

成品抗体检测程序

操作程序

1 样品制备

1.1 细胞样品制备 :对于贴壁细胞 ,到掉培养液 ,PBS 洗 2 次 ;对于悬浮细胞 ,先 1000 转/min 离心 5 分钟收集细胞 ,用 PBS 轻轻吹打重悬 ,再次离心。按照十的七次方数量细胞加入 1ml 裂解液 ,使用前 5 分钟加入 100x 的 pmsf 和 50x 的 cocktail。冰上裂解 15min ,最后收集裂解液 ,4 度 13000 转/min 离心 5min ,取上清至预冷的离心管内 ,若有测浓度需要 ,则可取 10ul 出来 ,剩余的裂解液 ,加入 3xsds 上样缓冲液 ,95 度加热 5min。待上样或负 20 度分装保存。

1.2 组织样品制备 :新鲜的组织样品 ,剪碎 ,置于已经放在碎冰中预冷的玻璃匀浆器 ,按照 1:10~1:20 加裂解液 (例如 100mg 肝脏组织加入 1ml 裂解液) ,裂解液在使用前 5min 加入 100x 的 pmsf 和 50x 的 cocktail。多次匀浆 ,直至组织完全匀浆 ,收集匀浆液 ,置于预冷的离心管中 ,裂解 10~15min ,4 度 13000 转/min 离心 5min ,取上清至预冷的离心管内 ,若有测浓度需要 ,则可取 10ul 出来 ,剩余的裂解液 ,加入 3xsds 上样缓冲液 ,95 度加热 5min。待上样或负 20 度分装保存。

2 制胶

2.1 根据目的蛋白分子量的大小选择合适的分离胶浓度

分子量(kDa)	分离胶浓度
≤20	15%
20~50	12%
25~72	10%
72~200	8%

2.2 小型的垂直电泳槽，对于1mm的玻璃板，分离胶灌4.5ml，加入异丙醇封胶，约30min后，分离胶凝固，去掉异丙醇，灌入浓缩胶1ml，插上梳子。凝固1~2h后使用。

试剂	分离胶浓度					
	8%	10%	12%	15%	18%	20%
水 (ml)	4.6	4.0	3.3	2.3	1.3	0.6
30%丙烯酰胺 (ml)	2.7	3.3	4.0	5.0	6.0	6.7
1.5MTris - Hcl (PH8.8)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
10%SDS (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
10%AP (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
TEMED (ul)	5ul (视实验室温度而定)					
总体积 (ml)	10	10	10	10	10	10

试剂	浓缩胶浓度			
	5%			
水 (ml)	2	2.7	4	6
30%丙烯酰胺 (ml)	0.5	0.7	1	1.5
1.0MTris - Hcl(PH6.8)	0.5	0.7	1	1.5
10%SDS (ml)	40	53	80	120
10%AP (ml)	30	40	60	90
TEMED (ul)	4	5.3	8	12
总体积 (ml)	3	4	6	9

3 电泳

电泳采用恒压模式，浓缩胶 80v，约 25min 后进入分离胶，调至 120v，溴酚蓝跑至分离胶底部时，终止电泳。

4 转膜

4.1 使用 PVDF 膜，将膜裁至合适大小，放入甲醇中，5 秒，ddH₂O 洗三次，置于转膜液中平衡，待用。

4.2 电泳结束后，到掉电泳液，取出玻璃板，将凝胶取出，制作黑色塑料面-海绵-滤纸-凝胶-膜-滤纸-海绵“三明治”，固定好后，放入转移槽，凝胶位于负极（黑色面），膜位于正极，采用恒流（电压最大，电流 300mA），在冰水浴中转移。电流以及转移时间按照目的蛋白分子量来定。

5 免疫反应

5.1 封闭：转膜成功后，应在膜上可观察到清晰 marker 条带，将膜置于 5%脱脂牛奶/PBST 中，室温，摇床 45min。

5.2 一抗：使用封闭液稀释一抗，稀释比例应具体摸索。到掉封闭液，加入一抗稀释液，室温，摇床 1h（或者 4 度过夜）。

5.3 二抗：一抗孵育完毕，PBST 洗膜 5minx4 次。使用 PBST 稀释二抗，稀释比为 1 : 5000。室温，摇床 30min。二抗完毕，PBST 洗膜 5minx4 次。待曝光。

6 曝光

6.1 显影液，定影液配置

显影液	母液 A	母液 B	母液 C	蒸馏水
	103ml	4ml	4ml	300ml
定影液	母液 A	母液 B	蒸馏水	
	103ml	9.4ml	300ml	

6.2 将漂洗完成的膜置于保鲜膜上，加上 ECL 完全覆盖膜，孵育 30s，将膜包起，吸干残余 ECL，置于暗夹中，于暗室内，压片 30s 做初步曝光，胶片置于显影液中，观察条带，自来水漂洗，定影。选择最佳条件后，曝光至较佳状态后，结束曝光。