

传统方法与 eZwest 室温孵育 beta-actin 对比的报告

职位	实验者	日期
实验员	郁健	01/03/2020

目录

1.实验背景	2
2.实验目的	2
3.实验方案	2
3.1 实验原理	2
3.2 实验设计	2
4.实验准备	2
4.1 实验材料	2
4.2 实验仪器	2
4.3 实验试剂	2
5.实验步骤	3
5.1 样品及试剂制备	3
5.2 蛋白电泳&点样	3
5.3 转膜	3
5.4 封闭&抗体孵育	3
5.5 曝光成像	4
6.实验结果与分析	5
7.更多实验案例集合	5

1. 实验背景

eZwest Lite是金斯瑞自主研发的一款全自动化的Western Blotting操作系统，它采用液体流原理，能够全程自动化地完成封闭、孵育、清洗和一二抗回收等一系列工作，eZwest Lite拥有专利的清洗技术，极大地减少了抗体在膜上的附着，降低背景，提高信噪比和相对灵敏度，在相同试剂和孵育条件下,eZwest效果相当或优于传统方法。

2. 实验目的

测试在相同的实验条件下，对比传统方法与eZwest孵育beta-actin抗体效果

3. 实验方案

3.1 实验原理

N/A

3.2 实验设计

- 1、使用 Genscript Surepage 预制胶进行电泳，每片预制胶上样相同量的蛋白
- 2、使用 Genscript Genbox 转膜槽进行转膜，转膜条件相同
- 3、分别使用传统方法和 eZwest 进行蛋白的封闭孵育和清洗（封闭孵育清洗条件一致）
- 4、将孵育好的膜放在 Biorad 成像仪中进行曝光成像

4. 实验准备

4.1 实验材料

名称	来源	货号	批号
预制胶	Genscript	M00656	C35121911
293T cell lysis	自配	/	20190103
RIPA 裂解液（强）	碧云天	P0013B	042819190913
PVDF 膜	Biorad	#1620177	D9160172A

4.2 实验仪器

仪器	品牌/厂商	型号	固资编号
电泳槽	Genscript	L00780	/
电泳仪	北京六一	DYY-7C	GR13010286
转膜槽	Genscript	L00780	/
显影仪	Bio-Rad	Chemi-Doc	GR17010142
电子天平	太仓华美生化仪器	/	GR1810274
恒温摇床	太仓华美生化仪器	/	GR0091821

4.3 实验试剂

试剂名称	厂家	货号	有效日期

4*LDS loading buffer	Genscript	M00676	20201230
Tris-MOPS-SDS Running Buffer Powder	Genscript	M00138	20201230
传统转膜液	Genscript	M00139	20201230
1*PBS/PBST	自配	/	20201230
脱脂奶粉	完达山	/	20201230
WB-MASTER Protein Standard	Genscript	M00521	20201101
MonoRab™ Beta Actin Antibody, mAb, Rabbit (一抗)	Genscript	A01865	20201101
Goat anti-rabbit IgG (二抗)	Jacksonlab	/	20200530
显影液	Genscript	/	20200801

5. 实验步骤

5.1：样品及试剂制备

5.1.1：293T细胞裂解液制备：融解RIPA裂解液，混匀。取适当量的裂解液，在使用前数分钟内加入PMSF，使PMSF的最终浓度为1mM。按照每100万动物细胞加入100ul RIPA裂解液，加入裂解液之后放置在冰上裂解5-10min，充分裂解之后使用10000rpm-15000rpm的转速4度离心10-15min。取上清即可进行后续的Western Blot实验。

5.1.2：293T细胞样品制备：取细胞裂解液上清200ul加入200ul 4*LDS loading buffer（制备之前先加入100mM DTT充分混匀），制得总蛋白浓度为4mg/ml 细胞裂解液，取其中100ul稀释至2mg/ml，依此操作梯度稀释制得1mg/ml, 0.5mg/ml, 0.25mg/ml样品。之后将样品分别放入1.5ml离心管中，金属浴加热100摄氏度，煮样5-10min，10000转离心10min,取上清待上样。

