

WB 实验过程

1 试剂及器材

1.1 器材

器材名称	厂家
转移电泳仪	上海天能, VE-180
转移电泳槽	上海天能, VE-180
气浴振荡器	南大普阳
暗盒	自配
台式微量高速离心机	H1650-W 长沙湘仪离心机仪器有限公司
移液器	10μl/50μl/200μl/1000μl Eppendorf
X 光片	柯达

1.2 试剂

试剂名称	配方
ECL 显色液: A B	普利莱
酶标二抗	HRP 标记的兔抗鼠和羊抗兔
显影液, 定影液	南京蓝格显影公司
PVDF 膜	Minipore(0.22um)
电泳液	Tirs 3g, 甘氨酸 14.4g, SDS 1g ,加水至 1L
转膜液	Tirs 3g, 甘氨酸 14.4g, 甲醇 200ml, 加水至 1L
封闭液	PBS+5%脱脂奶粉, PBS+5%BSA
PBST	PBS+0.05%吐温
10*PBS	35.8g 磷酸氢二钠, 2g 磷酸二氢钠, 85g 氯化钠, 加水至 1L。

3 操作规程:

3.1. 制胶和制样

(1) 制备相应浓度的 PAGE 胶;

(2) 根据实验需求取适量抗原样品, 加入 2*或 5*上样缓冲液, 充分混匀后 100 度水浴 10min, 然后 10000rpm 离心 5min.

3.2 电泳

- (1) 按 SDS-PAGE 操作规程装好电泳装置, 按实验设计上样, 每个泳道最大上样量 30ul, 预染 Marker 上样 3ul, 需要根据蛋白大小确定使用哪种 Marker.
- (2) 上样完毕后, 接通电源, 按胶的不同选取不同的起始电压。自制聚丙烯酰胺凝胶先 100V 跑完积层胶, 再将电压升至 120V 直到电泳结束。

3.3 转膜

- (1) 电泳结束后, 将凝胶放置转膜液里浸泡 5-10min, PVDF 膜在甲醇中浸泡 15s, 膜成半透明状, 在超纯水中冲洗一下, 放入转膜液中转膜浸泡后转膜。转膜顺序为: 负极-海绵垫-三层滤纸-胶-膜-三层滤纸-海绵垫-正极。如同时操作多张膜需在膜上编号以便区分。
- (2) 恒流 280mA, 根据分子量大小确定转膜时间。分子量>80KD 转膜时间 1.5-2 小时, 分子量<80KD 转膜时间 1 小时, 分子量<20KD 转膜时间 45min, 恒流 200mA.

3.4 封闭

电转结束后, 取出膜用 PBST 洗涤 4 次, 每次 5min。然后置于 37 度摇床封闭 1 小时。视情况而定采用封闭液。

3.5 一抗孵育

PBST 稀释一抗 (稀释倍数视情况而定), 稀释体积一般 3-4ml 放于抗体孵育盒中 4 度过夜, 内参可以 37 度 1 小时。

3.6 洗膜

一抗结束后, 用 PBST 洗涤 4 次, 可以 37 度也可以 25 度, 每次 5min (磷酸化抗体可以洗三次, 每次 5min)。

3.7 二抗孵育

用 5%的牛奶封闭的稀释二抗 (1:10000). 膜在二抗中 37 度 1 小时。

3.8 洗膜 4 次同上。

3.9 显影

ECL 法:

- (1) 用平板纸吸去膜上的水分, 将膜放置于平面上, 取等体积的 ECL 液 A 和 B 液混匀后加入膜上反应 1min

- (2) 然后取膜弃去 ECL 发光液于暗盒中显影,可根据背景及条带的强弱选择不同的曝光时间。
- (3) 记录好显影时间及配置时间,一般显影液可使用 1-2 周,定影液 2-3 周,像信号较弱的,可通过更换显影液加强显影的强度。