蛋白质免疫印迹（Western Blot，WB ）实验方法原理步骤及注意事项  
一：蛋白提取  
1、组织蛋白提取  
1）所需器材：制冰机、标记笔、两套1.5ml EP管（最好高温高压处理）、一个大冰盒、一个1.5ml EP管盒、手套、眼科剪（最好高温高压处理）、新鲜组织或保存于-80℃冰箱组织、保存于4℃冰箱的PBS（最好高温高压处理）、移液枪、吸头（最好高温高压处理）、两套研磨棒（最好高温高压处理）、掌上离心机、滤纸、三去污裂解液、苯甲基磺-酸氟（PMSF，一种蛋白酶抑制剂，剧毒）、离心机、烧杯、2×SDS凝胶上样缓冲液、二硫苏糖醇（DTT）、震荡器、泡沫板。  
2）操作步骤：  
a.制冰机制冰；  
b.标记笔将两套EP管做好标记；  
c.将大冰盒、EP管盒装上冰，一套标记笔做好标记的EP管放置于大冰盒中，另一套标记笔做好标记的EP管放置于EP管盒中，戴好手套，带上EP管盒、眼科剪剪取黄豆大小（约100mg）新鲜组织或保存于-80℃冰箱组织；  
d.取出保存于4℃冰箱的PBS，往EP管中滴加1ml PBS，眼科剪剪碎组织（动作快），掌上离心，弃上清，再往EP管中滴加1ml PBS，研磨棒研磨，3000转离心10分钟，弃上清，滤纸尽可能吸干管口残留液体，估算EP管中沉淀物体积，以上步骤尽可能在冰上操作；  
e.从4℃冰箱取出三去污裂解液，-20℃冰箱中取出PMSF置于大冰盒中，往EP管中滴加沉淀物3-5倍体积的三去污裂解液（一般为5倍）,再加入PMSF（二者比例为94：6）,研磨棒研磨（冰上充分裂解20-30分钟），以上步骤均需在进行；  
f.离心机预冷，将充分裂解后的组织液4 ℃、10000转离心10分钟；  
g.将烧杯用自来水洗净，倒入单蒸水，电炉上煮沸；  
h.备好2×SDS凝胶加样缓冲液（存放于常温），取出保存于-20℃冰箱的DTT,置于大冰盒中，将离心后的上清液用移液枪定量吸至另一套EP管中（勿吸取下层沉淀物），按上清液：2×SDS：DTT =1: 0.8:0.2加入2×SDS 及DTT，掌上离心，然后小心将EP管插入泡沫板，投入已煮沸的烧杯中煮6-8分钟（电炉功率不要调太大，以免管盖爆开）；  
i. 将泡沫板用镊子取出，置大冰盒中冷却10分钟，掌上离心，再放入-20℃冰箱保存备用。  
注意：裂解液也可酌情选用单去污裂解液或细胞裂解液等。  
2、贴壁细胞蛋白提取（细胞蛋白含量一般约为1x10-9mg/细胞）  
1）所需器材：制冰机、细胞刮刀、标记笔、两套1.5ml EP管（最好高温高压处理）、两个大冰盒、手套、长满细胞的培养瓶、保存于4℃冰箱的PBS、三去污裂解液、苯甲基磺-酸氟（PMSF，一种蛋白酶抑制剂，剧毒）、移液枪、吸头（最好高温高压处理）、滤纸、离心机、烧杯、4×SDS凝胶上样缓冲液、二硫苏糖醇（DTT）、泡沫板。  
2）操作步骤  
a.制冰机制冰；  
b.细胞刮刀用去离子水洗净、甩干，标记笔将2套EP管做好标记；  
c.将两个大冰盒装上冰，标记笔做好标记的两套EP管置于一个大冰盒上,带上另一个大冰盒，取出长满细胞的培养瓶平放在大冰盒上；  
d.戴好手套，取出保存于4℃冰箱的PBS、三去污裂解液、保存于-20℃冰箱的PMSF置于放有EP管的大冰盒上，往培养瓶中滴加2ml PBS漂洗一次，滤纸尽可能吸干瓶口残留液体；  
e.往培养瓶中滴加三去污裂解液（一般为47－141ul/50ml培养瓶）、再加入PMSF（二者比例为94：6），然后用细胞刮棒刮（不要漏刮四周瓶壁，刮不同处理组要更换刮子或重新洗净，滤纸擦干），倾角静置（使培养瓶内细胞裂解液集于一角），移液枪将培养瓶的裂解液吸至1.5ml EP管，冰上静置15-25分钟，以上步骤均需在冰上操作；  
f.离心机预冷，将静置15-25分钟后的EP管4 ℃、10000转离心10分钟；  
g.将烧杯用自来水洗净，倒入单蒸水，电炉上煮沸；  
h.备好4×SDS凝胶上样缓冲液（存放在常温），取出保存于-20℃冰箱的DTT置于冰上，用移液枪将离心后的上清液定量吸至另一套EP管中（勿吸取下层沉淀物），按上清液：4×SDS：DTT=3：0.8:0.2滴加4×SDS及DTT，掌上离心，然后小心将EP管插入泡沫板，投入已煮沸的烧杯中煮6-8分钟（电炉功率不要调太大，以免管盖爆开）；  
i. 将泡沫板用镊子夹出，置大冰盒中冷却10分钟，掌上离心，再放入-20℃冰箱保存备用。  
注意：裂解液也可酌情选用单去污裂解液或细胞裂解液等。  
3、悬浮细胞蛋白提取  
1）所需器材：制冰机、标记笔、两套1.5ml EP管（最好高温高压处理）、两个大冰盒、长满细胞的培养瓶、10ml离心管、手套、移液枪、吸头（最好高温高压处理）、滤纸、保存于4℃冰箱的PBS（最好高温高压处理）、三去污裂解液、苯甲基磺-酸氟（PMSF，一种蛋白酶抑制剂，剧毒）、离心机、烧杯、4×SDS凝胶上样缓冲液、二硫苏糖醇（DTT）、泡沫板。  
