

# TC4-SOP 0-2a1 Western blotting (DAB)

名稱: \_\_\_\_\_

## MATERIALS:

- **Gelatin-NET buffer with milk**

Gelatin (Merck) 5 g ; NaCl (Merck) 17.5 g ; EDTA.2Na (Merck) 3.6 g ; Tween 20 (Merck) 1 mL ; Tris (BDH) 12.1 g  
加熱至 gelatin 溶解，待冷卻至室溫後，調 pH 至 8.0，再定量至 2 L (使用前加入 5%脫脂奶粉)

- **PBS buffer (phosphate buffer saline, 10x)**

NaCl (Merck) 75.9 g ; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Wako) 15.6 g  
加水 800 mL 溶解後，用 NaOH 調成 pH 7，再定量至 1 L。使用前稀釋 10 倍

- **PBST buffer**

PBS buffer 加入 0.05% (v/v) Tween-20

- **Urea-PBST**

Urea (Sigma) 36 g ; 加入 PBST 加熱溶解後，以 PBST 定量至 100 mL

- **一次抗體**

- **二次抗體 (HRP-goat-anti-mouse)**

- **DAB 基質液**

3,3-Diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma D-5637) 5 mg ; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck 7210, 30%) 10  $\mu$ L  
以 PBS (1x) 溶解後，定量至 100 mL，使用前新鮮配製

## METHODS:

- 轉印後之轉印膜，裁切成適當大小，酒精潤濕後放入 6 或 12 well 反應槽。
  - 反應槽加試劑量: 6 well-1200  $\mu$ L/well ; 12 well-600  $\mu$ L/well。清洗加倍。
- 以 Urea-PBST 反應 30 min，倒掉後以 PBST 洗五次，每次 5 min。
- 填塞 (Blocking): 加入 Gelatin-NET 完全蓋過轉印膜，反應 30 min 後倒掉。
- 抗原抗體反應：一次抗體以 Gelatin-NET 稀釋至適當濃度 (1000~10000X)，完全蓋過轉印膜，室溫下搖晃 1 h，倒掉後以 PBST 洗五次，每次 5 min。  
( \_\_\_ X)
- 反應時間視一次抗體效價，可室溫反應過夜。
- 二次抗體反應：二次抗體以 Gelatin-NET 稀釋至適當倍數 (2000~5000X)，完全蓋過轉印膜，室溫下搖晃 1 h，倒掉後以 PBST 洗五次，每次 5 min。  
( \_\_\_ X)
- 以 PBS 洗二次，每次 5 min。
- 呈色反應：加入 DAB 基質液呈色，褐色色帶開始出現。呈色約在 10 min 內完成，應當在背景開始加深前倒去呈色液，並以蒸餾水清洗數次，取出晾乾後避光保存。

## Note:

---

---

---

日期	操作者	QC