

Western blot

2021-05-31 Quan HL

➤ Materials

- Phosphate buffer solution: 5x SDS PAGE loading buffer (bioseang S2002) 1ml + PBS 4ml에 희석, + 100x Xper phosphatase inhibitor (Gendepot, K-P3200-001) 50 μ l + 100x Xpert Protease Inhibitor Cocktail Solution (Gendepot, p3100-005) 50 μ l ->mix, 분주하여 냉동보관
- Gel 시약 준비:
 - I. Acrylamide/Bis-acrylamide,30%solution (Sigma, A3574)
 - II. 10% SDS solution: SDS (sodium dodecyl sulfate, Usb, 18220) 10g in DW 100ml에 녹인 후 상온에서 보관
 - III. 10% APS solution: APS 1g in DW 10ml, 냉동보관
 - IV. 1.5M Tris buffer (pH 8.8): 18.171g Trizma base (Sigma, T1503) in 100mL DW, pH 8.8로 만든 후 50mL 씩 분주하여 사용
 - V. 1M Tris buffer (pH 6.8): 12.114g Trizma base in 100mL DW, pH 6.8로 만든 후 50mL 씩 분주하여 사용
 - VI. TEMED, ultra pure (Usb, 110-18-9)
- Gel 만들기:
 - I. Gel % 선택은 보고자 하는 단백질 size에 따라 선택

Migration Table by Gel Percentage

Migration Distance	8% Acrylamide	10% Acrylamide	12% Acrylamide	8%–16% Acrylamide	4%–20% Acrylamide
	kDa	kDa	kDa	kDa	kDa
0%	205	205	205	205	205
		116	116	116	116
25%	116		67	67	67
		67			45
50%	67		45	45	31
		45		31	21
75%	45		29	21	14
			21	14	6.5
100%		29			3.5
					2.5

- II. gel cassette를 실험대에 고정
- III. Separating gel mixture를 만들어 Vortex한 후, 1ml pipette을 이용하여 gel을 2/3 넣어줌
- IV. Separating gel의 표면을 평평하게 만들기 위해 1ml의 isopropanol을 넣어줌
- V. 약 20분간 separating gel을 굳힘

VI. Separating gel이 다 굳었으면 isopropanol을 버리고 stacking gel mixture을 만들어 vortex한 후, 1ml pipette을 이용하여 gel을 1/3 넣어줌

VII. Comb를 끼고 약 10분간 stacking gel을 굳힘

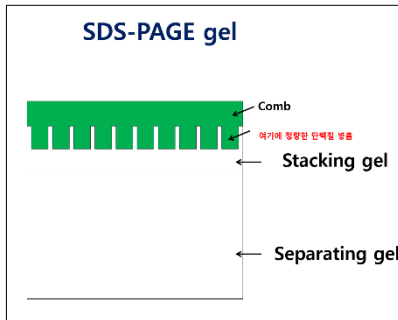


TABLE A9-9 Solutions for Preparing Resolving Gels for Tris-glycine SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

VOLUME (ml) OF COMPONENTS REQUIRED TO CAST GELS OF INDICATED VOLUMES AND CONCENTRATIONS

COMPONENTS / GEL VOLUME =>	5 ml	10 ml	15 ml	20 ml	25 ml	30 ml	40 ml	50 ml
6% gel								
H ₂ O	2.6	5.3	7.9	10.6	13.2	15.9	21.2	26.5
30% acrylamide mix <1>	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	8.0	10.0
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% ammonium persulfate <1>	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED <1>	0.004	0.008	0.012	0.016	0.02	0.024	0.032	0.04
8% gel								
H ₂ O	2.3	4.6	6.9	9.3	11.5	13.9	18.5	23.2
30% acrylamide mix <1>	1.3	2.7	4.0	5.3	6.7	8.0	10.7	13.3
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% ammonium persulfate <1>	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED <1>	0.003	0.006	0.009	0.012	0.015	0.018	0.024	0.03
10% gel								
H ₂ O	1.9	4.0	5.9	7.9	9.9	11.9	15.9	19.8
30% acrylamide mix <1>	1.7	3.3	5.0	6.7	8.3	10.0	13.3	16.7
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% ammonium persulfate <1>	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED <1>	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
12% gel								
H ₂ O	1.6	3.3	4.9	6.6	8.2	9.9	13.2	16.5
30% acrylamide mix <1>	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0	12.0	16.0	20.0
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% ammonium persulfate <1>	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED <1>	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
15% gel								
H ₂ O	1.1	2.3	3.4	4.6	5.7	6.9	9.2	11.5
30% acrylamide mix <1>	2.5	5.0	7.5	10.0	12.5	15.0	20.0	25.0
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% ammonium persulfate <1>	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED <1>	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02