2）操作步骤  
a.制冰机制冰；  
b.标记笔将2套EP管做好标记；  
c.将两个大冰盒装上冰，标记笔做好标记的两套EP管置于一个大冰盒上,带上另一个大冰盒，取出长满细胞的培养瓶平放在大冰盒上；  
d. 戴好手套，将培养瓶细胞悬液吸至10ml离心管，4℃、3000转离心10分钟，弃上清，加1ml保存于4℃冰箱的PBS重悬细胞，再转移细胞悬液至1.5mlEP管中，4℃、3000转离心10分钟，弃上清，滤纸尽可能吸干管口残留液体；  
e. 取出保存于4℃冰箱的三去污裂解液、保存于-20℃冰箱的PMSF, 往培养瓶中滴加三去污裂解液（一般为47－141ul/50ml培养瓶）、再加入PMSF（二者比例为94：6），移液枪吹打混匀，冰上静置15-25分钟，以上步骤均需在冰上操作；  
f.离心机预冷，将静置15-25分钟后的EP管4 ℃、10000转离心10分钟；  
g.将烧杯用自来水洗净，倒入单蒸水，电炉上煮沸；  
h.备好4×SDS凝胶上样缓冲液（存放在常温），取出保存于-20℃冰箱的DTT置于冰上，用移液枪将离心后的上清液定量吸至另一套EP管中（勿吸取下层沉淀物），按上清液：4×SDS：DTT=3：0.8:0.2滴加4×SDS及DTT，掌上离心，然后小心将EP管插入泡沫板，投入已煮沸的烧杯中煮6-8分钟（电炉功率不要调太大，以免管盖爆开）；  
i. 将泡沫板用镊子夹出，置大冰盒中冷却10分钟，掌上离心，再放入-20℃冰箱保存备用。  
注意：裂解液也可酌情选用单去污裂解液或细胞裂解液等。  
二：电泳  
1、制备分离胶、积层胶  
1）所需器材：制冰机、制胶槽、Teflon梳子、小烧杯、手套、大冰盒、去离子水、30%聚BXXA溶液、1.5mol/L的Tris-cl（PH值8.8）、1.0mol/L的Tris-cl（PH值6.8）、10%SDS（十二烷基磺酸钠）、10%AP（过硫-酸铵）、TEMED（四甲基乙-二胺）、移液枪、吸头。  
2）操作步骤  
a.制冰机制冰；  
b.将制胶槽双层玻片装进制胶槽小夹子（双层玻片左右方及下方要注意对齐），滤纸吸干双层玻片中残留液体，再将小夹子装进制胶槽大夹子，平放（制胶槽所放平面一定要水平）；  
c.将大冰盒装上冰，戴好手套，取出保存于4℃冰箱的30%聚BXXA溶液、1.5mol/L的Tris-Hcl(PH值8.8)、1.0mol/L的Tris-cl(PH值6.8)、TEMED、保存于-20℃冰箱的10%AP，备好存放于常温的去离子水、10%SDS，根据所需配制的分离胶浓度及量，依次往小烧杯中加不同体积的去离子水、30%聚BXXA溶液、1.5mol/L的Tris-Hcl、10%SDS、10%AP、TEMED。加入TEMED后，立即用移液枪吸头混匀小烧杯胶液，倒入制胶槽双层玻璃中（留梳齿+1cm长以备加积层胶），轻轻抖动几下制胶槽使液面平齐，再用去离子水（当BXXA浓度〈8%时也可采用0.1%的SDS，当BXXA浓度〉10%时也可采用异丁-醇）封闭液面以免氧气扩散进入凝胶抑制聚合反应，静置半小时；  
c.待分离胶凝固后（分离胶与去离子水界面可看到一条分离线），根据所需制备积层胶的浓度和量，往小烧杯中依次加入不同体积的去离子水、30%聚BXXA溶液、1.0mol/L的Tris-cl(PH值6.8)、10%SDS、10%AP，然后先将分离胶上层的去离子水倒去，再用去离子水冲洗去除未聚合的凝胶，滤纸吸净残留液体。往小烧杯加入TEMED，立即用移液枪吸头混匀小烧杯胶液，倒入制胶槽双层玻璃中分离胶上方，小心插入梳子，注意不能留有汽泡（操作时先使梳孔下缘接触液面，再左右两边平衡缓慢插入梳子），静置半小时待积层胶凝固（凝固后梳齿边缘可看到分离线）。  
2、电泳  
1）所需器材：电泳槽、手套、胶、电泳液（可回收利用，四次一换为好）、蛋白样品、1×SDS凝胶加样缓冲液、大冰盒、微量加样器、电泳仪。  
2）操作步骤  
a.将电泳槽上槽、下槽分别用去离子水洗净，甩干；  
b.戴好手套，取下制胶槽小夹子，缓慢移去梳子（两边要平衡移出），如有必要，使用接于注射器的平头皮下注射针头把积层胶上加样槽之间的齿弄直，再用去离子水冲洗以去除未聚合的BXXA，取下制胶槽双层玻片小心放入电泳槽上槽（较矮玻片向电泳槽上槽内侧），再一起放入电泳槽下槽，往电泳槽上槽缓慢倒入1×Tris-甘氨酸电泳缓冲液（存放于常温，可回收利用，但最多4次），直至上槽电泳液略高于下槽电泳液，如有必要，使用接上注射器的弯形皮下注射针头把凝胶底部两玻璃板之间的汽泡排出，将电泳槽移至4℃电泳仪跑箱内；  
