**WB**

分离胶→收集细胞→浓缩胶→裂解细胞→BCA蛋白定量→加样电泳→配转膜液

准备：RIPA裂解液、0.5mg/ml 标准品 冰上解冻

1. 蛋白样品提取：
2. 胰酶消化，1000rpm离心3min收集细胞，弃上清，PBS混匀后移至EP管，1000rpm离心3min，洗涤两遍弃上清。
3. **（冰上操作）**按照RIPA:PMSF:磷酸酶抑制剂=100:1:1配制RIPA裂解混合液，加入80ul裂解液（按100ul配），高速剧烈震动15 s。（**组织**样本加入200ul裂解液）
4. **冰上裂解15min**，然后 4℃ 14000rpm/min 离心10min，取**62ul（60ul样品+1ul测定两个重复）**至新的EP管。（上清-蛋白质、糖类、核酸；沉淀-细胞碎片）
5. BCA蛋白样品定量：
6. 用PBS将蛋白标准品调整至浓度0.5mg/ml（标准蛋白30g＋稀释液1.2ml配成2.5mg/ml， EP管中稀释5倍，~~100ul 5mg/ml BAS+900ul PBS~~)
7. 计算BCA用量：[(样本+标准品)+1管]×200ul
8. 配制蛋白定量（BCA）工作液：A试剂：B试剂=50：1混合均匀。
9. 加**20ul**体系到96孔板：**标准品**（8孔）**、2ul 样本**+18ul PBS

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 标准品（ul） | 0 | 1 | 2 | 4 | 8 | 12 | 16 | 20 |
| PBS（ul） | 20 | 19 | 18 | 16 | 12 | 8 | 4 | 0 |
| C（mg/ml） | 0 | 0.025 | 0.05 | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.4 | 0.5 |

1. 加**100 ul** BCA，37℃，30min，酶标仪 A562nm测量，(根据**蛋白样品：5×蛋白上样缓冲液=4:1**的比例混匀，用RIPA裂解液将不同样品平衡到同一浓度**1ug/ul**)
2. 软件→随便输→New session→plate Layout-点击Wizard-type：Black（浓度0作为空白）→Calibrator 按标准品所在位置依次输入浓度0.025，0.05，0.1，0.2，0.3，0.4，0.5→type：unkown,(竖向)设置待测孔数，保存。
3. protocol：设置吸光度562nm，摇板，保存→进板，开始检测→Result：photometric-减空白-graph
4. Result：折线图→查看标准曲线和**R平方值>0.99**→导出数据：export→选择全部→add→保存到个人文件夹→打开数据将测得的OD值（Y）带入公式计算**稀释后**的蛋白浓度x=（y-a）/b，Excel中列出：

1.×10：**蛋白浓度**乘以10得到**原始**蛋白浓度；

2. **V总**：**将浓度统一至1ug/ul**，即V总=（原始蛋白浓度ug/ul\***60**ul样本量）/ 1ug/ul即V总=1**.x10蛋白浓度**\*60；

3.**V 5x**=V总/5

4.**需要补齐的R=** V总-**60**-V 5x**[60ul：按实际吸取样本量计算]**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| V样本 | 浓度 | x10浓度 | V总 | 5x | RIPA |
| 60ul | 1.5 | 1.5\*10=15 | 15\*60=900 | 900/5=180 | 900-180-60=660 |
| 30ul | 0.5 | 0.5\*10=5 | 5\*30=150 | 150/5=30 | 150-30-30=90 |

1. 蛋白样品变性处理：

金属浴**95℃，5min，点离**取上清上样。

样本置于-20℃保存，室温融化后点离取上清上样。

|  |  |
| --- | --- |
| 分离胶浓度 | 线性分离范围 （kDa） |
| 6% | 50-150 |
| 8% | 30-90 |
| **10%** | **20-80** |
| **12%** | **12-60** |
| 15% | 10-40 |

1. 蛋白PADE胶的配制：30%Acr（丙烯酰胺）**棕瓶避光保存 /**过硫酸铵（AP）**避光保存/**TEMED（**棕色瓶**，最后加）

按表配制分离胶（下层胶）、浓缩胶（上层胶），**加入除TEMED外的液体，安装胶板，最后加TEMED，**振荡器混匀，灌入玻璃板，加入**ddH2O**压平分离胶，20-30min待凝固，倒出上层液体，滤纸吸干，灌入浓缩胶，插入梳子。

