 3 min~5 min 使蛋白质变性。

### 7.3.2 制胶

根据蛋白质相对分子质量大小选择相应的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶浓度,参见附录 A。

### 7.3.3 上样

取 7.3.1 的蛋白样品上样,相邻齿道加上标准分子量预染蛋白,空余齿道用  $1\times$  上样缓冲液补足体积。

### 7.3.4 电泳

选择电压为 8 V/cm,当染料进入分离胶后,把电压提高到 15 V/cm,继续电泳直到溴酚蓝达到分离胶底部,然后关闭电源。

## 7.4 转膜

### 7.4.1 凝胶准备

将进行完 SDS-PAGE 后的凝胶浸泡于转膜缓冲液中 30 min。

### 7.4.2 半干法转移蛋白质

将转印膜和两张与转印膜相同尺寸的滤纸于转膜缓冲液中浸泡 5 min。由下至上安装转移装置:阳极板—超厚滤纸—转印膜—凝胶—超厚滤纸—阴极板,根据凝胶面积按  $0.65\text{ mA}/\text{cm}^2$  接通电流,根据目的蛋白相对分子质量大小,转移 1.5 h~3 h。

## 7.5 封闭

将转印膜置于封闭液中,室温摇动 1 h。

## 7.6 免疫反应

将封闭后的转印膜转移到一抗工作液中,室温下摇动 1 h 以上或 4 ℃ 缓慢摇动过夜。弃去一抗工作液,用 TBST 摇动洗涤转印膜 3 次,每次 10 min,最后用 TBS 摇动洗涤转印膜 5 min。

将转印膜置于二抗工作液中,室温下摇动 1 h~3 h。弃去二抗工作液,以 TBST 摇动洗涤转印膜 3 次,每次 10 min,最后用 TBS 摇动洗涤转印膜 5 min。

## 7.7 成像

### 7.7.1 辣根过氧化物酶标记二抗的成像

取 ECL 化学发光液 A、B 等量混匀,加在转印膜上,避光显色 1 min~5 min,化学发光仪成像。

### 7.7.2 荧光标记二抗的成像

利用荧光成像系统成像。



## 8 结果分析

成像图片本底干净,能观察到转印膜均匀的轻微背景轮廓,目的条带清晰且不过曝,即可判为目的蛋白表达。

附 录 A  
(资料性附录)  
试剂配制

### A.1 SDS-PAGE 分离胶

根据所需浓度不同,按照表 A.1 配制。

表 A.1 配制 10 mL 不同浓度分离胶所用溶液

| 凝胶浓度 | 溶液成分<br>mL                    |        |                        |                    |        |     |
|------|-------------------------------|--------|------------------------|--------------------|--------|-----|
|      | 1.5 mol/L Tris-盐<br>酸(pH 8.8) | 丙烯酰胺溶液 | 0.1 g/mL 十二烷基<br>硫酸钠溶液 | 0.1 g/mL<br>过硫酸铵溶液 | 四甲基乙二胺 | 水   |
| 6%   | 2.5                           | 2.0    | 0.1                    | 0.1                | 0.008  | 5.3 |
| 8%   | 2.5                           | 2.7    | 0.1                    | 0.1                | 0.006  | 4.6 |
| 10%  | 2.5                           | 3.3    | 0.1                    | 0.1                | 0.004  | 4.0 |
| 12%  | 2.5                           | 4.0    | 0.1                    | 0.1                | 0.004  | 3.3 |
| 15%  | 2.5                           | 5.0    | 0.1                    | 0.1                | 0.004  | 2.3 |

### A.2 SDS-PAGE 浓缩胶

按照表 A.2 配制 SDS-PAGE 浓缩胶。

表 A.2 配制 5 mL 5%浓缩胶所用溶液

| 凝胶浓度 | 溶液成分<br>mL                  |        |                        |                    |        |     |
|------|-----------------------------|--------|------------------------|--------------------|--------|-----|
|      | 1 mol/L Tris-盐<br>酸(pH 6.8) | 丙烯酰胺溶液 | 0.1 g/mL 十二烷基<br>硫酸钠溶液 | 0.1 g/mL<br>过硫酸铵溶液 | 四甲基乙二胺 | 水   |
| 5%   | 0.63                        | 0.83   | 0.05                   | 0.05               | 0.005  | 3.4 |