c. 备好微量加样器、1×SDS凝胶加样缓冲液（存放于常温），取出保存于-20℃冰箱的蛋白样品，置于大冰盒上。将大冰盒移至电泳仪旁；  
d.将微量加样器在电泳槽下槽冲洗3次后，吸取不同蛋白样本，吸取体积一般为10-25ul，可根据蛋白浓度调整；加样时注射针头要缓慢上移，不要给侧壁太大张力；加不同样本时每加样完一个样本应在下槽中洗涤3次加样注射器（第一次洗涤液打掉）再加样另一样本，最后在所有不用的加样孔中点上等体积的1×SDS凝胶加样缓冲液；  
e.插上电泳仪盖板（注意对好正负极），接通电源，100V恒压电泳，直至溴酚蓝指示剂跑至底部（注意标记）（总用时依分子量大小和胶浓度而异，约2小时左右）。  
3、考马斯亮蓝染色（可选项）：  
1、所需器材：两个培养皿（一大一小）、刮勺、考马斯亮蓝染色液（可回收利用）、脱色液（可回收利用）、胶、常温摇床或4℃摇床。  
2、操作步骤：  
1）将两个培养皿（一大一小）、刮勺用去离子水洗净，往小培养皿加入考马斯亮蓝染色液（约1/3体积）、大培养皿盖住；  
2）取出电泳槽内槽，取下制胶槽双层玻璃，去离子水冲洗，小心用刮勺刮开双层玻璃（刮勺放在中间，左右平缓向前用力），再用刮勺定量切去上端积层胶，下端上样缓冲液指示剂，左右两端多余泳道（比目的泳道多一泳道），小心用刮勺将胶放入盛有考马斯亮蓝染色液的小培养皿中，用大培养皿盖住常温摇床4小时以上或4℃摇床8小时以上；  
3）将考马斯亮蓝染色液回收，倒入脱色液，常温摇床脱色4小时以上或4℃过夜。  
三：转膜（半干转移法）  
1、所需器材：半干转膜仪、六个培养皿（三大三小）、手术剪、镊子、刮勺、小试管、滤纸、转移液、甲醇溶液、胶、直尺、手套、PVDF膜。  
2、操作步骤  
1）取出半干转膜仪阳极，平放操作台上；  
2）往两个小培养皿加入转移液（用大培养皿盖住）、另一个小培养皿加入甲醇溶液（用大培养皿盖住）；  
3）取出电泳槽内槽，取下制胶槽双层玻璃，去离子水冲洗，小心用刮勺刮开双层玻璃（刮勺放在中间，左右平缓向前用力），再用刮勺定量切去上端积层胶，下端上样缓冲液，左右两端多余泳道（比目的泳道多一泳道），右上角作一切口标记，记录胶的长度与宽度，去离子水冲洗后小心用刮勺将胶放入盛有转移液的一个小培养皿中（用大培养皿盖住）；  
4）戴上手套，定量剪一张长度和宽度均略大于胶的PVDF膜，用镊子将膜放入盛有甲醇溶液的小培养皿中，盖上大培养皿浸泡5分钟；  
5）取6张滤纸，放入盛有转移液的另一个培养皿中浸湿，拿至半干转移器阳极上，小试管轻轻擀压去汽泡，膜在盛有甲醇溶液的小培养皿浸泡5分钟后，用镊子小心将膜夹至滤纸上（注意膜的四边要在滤纸内），用刮勺小心将胶从培养皿中取出，放在膜上，精确对齐（注意胶的切口标记和胶的四边要在膜内），加点转移液润湿，再定量剪6张长度和宽度均略小于胶的滤纸，放入盛有转移液的培养皿中浸湿，拿至半干转移器胶上，加点转移液小试管轻轻擀压去汽泡；  
6）盖上半干转移器负极，检查两板之间是否有直接接触（以免造成短路），接通电源，12－18V恒压1小时（电流在60mA以上，80mA以下为好，具体根据不同目的蛋白分子量而定，如电流达不到要求，可调节电压）或60－80mA恒流1小时（电压在6V以上，30V以下，具体根据不同目的蛋白分子量而定，如电压达不到要求，可调节电流强度）。  
注意：如果是硝酸纤维素滤膜，则用转移液而不用甲醇浸泡，余相同。  
四： 丽春红染色  
1、所需器材：一个培养皿、手术剪、镊子、丽春红染色液（可回收）、TBST、膜、常温摇床或4℃摇床。  
2、操作步骤  
1）将培养皿用去离子水洗净；  
2）打开半干转膜仪，用镊子夹开滤纸，取出膜，手术剪在膜的右上角作一剪口标记（标记贴胶面为正面，即右手边远侧），再将膜夹至培养皿中（正面向上），滴入丽春红染色液，轻轻晃动（时间不宜太长）；  
3）回收染色液，去离子水漂洗数次，如红色无法完全退去，加入TBST，常温摇床或4℃摇床平缓摇动脱色。  
五：封闭  
1、所需器材：玻棒、量筒、玻璃瓶、电子分析天平、脱脂奶粉、一个培养皿、TBST、直尺、封口袋、移液枪、吸头、PDVF膜（硝酸纤维素滤膜）、封口机、常温摇床或4℃摇床。  
2、操作步骤  
1）5％脱脂奶粉配制  
a.将玻棒、量筒、玻璃瓶用去离子水洗净；  
b.根据所需配制总量（一般为50ml），称取适量脱脂奶粉(一般为2.5g/50ml)，倒入玻璃瓶，加入约50ml TBST，玻棒搅拌溶解，即配制成5%脱脂奶粉(可在4℃冰箱保存3天)；  
2）将培养皿用去离子水洗净，镊子将膜夹至培养皿中（正面朝上），平放在常温摇床上平缓摇动2小时以上或者4℃摇床8小时以上，如果免疫探针的非特异结合背景仍然太高，可加入Tween-20至终浓度为0.02%，在大多数情况下，加入这种去污剂不至影响抗体与靶抗原的特异性结合。  
  
