

Western Blotting

一、准备工作

- 1、1 mL、100 μ L、10 μ L 的移液器及对应枪头；50、100 和 200mL 烧杯；吸水纸
- 2、清洗好玻璃板、配胶架及梳尺，将玻璃板对好放入配胶架
- 3、从 4°C 冰箱取出 30% 丙烯酰胺，10% AP、TEMED
- 4、需要试剂及配制附后

二、操作步骤

1、配胶

配胶量根据选择的梳子而定。

用 1.5 mm 的梳子：浓缩胶（下层胶）7 mL，分离胶（上层胶）3 mL；

用 0.75 mm 的梳子：浓缩胶 3.5 mL，分离胶 2 mL，

计算配胶所需要的上下层胶总体积数，具体配胶见实验室配方。

注意：按照配方，依据蛋白分子量配置一定量及浓度的下层胶（需要在加 TEMED 之前混合均匀并准备好 1 mL 枪,准备加胶与水）

2、做胶

将下层胶用 1 mL 移液器贴玻璃板壁加入玻璃板中间至距离矮玻璃板上缘 2 cm 处。加水或者无水乙醇封好上层空隙，赶走全部的气泡。待下层胶聚合后（凝结时间参考杯内残胶）（下层胶凝结过程中，配置除 TEMED 的上层胶），倾倒出水，并用吸水纸吸尽全部残留水分，迅速将上层胶加上 TEMED 加入玻璃板中间，将梳尺插入到上层胶（插梳尺时宜用吸水纸盖住）

- 注意：1) 冬天 TEMED 加倍，热天 TEMED 减半，若时间紧急请多加，这样胶凝得快。
- 2) 若配置好的胶要直接使用，则用水冲洗下，用两个拇指对齐一起用力推出梳尺，并用水冲净胶泳道中全部 SDS。3) 若暂时不使用，则不拔梳尺，将其先用一张浸泡水的吸水纸包好，再用保鲜膜包好至于 4°C 冰箱保存，写上所配置浓度，配置人及日期。

3、煮样

提前 2 min 打开电磁炉或金属浴，将样品与 Protein Loading Buffer，按照比例混合好，插入浮子，待水沸腾后，将浮子投入开水中煮 5min。样品煮好后放冰上冷却，置于离心机上轻轻离心。

注意：1) 不要用成 DNA loading buffer

2) 煮样时要在旁边守候以免管盖爆开，使用金属浴不存在此问题

3) 使用 500 μ L EP 管装样，这样盖子不会爆开；若中途管爆开口，则应立即盖上继续煮

4、上样

1) 预先冲洗一下电泳用仪器，将胶板的矮玻璃一面朝向电泳槽中心，将安置好的胶板连同电泳仪器放入电泳槽中，加入 1xSDS 电泳缓冲液至将玻璃板完全没过（若跑单块胶，则应该用另外一块塑料板封堵另外一侧）。

2) 从-20 $^{\circ}$ C冰箱取出预染 Protein Marker，离心。用 2-20 μ L 枪头上样（上样量 5 μ L）。上样时，枪头对准、抵住后面玻璃慢慢加入。

5、电泳

1) 电极正负极插好。分两个阶段进行电泳，第一阶段电压为 80v，10-30min 使样品跑出分离胶进入浓缩胶。

2) 进入浓缩胶后，第二阶段电压为 120-180v，至前沿溴酚蓝跑出胶,大约需要 1-1.5h(根据蛋白大小而异)，电泳过程中需经常留意电泳情况。

3) 在电泳过程中准备好 1 \times 转膜 Buffer，并置于 - 20 $^{\circ}$ C冰箱预冷

注意：1) 电泳刚开始时，要注意电泳是否正常，缓冲液页面有无下降，如果下降说明两块板密封不好，要重新安装。2) 转膜 Buffer 中不要忘记加入甲醇，甲醇在 4 $^{\circ}$ C冰库有很多。100 mL 10X 转膜 Buffer + 200 mL， 甲醇 + 700mL 去离子水

6、转膜

1) 在电泳快结束时应准备好转膜所需要的工具：白瓷盘、剪刀、镊子、取出转膜缓冲液，滤纸，PVDF 膜（或 NC 膜），转膜仪，海绵。

2) 在大平皿中加入约 2/3 容积的转膜 Buffer，依次将海绵滤纸放入其中浸泡，将电泳槽拆开取出装胶的玻璃夹，将玻璃夹轻轻敲开，将上层胶去掉，按照 Marker 的显示条带及目的条带的大小切胶，在左上角切去一小块；将玻璃夹靠近

大平皿中的液面，小心的将胶转移至平皿中的滤纸上，剪取适当大小的膜，将膜覆盖在胶面上，取出海绵放在塑料夹的黑色侧，将滤纸胶及膜对齐后一起用镊子夹至海绵上放好，且在安放时应使胶切缺口的一角位于塑料夹的右下角，并在膜的右下角剪掉一小块，铺上滤纸（此操作应避免有气泡产生），赶走之间可能存在的气泡；铺上海绵，将塑料夹子压好，夹子黑色的一面对准装置黑色的一面，且应放在紧挨装置红色的一侧（一块胶），放入冰盒，将电泳槽盖正负极对准后盖好，将电泳槽放在冰里，打开电泳仪开关，我们用的转膜条件是恒压（100A），1小时（蛋白大小约 30-50KD）。不同蛋白不一样。