5.1.3：电泳液&传统转膜液制备：取一袋M00138放在1L烧杯中，加入900ml左右纯水充分搅拌，待所有粉末都溶解之后加纯水定容至1L即为电泳液；取一袋M00139放在1L烧杯中，加入800ml左右纯水充分搅拌，待所有粉末都溶解之后加纯水定容至900ml，之后再加入100ml甲醇即为传统转膜液。

5.2：蛋白电泳&点样：取4片M00656预制胶按照下表进行点样和电泳，每个泳道上样体积为10ul，使用Genscript Genbox电泳，电压为200V，时间为30min

泳道	1&7	2&8	3&9	4&10	5&11	6&12
样品	M00521+4*LDS buffer	293T裂解液	293T裂解液	293T裂解液	293T裂解液	293T裂解液
上样量	1ul+9ul	40ug	20ug	10ug	5ug	2.5ug

5.3：转膜：将2片电泳结束的预制胶进行转膜，使用Genscript Genbox进行转膜，使用0.22um PVDF膜(裁剪2片尺寸为8cm*9cm，分别于右下角标记1, 2)进行转膜（转膜从正极向负极分别放置：海绵-3层滤纸-PVDF膜-胶-3层滤纸-海绵），将转膜槽放于冰盒中，转膜电压设置为100V，转膜时间为60min。

5.4：封闭&抗体孵育：将转膜完成之后的4张膜取出用于封闭和抗体孵育

5.4.1：取一张膜用于传统方法的封闭和抗体孵育：

封闭：配制5%牛奶（5g奶粉/100mlPBS）10ml，放于wb 孵育盒，使膜浸没，wb孵育盒放置于摇床，转速70，室温，封闭60min；

PBST洗膜：共3次，每次5min，每次使用PBST 10-15ml；

一抗孵育：使用5%牛奶按照1：2000稀释抗 β -actin 抗体（1ug/ul），使用10ml放于wb 孵育盒，使膜浸没，wb孵育盒放置于摇床，转速70，室温，封闭60min

PBST洗膜：共3次，每次5min，每次使用PBST 10-15ml

二抗孵育：使用5%牛奶按照1：5000稀释HRP标记的羊抗小鼠二抗（1ug/ul），使用10ml，使膜浸没，wb孵育盒放置于摇床，转速70，室温，封闭60min；

PBST洗膜：共3次，每次5min，每次使用PBST 10-15ml

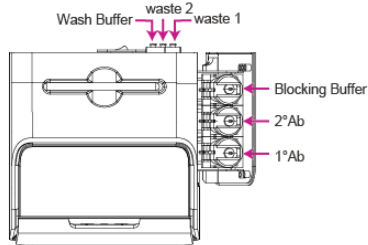
5.4.2:取一张膜用eZwest进行自动封闭和抗体孵育

5.4.2.1：试剂准备：提前使用50ml离心管准备封闭液8ml（5%牛奶），一抗稀释液8ml(使用5%牛奶按照1：2000稀释比例稀释一抗)，二抗稀释液8ml（使用5%牛奶按照1：10000稀释比例稀释二抗），使用500ml瓶子准备好PBST 200ml，并按照仪器上的标识将试剂放置在相对应的试管架中。