六：孵抗体  
1、所需器材：一个培养皿、手术剪、直尺、镊子、5%脱脂奶粉、TBST、移液枪、吸头、一抗、二抗、PDVF膜（硝酸纤维素滤膜）、封口机、常温摇床或4℃摇床。  
2、操作步骤：  
1）将培养皿用去离子水洗净；  
2）做一封口袋（与膜相比长3cm，宽1.5cm），加入5%脱脂奶粉、TBST（加入总量根据抗体浓度调整，但5%脱脂奶粉：TBST一般等于1：4），再加入一抗（保存于4℃冰箱），抗体浓度可根据产品说明结合具体情况调整，（如1：1000、1：2000等），混匀，最后用镊子将膜夹至一抗封口袋内，小心去除汽泡（缓慢倾斜驱除气泡），封口，放入培养皿中（最好垫张电话卡），平放在常温摇床上平缓摇动2小时以上或4℃摇床8小时以上（期间翻转数次）；  
3）将培养皿用去离子水洗净，倒入TBST（约1/3体积），手术剪剪开一抗封口袋，用镊子将膜夹至盛有TBST的培养皿中（正面向上），常温摇床平缓摇动5分钟，5分钟后，倒去TBST，再倒入新的TBST（约1/3体积），常温摇床平缓摇动5分钟，如此反复进行3次；  
4）做一封口袋（与膜相比长3.0cm，宽1.5cm），加入5%脱脂奶粉、TBST（加入总量根据抗体浓度调整，但5%脱脂奶粉：TBST一般等于1：4），再加入二抗（保存于4℃冰箱），抗体浓度可根据产品说明结合具体情况调整，如1：2000、1：3000、1：5000等，混匀，最后用镊子将膜夹至二抗封口袋，小心去除汽泡（缓慢倾斜驱除气泡），封口，放入培养皿中（最好垫张电话卡），平放在常温摇床上平缓摇动2小时以上或4℃摇床8小时以上（期间翻转数次）；  
5）将培养皿用去离子水洗净，倒入TBST（约1/3体积），手术剪剪开二抗封口袋，镊子将膜夹至培养皿中（正面向上），常温摇床平缓摇动5分钟，5分钟后，倒去TBST液，倒入新的TBST（约1/3体积），常温摇床平缓摇动5分钟，如此反复进行3次。  
七：压片（有条件的地方可以用化学发光成像仪显示条带）  
1、所需器材：制冰机、两个培养皿、大冰盒、荧光剂A、荧光剂B、0.5mlEP管、移液枪、吸头、显影剂、定影剂、手套、压片夹、双层塑料膜、镊子、滤纸、  手术剪、胶片。  
2、操作步骤  
1）制冰机制冰；  
2）两个培养皿用去离子水洗净；  
3）将大冰盒装上冰，取出荧光剂A、B和0.5mlEP管、移液枪、吸头放置于冰盒上，将显影剂、定影剂依序倒入两个培养皿；  
4）戴上手套，打开压片夹，铺上双层塑料，分别滴几滴等量A、B液至离心管中（具体量根据膜大小而定），用移液枪吸头搅拌混匀；  
5）用镊子将膜夹起轻轻抖动几次去除残留TBST，而后放置双层塑料中（正面向上，正面即贴胶面，也即右手边远侧面），沿中线滴几滴A、B液，轻轻晃动以便A、B液铺满整张膜，滤纸吸去膜四边溢出液体，盖上上层塑料袋，手背轻轻擀压抹平；  
6）关灯，观察荧光，手术剪剪好胶片，放置上层塑料膜上方进行压片，压片时间视情况而定（荧光越强，压片时间越短；荧光越弱，压片时间越长），短至1分钟，长至1小时，一般在3-5分钟左右；  
7）用镊子取出胶片，放置显影液中显影，再放置定影液中定影，而后进行流水冲洗，扫描等处理。  
八： 注意事项  
1、摸索某一特定蛋白的溶解条件时，可考虑用剧烈的裂解缓冲液如三去污裂解液来提取。  
2、如果压片清晰度不好，可尝试：1）连续压几张胶片；2）减少蛋白上样量；3）降低一抗浓度（降杂带）；4）降低二抗浓度（降背景）。  
附录：  
1、PBS的配制：  
900ml去离子水溶解以下成分  
1）Nacl 8g  
2）Kcl 0.2g  
3）Na2HPO4.12H2O 3.5g  
4）KH2PO4 0.2g  
调PH值至7.4（也可不调）  
定容至1000ml.  
  
