**Western Blot**

Attation:

跑胶图漂亮的要点：a. 胶干净！b. 样品干净！c. Buffer新鲜！

**A: 第一天：配胶。**要点：保证胶干净！！

1. 洗洁精清洗长短板，梳子，纯水冲洗干净。悬空晾干。擦净。
2. 装板：将架子的胶条洗净。装好板子。注意长短版不要弄乱，底部平行，不漏胶。
3. 分离胶：1.0mm 5ml/板

+ dd H2O 1.从冰箱拿出后，应先放置一会儿，避免温度过低

+ 30% 丙烯酰胺 2.先加，混匀。

+ 1.5M Tris-HCl PH 8.8

+ 10% SDS#SDS即十二烷硫酸钠，可以为电泳提供钠离子，一方面能去除蛋白的电荷，使得蛋白分离仅受蛋白质分子量的大小影响，一方面能解离蛋白之间的氢键，同时还能去除蛋白的疏水作用，总而言之就是电泳时仅受分子量大小的影响

+ 过硫酸铵

+ TEMED （可稍多加可加速凝固，或放置在烘箱，加速此化学反应过程）最后加！！

混匀

灌 胶

先用1ml试胶（检漏），再加至绿线下游，100%酒精封胶

放置15-20分钟，待其凝固

1. 浓缩胶：1.0mm 1.5ml/板

倒掉酒精，用小的滤纸片将残余的酒精擦拭干净。

+ dd H2O 1.从冰箱拿出后，应先放置一会儿，避免温度过低

+ 30% 丙烯酰胺 2.先加，混匀。

+ 1.5M Tris-HCl PH 8.8

+ 10% SDS

+ 过硫酸铵

+ TEMED （可稍多加可加速凝固，或放置在烘箱，加速此化学反应过程）最后加！！

混匀

灌 胶

插梳子（先将梳子放下，再用枪头将其按下去，避免弄脏胶&手套）

胶凝后，纸包着，水浸润，保鲜膜包裹，放4度冰箱，第二天用

**B: 第二天：跑胶。**

1. 胶从冰箱取出，室温仿制一会儿，避免过冷。
2. 配置1X SDS Buffer：用10X母液+纯水稀释。（浓度可稍高一点，离子更多，有利于跑胶。PS：跑胶液最好新鲜配置，不要反复使用。）
3. 在笔记本上标记点样顺序。
4. 装板。把胶拿到水池边，边用清水冲洗，边缓慢拔出梳子，切勿将孔戳破或者弄变形。然后将胶装在跑胶架上，注意密闭性。
5. 点样。注意轻、慢！！a.各孔点样体积一样，多余的孔用IP LB+Buffer点样，保证每孔都有样品，使跑样时电压一致。b.用长针孔枪头。C.为避免误差，吸取样品前，要先将样品轻弹混匀，吸取样品后，要将枪头在跑胶液中涮一下，去除枪头壁上沾到的样品。
6. 插好电极，恒压100V，100min。

**C: 转膜。**

1. 准备 （滤纸+ECL膜+滤纸）在1X SDS Buffer中浸泡1min。
2. 配置转膜液:

200ul 甲醇

1L 100ul 10x转膜液

700ul 纯水

1. 将胶拿出来，清水冲洗去掉SDS（转膜时SDS与甲醇有拮抗作用），翘板，去掉浓缩胶，泡在转膜液中。
2. 包三明治。

蛋白从 胶 膜

（黑色） 负极 正极（透明）

顺序： 负极（黑）海绵垫+滤纸+胶+膜+滤纸+海绵垫 正极（透明）

Attation: 胶与膜之间要赶气泡！

1. 将包好的三明治装在架子上，注意正负极！将转膜液倒满。转膜钢中放置冰块。
2. 插好电极。90V，1.5h。

**D: 封闭+一抗+二抗**

1. 回收转膜液（一般可用3次），取出膜泡在丽春红中染色，观察条带。

丽春红为可逆性的蛋白染料，水洗可去除。

1. 回收丽春红，清水洗膜，去掉丽春红。
2. 封闭液配置：2.5g脱脂牛奶+50ml 1X PBST 摇匀（5%脱脂牛奶）
3. 裁剪掉多余的膜，便于其摇晃，去掉背景污染。
4. 将膜浸泡在封闭液中，封闭1-1.5h。
5. 倒掉封闭液，配置一抗：12ml 5%脱脂牛奶+4ul一抗。4度，摇晃过夜。
6. 第三天，取出膜，1X PBST洗涤3次，摇床8min/times。
7. 加 二抗稀释用1X PBST（1:5000）。将膜放入二抗稀释液中，摇床1.5h。
8. 取出膜，1X PBST洗涤3次，摇床8min/times。
9. 显影液的配置：A、B液各取200ul，1:1混匀。
10. 显影。查看条带。