3) 向转膜槽内放入冰，将整个转膜槽放入冰水浴。转膜时间与转膜电流对于不同蛋白应采取不同条件

注意事项：1) 用清水冲洗一下胶，用塑料割刀敲开胶板，切（而不是割）除上层胶，在胶面左上角切去一小角作上标记。2) 膜放入到甲醇中浸泡数分钟。3) 转膜时，若转膜夹黑面放在下面，则转膜时剪去的角应放于右上角。4) 如果转膜时间长期间应检查更换冰盒。5) 转膜顺序如下：阴极，海绵，2x 滤纸，胶，NC 膜，2x 滤纸，海绵，阳极。6) 若单转一块膜，则还需要另外一块转膜夹加上两层海绵，凑齐两块转膜夹共同放入转膜槽中，空白夹放于中间。

7、预染

转膜结束后，若不知道转膜效果如何，则放在丽春红溶液中预染看是否有蛋白条带，然后 TBST 脱色，洗脱三次，每次 5min

8、封闭

加入 10mL 5% 的脱脂奶粉至于摇床封闭 30min。

9、一抗孵育

1) 将膜用封膜仪封于一次性手套中，加入一抗（用脱脂牛奶按照比例稀释），用透明胶带贴在转轮上旋转 1.5h。也可 4 度过夜。

2) 孵育完毕后，将封闭的手套完全剪开，一抗回收，将膜取出放入 TBST 洗三次，每次 5min.

10、二抗孵育

1) 将膜用封膜仪封于一次性手套中，加入二抗（用脱脂牛奶按照比例稀释，实验室通常使用 GAR 羊抗兔抗体 1: 5000），放在小槽子里摇 1h。

2) 孵育完毕后，将膜取出放入 TBST 洗三次，每次 5min.（在二抗清洗的过程中准备曝光用品：吸水纸，PVDF 膜大小的保鲜膜。用透明胶带贴于曝光夹之中，普通发光液 A 和 B 按照 1:1 混合，一般的小膜 200 微升即可）（配好发光液后，发光液 A 和 B 应迅速放回 4°C 冰箱）

11、发光与曝光

1) 将 PVDF 膜取出，剪角在置于左上角，放于保鲜膜上，将发光液均匀滴在膜表面，液体要覆盖住膜，保持薄薄一成液体。反应 2 min。用吸水纸将发光液从一侧吸除。

2) 将保鲜膜的下缘反折将 PVDF 膜盖住，用透明胶带将保鲜膜封好，快速拿到暗室中曝光。

3) 整个房间不要有可见光。用底片将 PVDF 膜完全盖住，曝光时间应根据抗体好坏决定。

4) 将显影液倒入盘中，将底片的右上角折一下。放入显影液中 1 min 左右，放入清水中冲洗一下，再放入定影液。定影 2min 后，用水冲洗，将底片放到 60°C 烘箱烘干。

三、溶液配制

1、10×SDS-PAGE 电泳缓冲液

	1L	10L
Tris	30.2g	302g
Glycine	188g	1880g
SDS	10g	100g

一般配 1L,称取 30.2g Tris、188g Glycine 加入桶里，加水约 1L，充分溶解；戴口罩于通风橱中称取 100g SDS（粉末有毒），加入桶中，充分溶解。室温保存。

2、10× 转膜 Buffer

	1L	10L (100×)

Glycine	3.03g	303g
Tris	14.4g	1440g
Methanol	200mL	

去离子水定容至 1L, pH 调至 8.1-8.4 (pH 正好介于 8.1-8.4)。转膜时间: Protein >72KD 400mA, 2 h; Protein <55 KD, 300mA, 1 h。

1L 配方: 称取 3.03g Tris、14.4g Glycine 加入桶里, 充分溶解, 去离子水定容至 1L, 用时现加 Methanol。

3、10× TBST buffer(western 杂交膜清洗液)

组份浓度: 20 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、0.05% (v/v) Tween 20

	1L (1×)	1L (10×)	10L (10×)
NaCl	8.8g	88g	880g
1M Tris-HCl (pH8.0)	20mL	200mL	2L
Tween20	0.5mL	5mL	50mL

(1) 1L 10×: 称取 88g NaCl 加入桶里, 加入 200mL 1M Tris-HCl (pH8.0), 加水至 1L, 充分溶解; 储存。

(2) 使用时每 1L 1×TBS 加入 500μL Tween20 充分混匀。

4、用 5%脱脂牛奶 Block, 可以尝试 1X TEN

1X TEN (WB block buffer)

组份浓度: 0.15M Nacl、0.005M EDTA pH 8.0、0.05M Tris pH 7.5、0.05% Triton X 100、1%BSA

配制方法: 1X TEN 1.5L

Nacl	13.16g
0.5M EDTA PH8.0	15mL
1M Tris PH7.5	7.5mL
10% Triton X 100	7.5mL

加水配制成 1.5L

(1) 30%丙烯酰胺 (Acr): 称 Acr30g, 甲叉双丙烯酰胺 (Bis) 0.8g, 加蒸馏水至

100mL, 过滤后置棕色瓶中。(4°C避光)

(2) 10%SDS (十二烷基磺酸钠)

(3) 1.5mol/L pH8.8 Tris-HCl 缓冲液: 称取 Tris 18.2g, 加入 50mL 水, 用 1mol/L 盐酸调 pH8.8, 最后用蒸馏水定容至 100mL

(4) 1.0mol/L pH6.8 Tris-HCl 缓冲液: 称取 Tris 12.1g, 加入 50mL 水, 用 1mol/L 盐酸调 pH6.8, 最后用蒸馏水定容至 100mL

(5) 0.05mol/L pH8.0 Tris-HCl 缓冲液: 称取 Tris 0.6g, 加入 50mL 水, 用 1mol/L 盐酸调 pH8.0, 最后用蒸馏水定容至 100mL

(7) 10%过硫酸铵(AP)

(8) TEMED (四甲基乙二胺)