2、三去污裂解液的配制：  
1）50mmol/L Tris碱（PH值8.0）（0.6057g/100毫升）  
2）150mmol/L Nacl（0.8766g/100ml）  
3）0.02%叠氮钠（0.02g/100ml）  
4）0.1%SDS（十二烷基磺酸钠）（0.1g/100ml）  
5）1.0ug/ml Aprotinin（可无）  
6）1%Nonidet（NP-40）（1ml/100ml）  
7）0.5%去氧胆酸钠（0.5g/100ml）  
8）100ug/ml PMSF（苯甲基磺-酸氟）（临时加入）  
注意事项：用80ml去离子水溶解0.6057g Tris碱，调 PH值至8.0，再用该溶液溶解2—7项，定容至94ml，PMSF配成16.67mg/ml的贮存液及1.667mg/ml的工作液, 每94ul的裂解液加6ul PMSF工作液。  
  
3、SDS加样缓冲液的配制：  
1×SDS凝胶加样缓冲液的配制：  
1）50mmol/L Tris碱（PH值6.8）（0.1212g/20ml）  
2）2%SDS（电泳级）（十二烷基磺酸钠）（0.4g/20ml）  
3）0.1%溴酚兰（0.02g/20ml）  
4）10%甘油（2ml/20ml）  
注意事项：用10ml去离子水溶解 0.1212g Tris碱（调PH值至6.8），再用该溶液溶解4、2、3，定容至20ml.  
  
