

Western Blot Protocol

煮样

- 1、取出离心后的样品(-80 °C),放置到冰浴盒上,按照 BCA 计算表将样品与 35%(DTT+LDS) 进行混合,并补充超纯水至 200 μL 。
- 2、将混合后的样品,放置到金属浴上,95 °C处理 5 min。然后取下样品放置在冰浴条件下待用。

注: 35%的 (DTT+LDS) 可以按照 LDS:DTT=2.5:1 进行预配置,然后冻存到-20 °C冰箱。

电泳:

- 3、取 50 mL 的 MES 电泳液 (20X) 加入到 950 mL 的去离子水中稀释到 1X。
- 4、将预制胶片插入到电泳槽中固定,并水平拔出梳子,注意操作小心,以免梳子拔断。
- 5、补充电泳液,使电泳液没过梳子上方,尽可能正面多一些电泳液。
- 6、先加入蛋白 Marker 8 μL , 然后再加入制备好的蛋白样品 10-20 μL , 注意上样量保持一致 (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 上样 15 μL)。如果有剩余的孔可以用 Loading buffer 补齐,做到每个孔都有填充,这样电泳效果更好。
- 7、盖上电泳仪的盖子,接通电源,120 V 电泳约 50 min,使最小的那个 Marker 尽可能跑到最下方,这样蛋白分离效果更好。
- 8、电泳结束后,回收电泳液。

转膜:

- 1、在盛有水的铁盘中将胶片从两个塑料外壳中取出,切割到相应的大小后放到转膜仪上盖好,用碾子沾去离子水后轻轻赶出气泡。盖上一层浸水的滤纸,再盖上上层膜片 (橙色金属面向上),最后在金属膜片上放上一层白色膜 (含有银色金属小标签,在袋子里) 进行转膜。选择模式 2 (20 V, 7 min)。转膜结束后需要尽快取出,以免过热导致胶片损坏。

注: 蛋白电泳胶切割过后,一套转膜器具可以转两张蛋白电泳胶。

封闭:

- 1、将硝酸纤维素薄膜浸泡至 5%的脱脂牛奶中 (2 g/40 mL TBST (100 mL 10X 母液稀释到 1 L), 脱脂牛奶现配现用), 室温下浸泡 1 h。

孵育一抗:

- 1、利用 5%的脱脂牛奶以 1:5000 的比例配制一抗 (抗体 2 μL +10 mL 牛奶), 写好标记以便回收利用一抗。一个一抗是 Tubulin (内参), 一个一抗是 Myc (导入的质粒的共同标签)。
- 2、将浸泡后的硝酸纤维素薄膜转移到含有一抗的 5%的脱脂牛奶中, 4 °C缓慢摇床过夜。

注意: 明确抗体来源的动物类型。

孵育二抗:

- 1、回收一抗，并且做好标记，保存到 4 °C 冰箱。
- 2、加入 TBST 10 mL，摇床上孵育洗涤 10 min，摇速 80（漂洗的时候较快）
- 3、反复第二步操作三次后，移去 TBST。
- 4、用 5% 脱脂牛奶以 1:5000 的比例，配置鼠源二抗（注意：现配现用。在使用一抗时要记清楚是什么动物来源的抗体，然后利用同物种二抗进行孵育）。
- 5、每个薄膜加入约 10 mL 的二抗，进行孵育，摇床缓慢孵育（摇速 20），孵育 1 h。

漂洗与显影:

- 1、回收二抗后，加入 TBST 10 mL，摇床上孵育洗涤 10 min，摇速 80（漂洗的时候较快）。
- 2、漂洗三次，移去 TBST。
- 3、将制备好的硝酸纤维素薄膜转移到拍摄板上，转移前需要擦干净拍摄板。摆正位置，并滴加显影液。
- 4、显影液配置：按照 1:1 的比例混合两种显影液（显影仪旁边），一块薄膜大约总共需要 1 mL 显影液。
- 5、在电脑上选择自己的文件夹，在自己的文件夹内建立新的文件夹后，修改预存文件名，然后进行预览。
- 6、设置曝光时间（正常大约 5 秒钟）、拍照次数后，进行拍摄，这个仪器可以自动保存。根据抗体显影效果来调整曝光时间。
- 7、实验结束后，可以考虑回收硝酸纤维素薄膜，用于杂交其他抗体，观察其他蛋白的表达量。

漂洗原有抗体、杂交其他抗体

- 1) 利用 10 mL 的 Striping 漂洗液浸泡已经化学发光并拍照完后的硝酸纤维素薄膜，并在摇床上（速度：80）快速孵育 10 min。
- 2) 回收 Striping 洗脱液，放置到 4 °C 冰箱保存，可再次利用。
- 3) 向孵育盒中加入 TPST 溶液进行洗涤，每次摇床洗涤 3 min，洗涤三次。
- 4) 弃去 TPST 溶液后，加入新鲜配置的 5% 牛奶（TPST）10 min，孵育 1 h。
- 5) 倒掉牛奶，然后孵育不同的一抗，4 °C 缓慢摇床过夜。