注意：1. 打开仪器背面的电源开关，若机器提示清洗，请按照步骤5.4.2.6进行清洗维护

2. 封闭液，一抗稀释液，二抗稀释液至少准备8ml液体，PBST至少准备200ml液体

3. 检测封闭液，抗体稀释液管子接口处是否连接完好，按压盖紧封闭液、一抗和二抗的管盖

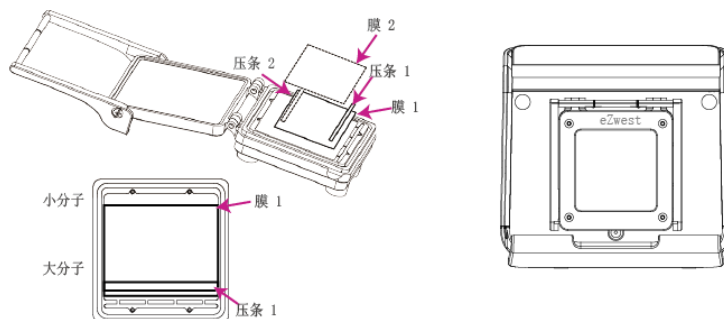


5.4.2.2：打开仪器反应槽，将膜放入其中：大蛋白朝向反应槽的凸起位置，小分子朝向轴心；整张膜放置在框内，不要超过分液棱，注意中间留一些缝隙，然后加入湿润的压条，合上反应槽。将组装后的反应槽插入仪器。

注意：1. 单张膜时，蛋白面朝上，两张膜时，蛋白面相对

2. 防止在运行过程中膜上下移动

3. 将反应槽上“eZwest”字样对向自己



5.4.2.3：程序设置：选择屏幕上面的“Method”进入程序设置界面进行程序设置。分别进行以下设置：选择“Membrane Size”为1

步骤“1”选择“Reagent”为Blocking，“Time”为60min，“Cycle”为1，“Speed”为Normal

步骤“2”选择“Reagent”为PBST，“Time”为5min，“Cycle”为3，“Speed”为Normal

步骤“3”选择“Reagent”为1st Ab，“Time”为60min，“Cycle”为1，“Speed”为Normal，“Recovery”选择打勾

则一抗将进行回收，不打勾则一抗会从废液管中排出

步骤“4”选择“Reagent”为PSBT，“Time”为5min，“Cycle”为3，“Speed”为Normal

步骤“5”选择“Reagent”为2nd Ab，“Time”为60min，“Cycle”为1，“Speed”为Normal，

“Recovery”选择打勾则一抗将进行回收，不打勾则二抗会由废液管中排出

步骤“6”选择“Reagent”为PSBT，“Time”为5min，“Cycle”为3，“Speed”为Normal

步骤“7”选择“Reagent”为——

设置完成之后先后选择右上角的“Save”和“Use”按键即完成程序设置

5.4.2.4：运行仪器，选择屏幕上的“Start”即可运行本次实验

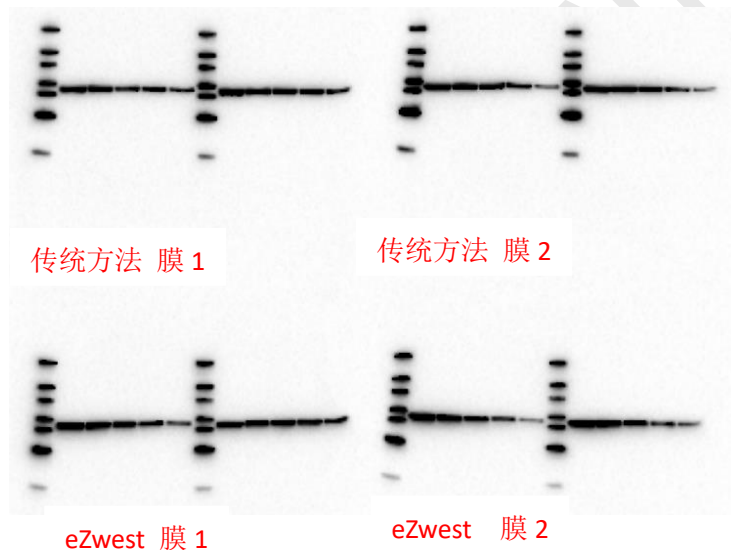
5.4.2.5：程序运行结束之后将腔体从仪器上取出，再将膜从腔体中取出用于后续成像曝光。

5.4.2.6：清洗仪器：将取出膜的腔体插回仪器中，将封闭液管中液体倒掉换为20-25ml的清洗液（0.1M氢氧化钠+30%异丙醇水溶液），将一抗二抗管中液体倒掉并将试管重新放回试管架中，运行仪器上的“System Wash”清洗程序。清洗完成之后将封闭液管，一抗管和二抗管取出扔掉，即完成清洗仪器步骤。