2×SDS凝胶加样缓冲液的配制，终浓度为：  
1）100mmol/L Tris碱（PH值6.8）（0.2424g/20ml）  
2) 4%SDS（电泳级）（十二烷基磺酸钠）（0.8g/20ml）  
3）0.2%溴酚兰（0.04g/20ml）  
4）20%甘油（4ml/20ml）  
5）200mmol/L DTT（二硫苏糖醇）(临用时加入)  
注意事项：用6ml去离子水溶解0.2424g Tris碱（调PH值至6.8），再用该溶液溶解4、2、3，定容至16ml；DTT配成1mol/L的贮存液[lml（略少） 0.01mol/L乙酸钠溶液（PH值5.2）（分子量136.08）溶解0.15424g DTT，最好过滤除菌]，临用时按上清液：2×SDS：DTT=1：0.8：0.2的比例加入。  
  
4×SDS凝胶加样缓冲液的配制，终浓度为：  
1）200mmol/L Tris碱（PH值6.8）（0.4848g/20ml）  
2) 8%SDS（电泳级）（十二烷基磺酸钠）（1.6g/20ml）  
3）0.4%溴酚兰（0.08g/20ml）  
4）40%甘油（8ml/20ml）  
5）400mmol/L DTT（二硫苏糖醇）(临用时加入)  
注意事项：用2ml去离子水溶解0.4848g Tris碱（调PH值至6.8），再用该溶液溶解4、2、3，定容至16ml；DTT配成2mol/L的贮存液[lml（略少） 0.01mol/L乙酸钠溶液（PH值5.2）溶解0.30848g DTT，最好过滤除菌]，临用时按上清液：4×SDS：DTT=3：0.8：0.2的比例加入。  
  
