Western blot

一、做膠

1. 架膠台，加ddH2O放一段時間看有沒有漏水，接著把水倒掉
2. 用15ml離心管裝試劑配膠，加完mix上下invert搖一下(勿劇烈搖晃，避免產生太多泡泡)

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 下膠 total：10 ml | | | |
|  | 8% gel | 10% gel | 12% gel |
| H2O | 4.6 | 4 | 3.3 |
| 30% acrylamide/Bis | 2.7 | 3.3 | 4 |
| 1.5 M Tris (pH 8.8) | 2.5 | 2.5 | 2.5 |
| 10% SDS | 0.1 | 0.1 | 0.1 |
| 10% APS | 0.1 | 0.1 | 0.1 |
| TEMED | 0.006 | 0.004 | 0.004 |
| 下膠 total：3 ml | | | |
| H2O | 1.68 | | |
| 30% acrylamide/Bis | 0.51 | | |
| 0.5 M Tris (pH 6.8) | 0.75 | | |
| 10% SDS | 0.03 | | |
| 10% APS | 0.03 | | |
| TEMED | 0.003 | | |

1. 下膠加約8 ml到綠色下面，然後加Isopropanol去除氣泡，接著倒掉
2. 下膠凝固(約一小時)後加上膠，上膠加約2 ml加到玻璃頂部，插齒梳

二、電泳

1. 把膠裝到電泳槽，薄玻璃朝內，只有跑一邊膠時要拿塑膠片放另一面
2. 倒入running buffer，裡面加新鮮的外面槽加reuse的running buffer，拔尺梳
3. Load maker約3~5μl，load sample 約15μl，空的well補sample buffer
4. 上膠：75V (約20min)；下膠：120V (約40min)

三、Transfer

1. 拿量筒去rinse，加transfer buffer 80 ml，加水補到800 ml (1:10)
2. 把剛剛的transfer buffer裝到大血清瓶，冰4℃預冷
3. Transfer槽放大冰盆，周圍裝滿冰
4. 拿2張圖畫紙、一張PVDF
5. 加200 ml甲醇到小塑膠盒，PVDF用鑷子夾進去
6. transfer buffer倒進大塑膠盒，把膠割下來(切膠不可以用劃的，要用切的)
7. 從下到上依序放白網-菜瓜布-圖畫紙-PVDF-gel-圖畫紙-菜瓜布-黑網

(注意PVDF和膠之間不可以有氣泡，如果有氣泡要把氣泡壓出來)

1. 放到transfer槽，黑色對黑色，剛剛的甲醇、transfer buffer倒進transfer槽
2. -80冰箱拿小冰袋放入transfer槽
3. 通電調至350mA，1 hr

四、Blocking

1. 把圖畫紙+PVDF+gel剪成需要的大小放到塑膠盒
2. 每一格加lightning blocking蓋過membrane，rotate 50 rpm，5 min
3. 把lightning blocking吸回去reuse (可以重複用大概10次)
4. TBST wash，加蓋過membrane，rotate 50 rpm，5 min

五、抗體binding

1. 配一抗，用TBST dilute
2. 加一抗，rotate overnight
3. 倒掉一抗，TBST wash 3次，每次加蓋過membrane，rotate 50 rpm，10 min
4. 加二抗，加到蓋過membrane，rotate 50 rpm，1 hr
5. wash 3次，每次加蓋過membrane，rotate 50 rpm，10 min
6. 加TBST蓋過membrane

六、照膠

1. 照膠要前一天先去14樓預約
2. 帶白色小盤子、鑷子、pipette、tip、eppendorf、試劑(HRP、stop solution)
3. 把membrane夾到小盤子
4. HRP：stop solution=1：1加入eppendorf混和，淋在membrane上