

WB-Protocol

1. 上样与电泳

1.1 将预制胶装入电泳槽，加入电泳缓冲液（1*SDS）后将梳子缓缓拔出（注意：不要将泳道之间的胶歪斜，若有胶歪斜的情况，用注射器拨正）。

1.2 在电泳槽上下及两侧电极槽中注入电泳缓冲液，注意缓冲液和凝胶上下两端之间不能有气泡。

1.3 用微量上样器将蛋白质样品等体积加入到样品孔中，小心加样使样品在孔的底部成一薄层（上样时，不要把枪头深入胶孔过深，防止错开胶和玻璃板）。对照孔加入蛋白质分子量标准样品，为了便于观察电泳效果和转膜效果，以及判断蛋白分子量大小，最好使用预染蛋白质分子量标准。如有空置的加样孔，需加等体积的空白 1*Loading 样品缓冲液，以防相邻泳道样品的扩散。

1.4 再往上槽加入余下的 1*SDS 电泳缓冲液。此操作缓慢小心，以防冲起样品孔中的样品。

连接电源（注意正负极的连接，可在槽子的电极处用笔标注），将电压调至 140V 至电泳结束。通常电泳时溴酚蓝（一般会在 10k-15k 左右）到达胶的底端处附近即可停止电泳，或根据预染蛋白质分子量标准的电泳情况，预计目的蛋白的电泳位置。

2 转膜-湿转

2.1 电泳结束后，关闭电源并撤去连接的导线，弃去电泳缓冲液。连同上槽一起将凝胶夹层取出。卸下玻璃板，放在纸巾上，撬开玻板。切下放入纯水中。

2.2 NC 膜使用前需要在 NC 膜平衡液中浸泡 1min 左右。转膜时，在转移槽上按以下顺序放置下物：海绵、膜、凝胶、海绵（注意转膜过程保证没有气泡），盖上盖子，设置转膜条件，运行快速转膜仪。具体的转膜时间要根据目的蛋白的大小而定，目的蛋白的分子量越大，需要的转膜时间越长，目的蛋白的分子量越小，需要的转膜时间越短（通常 50KD 以下蛋白转 10min；50-200KD 转 15min；200KD 以上转 20min）。

2.3 PVDF 膜先浸泡在 100%的甲醇中至膜完全湿润，然后用双蒸水漂洗 5min，再浸泡在 PVDF 膜平衡液中 1min 左右（因为 PVDF 膜表面为疏水性，需要甲醇活化），转膜过程与 NC 膜转膜过程相同。PVDF 膜由于原理上的不同，相较 NC 膜，蛋白吸附能力会强。

2.4 转膜效果可以通过用丽春红染色液对膜进行染色（注意 PVDF 膜的丽春红染色方法，转膜完成后，取出膜在甲醇中泡 1min 左右，然后在双蒸水中洗去甲醇，最后放在丽春红里染色），以观察实际的转膜效果。染色完成后，标记泳道，剪成相应的条带，然后把膜放在 TBST 中漂洗至表面的丽春红大致洗掉（一般 10min）。

3 封闭

3.1 漂洗完毕后，倒出 TBST，加入封闭液（5%脱脂奶粉，TBST 配制：磷酸化 抗体最好使用 5%BSA，TBST 配制）50mL，在水平摇床上缓慢摇动，室温封闭 1-2 小时。（注意：一张膜最好放在一个盒子进行封闭，从转膜完毕起，以后所有的步骤均要注意膜的保湿，避免膜的干燥，防止结果产生较高的背景）。

4 一抗孵育

4.1 用 2%BSA 将一抗适当稀释（一般抗体 1:500，内参 1:5000），确保抗体加入稀释液中，特别是稀释高的时候，当进行梯度稀释的时候，最好进行低稀释度的先配，然后用低稀释度的再配高稀释度。将已封闭的膜直接置于一抗溶液中，有条带的面朝上，确保一抗溶液浸没膜，不要漂浮在上面，然后放在盒中，4°C摇床过夜。（一般来讲 4°C过夜效果是最好的，室温进行孵育 1-2 h 如有需要也可以采取）。

5 漂洗

5.1 过夜后，一般用 TBST 振荡洗涤 4 次，每次 5min。如果显色的时候，背景比较高，可以提高漂洗的时间和次数（例如每次提高到 10min，或者漂洗 5 次）。相对于 NC 膜而言，PVDF 膜可以洗脱强度更高一点（洗脱次数和时间）。

6 二抗孵育

6.1 5%脱脂奶粉（TBST 溶解）将二抗 1:10000 稀释，将膜置于抗体溶液中（加入足够的二抗溶液），室温缓慢震荡 1-1.5 h。

7 漂洗

7.1 孵育完二抗，回收二抗，将膜用 TBST 震荡洗涤 4 次，每次 5min，最后置于 TBS 中，尽快显色。

8 ECL 显色

8.1 根据二抗标记物选择合适的显色方法。实验室的二抗为 HRP 标记的二抗，显色用 ECL 发光液曝光。

8.2 打开仪器，将 A 液，B 液等量加入黑盒中混匀。将膜浸入 A、B 混合液后迅速将膜放入仪器中，关上仪器门，点击操作软件开始曝光。