5×SDS凝胶加样缓冲液的配制，终浓度为：  
1）250mmol/L Tris碱（PH值6.8）（配成0.606g/20ml）  
2) 10% SDS（电泳级）（十二烷基磺酸钠）（2g/20ml）  
3）0.5%溴酚兰（0.1g/20ml）  
4）50%甘油（10ml/20ml）  
5）500mmol/L DTT（二硫苏糖醇）(临用时加入)  
注意事项：用2ml去离子水溶解0.606g Tris碱（调PH值至6.8），再用该溶液溶解4、2、3，定容至16ml；DTT配成2.5mol/L的贮存液[lml （略少）0.01mol/L乙酸钠溶液（PH值5.2）溶解0.3856g DTT，最好过滤除菌]，临用时按上清液：5×SDS：DTT=4：0.8：0.2的比例加入。  
  
4、30%聚BXXA溶液的配置：  
1）BXXA29g  
2）亚甲双BXXA1g  
3）去离子水定溶至100ml  
  
5、1.5mol/L Tris-cl PH 8.8的配制：  
1）Tris-cl base 18.165g（分子量为121.1）  
2）去离子水定溶至90ml  
3）调PH至8.8  
4）去离子水定溶至100ml  
  
6、1mol/L Tris-cl PH 6.8的配制：  
1）Tris-cl base 12.11g（分子量为121.1）  
2）去离子水定溶至90ml  
3）调PH至6.8  
4）去离子水定溶至100ml  
  
7、AP（过硫-酸铵）的配制：  
0.1gAP+1ml去离子水  
  
8、TEMED的配制：  
无须特殊配制，直接吸取原液。  
  
9、10%分离胶的配制（其余浓度见分子克隆）：

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 10% 分离胶 | 去离子水 | 30%聚BXXA溶液 | 1.5mmol/L Tris-cl(PH值8.8) | 10%SDS（十二烷基磺酸钠） | 10%过硫-酸铵（AP） | TEMED（四甲基乙-二胺） |
| 3.5ml | 1.353 | 1.167 | 0.91 | 0.035 | 0.035 | 0.0014 |