5.5：曝光成像：将四张膜放置在 Biorad 成像仪中进行曝光，取显影液 A 液与 B 液,按照 1:1 比率进行混匀,成像仪程序选择为“chemi”曝光方式为连续曝光，曝光时间为 1-60s，共 60 张。每张膜放均匀加上 1 毫升混合后的显影液，等待 30s 之后选择运行实验程序，即得到实验结果。

6. 实验结果与分析

取曝光第 20s 的照片作为实验结果如图：

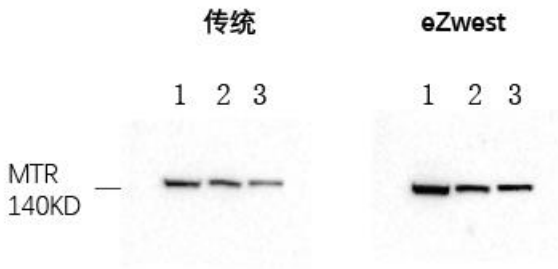


从上图的结果来看在室温条件下，传统方法孵育 beta-actin 抗体效果与 eZwest 孵育 beta-actin 效果无较大差别，相同的孵育条件下，eZwest 孵育 beta-actin 效果可达到传统方法孵育效果

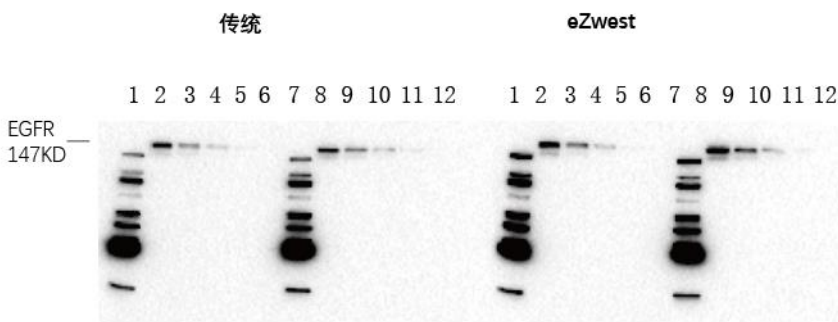
7. 更多实验案例集合

更多实验案例，详见以下：

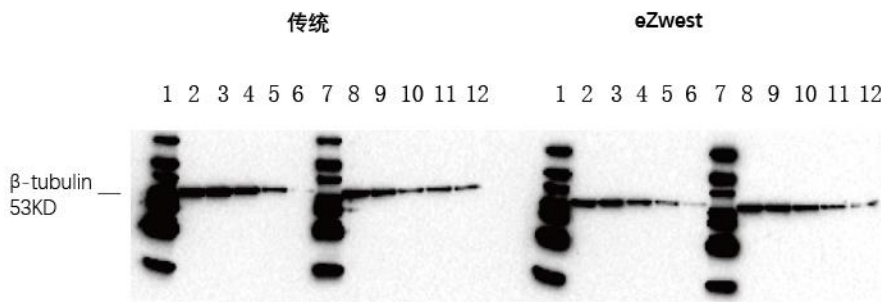
MTR (140KD)



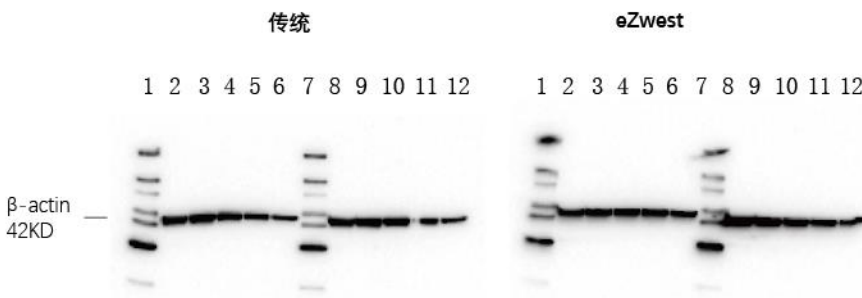
EGFR 147KD



β -tubulin 53KD



β -Actin 42KD



GAPDH 36KD