Modified from Harlow and Lane (1988).

TABLE A8-10 Solutions for Preparing 5% Stacking Gels for Tris-glycine SDS-polyacrylamide Gel Electrophoresis

VOLUME (ml) OF COMPONENTS REQUIRED TO CAST GELS OF INDICATED VOLUMES

COMPONENTS / GEL VOLUME =>	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	6 ml	8 ml	10 ml
H ₂ O	0.08	0.14	0.21	0.27	0.34	0.41	0.55	0.7
30% acrylamide mix <1>	0.17	0.33	0.5	0.67	0.83	1.0	1.3	1.7
1.0 M Tris (pH 6.8)	0.13	0.25	0.38	0.5	0.63	0.75	1.0	1.25
10% SDS	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
10% ammonium persulfate <1>	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
TEMED <1>	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.008	0.01

Modified from Harlow and Lane (1988).

- 10x Transfer buffer: Trizma base 29g, glycine (Amresco, 0167-5KG) 144g in DW 1L, pH 8.3
- 1x Transfer buffer: 10x transfer buffer 100mL + methanol (Merck, 106009.251) 200mL + DW 700mL
- Skim milk: PBS+ 5% skim milk, pH 7.2-7.4
- PBST: PBS (X10) 100ml + DW 900ml + Tween 20 500ul, pH 6.8~7.2
- Stripping buffer: glycine 14g, SDS 2g, tween-20 20ml in DW 1L, pH 2.2

➤ Process

Step 1: sample 준비

- 세포 수가 일정할 경우 단백질 정량을 하지 않고 준비하여 사용 함. 24well plate 경우 PBS washing 후 phosphate buffer solution: 100μl/well 넣고 scrapper 긁어 1.5ml e-tube에 옮김. 이때 얼음에 넣어 냉장상태를 유지 (단백질 정량을 할 경우, 5x SDS PAGE loading buffer, phosphatase inhibitor, protease Inhibitor가 모두 1x되게 계산하여 사용하여야 함)

- water bath sonication 45초
- 100°C heat block에서 5분간 boiling, 준비된 샘플은 바로 사용하거나 냉동 보관

Step 2 : gel loading

- 미리 만들어 둔 gel이 굳은 것이 확인되면, 전기영동 장치에 running buffer를 채워준 후 변성된 단백질 sample과 marker를 함께 gel에 loading.
- Stacking gel을 지나는 동안 50V로 내려주어 한 줄로 서면, 100V로 separating gel에서 내려줌
- 단백질이 gel 끝부분까지 내려오면 바로 다음 단계에 진행 할 transfer를 위한 준비

Step 3 : 단백질 transfer, antibody 붙이기

- Membrane을 gel 사이즈 만큼 자른 후 100% methanol에 넣고 5분 동안 shaking 후 transfer buffer로 바꾸어 준비
- Transfer cassette에 transfer buffer로 충분히 적신 준비물을 순서대로 sponge-paper-gel-membrane-paper-sponge 순으로 깔고 닫음 (wet 혹은 semi-transfer cassette에 따라 transfer buffer 사용 유무가 다름)
- Wet transfer 경우 100V에서 1hr 동안 transfer
- Blocking: 5% skim milk로 1hr 동안 blocking
- PBST buffer로 가볍게 wash후, 1st antibody를 4°C, overnight 천천히 shaking하여 붙임
- PBST buffer로 10min씩 3번 wash후, 2nd antibody를 실온에서 2시간 동안 천천히 shaking하여 붙임
- PBST buffer로 10min씩 3번 wash후, exposure