10、5%积层胶的配制（其余浓度见分子克隆）：

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 5% 积层胶 | 去离子水 | 30%聚BXXA溶液 | 1.0mmol/L Tris-cl(PH值6.8) | 10%SDS（十二烷基磺酸钠） | 10%过硫-酸铵（AP） | TEMED（四甲基乙-二胺） |
| 1.2ml | 0.816 | 0.204 | 0.156 | 0.12 | 0.12 | 0.0012 |

11、Tris-甘氨酸电泳缓冲液的配制：  
5x贮存液：  
1）1250mmol/L甘氨酸（电泳极）(94g/L)  
2）125mmol/L Tris碱(15.1g/L)  
3）0.5%SDS（十二烷基磺酸钠）（5g/L）  
4）去离子水定溶至1000ml  
工作液：200ml5x贮存液+800ml去离子水  
1）250mmol/L甘氨酸（电泳极）  
2）25mmol/L Tris碱  
3）0.1%SDS（十二烷基磺酸钠）  
  
12、转移缓冲液的配制：  
2x半干法贮存液：  
1）384mmol/L甘氨酸（28.8g/L）  
2）48mmol/L Tris-base（5.8g/L）  
3）去离子水定溶至800ml  
半干法工作液：400ml贮存液+200ml甲醇溶液+去离子水  
1）192mmol/L甘氨酸（14.4g/L）  
2）24mmol/L Tris-base（2.9g/L）  
3）20%甲醇溶液（200ml/L）  
  
2X湿转法贮存液：  
1）78mmol/L甘氨酸（5.8g/L）  
2）96mmol/L Tris-base（11.6g/L）  
3）0.074%SDS(电泳极)（十二烷基磺酸钠）（0.74g/L）  
4）去离子水定溶至800ml  
湿转法工作液：400ml贮存液+200ml甲醇溶液+去离子水  
1）39mmol/L甘氨酸（2.9g/L）  
2）48mmol/L Tris-base（5.8g/L）  
3）0.037%SDS(电泳极)（十二烷基磺酸钠）（0.37g/L）  
4）20%甲醇溶液（200ml/L）  
  
13、考马斯亮兰染色液的配制：  
50ml甲醇+40ml去离子水+10ml冰醋-酸（冰乙酸）+2.5g考马斯亮兰R250或45ml甲醇+45ml去离子水+10ml冰醋-酸（冰乙酸）+2.5g考马斯亮兰R250  
  
14、考马斯亮兰脱色液的配制：  
50ml甲醇+40ml去离子水+10ml冰醋-酸（冰乙酸）或  
45ml甲醇+45ml去离子水+10ml冰醋-酸（冰乙酸）  
  
15、丽春红染色液的配制：  
5x贮存液：  
1）丽春红S 0.1g  
2）三氯乙-酸1.5g  
3）磺基水杨酸1.5g  
4）去离子水定溶至10ml  
工作液：  
2ml丽春红染色5x贮存液加8ml去离子水。  
  
16、TBST的配制：  
1）Tris碱 4.84g  
2）Nacl 16g  
3）去离子水定溶至1900ml  
4) PH值调至7.6(加浓盐酸3.0ml左右)  
5）1‰Tween-20 2ml  
6）去离子水定溶至2000ml  
  
17、5%脱脂奶粉的配制：  
1）2.5g脱脂奶粉  
2）TBST定溶至50ml  
  
18、荧光剂（武汉博士德）的配置：  
1）吸180ul去离子水至EP管中  
2）吸10ul A液至EP管中  
3）吸10ul B液至EP管中  
  
19、显影剂的配制：  
1）250ml去离子水预热至50℃  
2）显影粉（先加小包，搅拌溶解后再加大包，温度下降至18℃以下时即可使用）  
  
20、定影剂的配制：  
1）250ml去离子水预热至50℃  
2）定影粉（搅拌溶解，温度下降至18℃以下时即可使用）