1. 蛋白凝胶电泳：

（样品解冻，)取出PAGE胶，拔掉梳子，用水冲洗，装入电泳槽（注意安装，防止漏液），加新配**1x电泳缓冲液**(**里面加新配的，外面加回收的至2gels处**)，上样-小孔10ul，大孔**20ul**,往夹板之间补充新配电泳缓冲液，**对应正负极盖上盖子，红对红(正极)，黑对黑(负极)**，**80V电泳，30min，继续电泳120V 60min**。回收**外部**电泳缓冲液。（Marker少量+1×上样缓冲液，两端和空白孔用1×上样缓冲液补齐，两边尽量不用。每个孔都要上**等体积**的样品，没有样品的空上loading，marker也要用loading稀释到相同体积。）

1. 转膜：
2. 配制转膜缓冲液：天平称量Tris 3.0g+甘氨酸14.4g，倒入烧杯，量筒量200ml甲醇+800mlddH2O（1L），玻棒搅拌，薄膜手套封口，-20℃预冷。**更换手套。**
3. **（提前打冰）**裁剪**4.5cm\*8cm**的PVDF膜，泡入**甲醇**中待用（活化），盆中倒入4℃**预冷**的转膜液(**旧**)，从下往上按（黑板+海绵+滤纸+胶+膜+滤纸+海绵+白板）**（膜正胶负，蛋白带负电，往正极移动）**将转膜夹和海绵完全浸入缓冲液中，放滤纸。将电泳完的凝胶玻璃板取出，**切胶**，然后将胶置于滤纸上，并用转膜液润湿。将PVDF膜置于凝胶上（**剪去左上角，作为标记，右上缺角放置为正面**），赶除PVDF膜与凝胶之间的气泡，盖上润湿的滤纸，不要有气泡，合上转膜夹。将转膜夹对应正负极放入转膜槽，**黑对黑（-），白对红（+）**，放入冰盒，灌满**新配的**转膜液**（回收一半）**，对应正负极盖上盖子，加入冰块，**300mA 90min或100V 90min**转膜。
4. 转膜完成后，取出PVDF膜置于**1%TBST**中清洗3次，5-10min/次，速度80-90**（1%TBST配制：100ml 10%TBST+900mlddH2O+500ul吐温）**。
5. 封闭:

将条带放入**快速封闭液**中15-20min，然后用TBST洗3次，5-10min/次，速度**80-90**转。（**研究磷酸化不能用脱脂牛奶**）

（将PVDF膜取出放入预先配制好的**5%**脱脂牛奶（1×TBST 40ml＋奶粉2g），室温缓慢摇动1h。）

1. 切条带：

将条带置于滤纸上，盖上薄膜手套，切相应条带。（marker-70；内参-37；目标蛋白-）

1. 一抗二抗孵育：

将清洗完的PVDF膜置于一抗中（1:2000，一抗稀释液稀释），封膜，4℃摇动过夜。过夜后将孵育了一抗的PVDF膜置于TBST中重复清洗3次，5-10min/次。放入配制好的二抗(1:2000，TBST稀释)中孵育，室温缓慢摇动1h**（不宜太久）**，用TBST清洗3次，5-510min/次。

1. 显影：

将底物AB液按1：1（各400ul/**一条目的蛋白100ul**）混合均匀，将PVDF膜控干后平铺于盒子中，将显影液均匀涂在PVDF膜上，避光孵育2min后置于Bio-rad自动显影仪进行显影。**（新建-印迹-应用程序(chemi)-图像曝光(信号累积模式1/100/100)-点击放置凝胶并暗盒放入仪器中-调整位置-点击取消/运行-运行）**

**缓冲液、清洗液配置**

**5×蛋白loading buffer 购买**

**1×蛋白loading buffer（1ml）：200ul 5×loading buffer + 800ul ddH2O**

PBS：粉末配制

5x电泳缓冲液：Tris 15.1g；甘氨酸 94g；SDS 5g ddH2O定容至1L

1x电泳缓冲液（500ml）：100ml 5x电泳缓冲液；400ml ddH2O

10%TBST：粉末配制

1%TBST：100ml 10%TBST；900ml ddH2O；500ul吐温-20

50×TAE溶液：

1×TAE溶液：490ml ddH2O＋10ml 50×TAE

转膜缓冲液（1L）：Tris 3.0g+甘氨酸14.4g+200ml甲醇+800ml ddH2O 放置－20℃