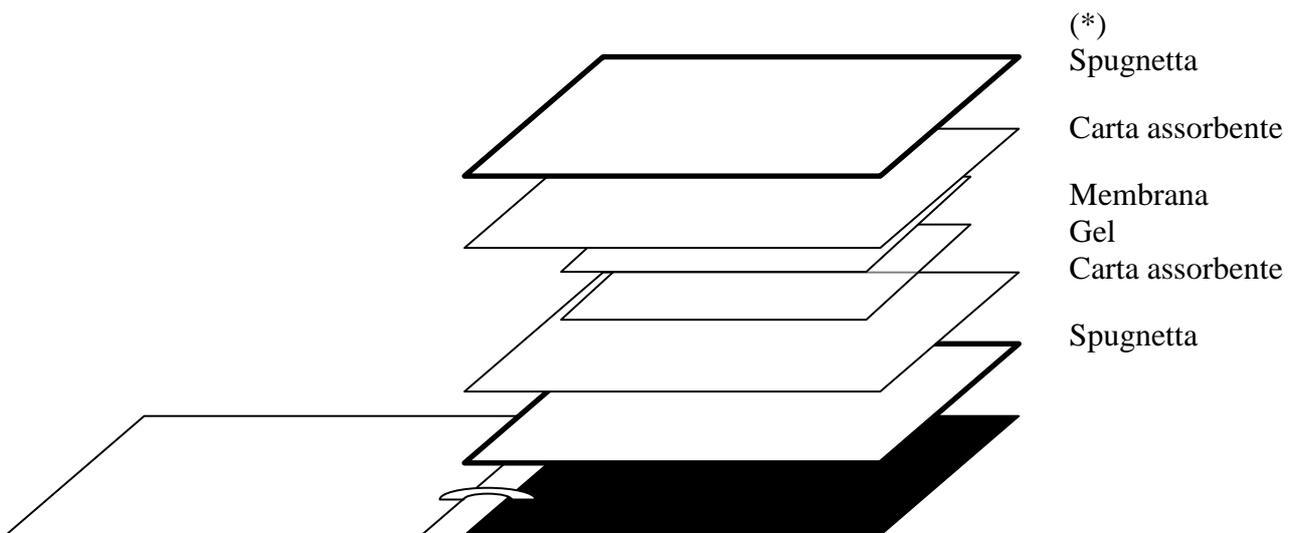


# Western Blot

## Buffer ed operazioni preliminari

- Preparare due pezzi di carta assorbente delle dimensioni doppie rispetto alle dimensioni delle due spugnette (un sandwich ogni 2 gruppi).
- Preparare 1 L di Buffer Western blot (WB) (sufficiente per il trasferimento di 2 sandwich):
  - ✓ Isopropanolo 200 ml
  - ✓ Buffer Western 10x 100 ml
  - ✓ H<sub>2</sub>O 700 ml
- Recuperare il gel ed immergerlo in una vaschetta pulita contenente un po' di buffer WB 1X.
- Attivare la membrana in metanolo 100% per 5 secondi e poi trasferirla nel buffer WB 1X.
- Assemblare il sandwich come in figura (un sandwich ogni 2 gruppi).
- Inserire i sandwich nel supporto con la membrana rivolta verso il lato rosso (polo +).
- Aggiungere la vaschetta con il ghiaccio, il buffer WB 1X.
- Impostare l'alimentatore per il trasferimento (100 V, 350 mA, 60 minuti).

**Note:** il sandwich va posto nell'alloggiamento con la parte nera rivolta verso la parte nera; aggiungere anche la vaschetta di ghiaccio e mettere in agitazione.



- Preparare 150 mL di PBS 1X a partire dallo stock 10X.
- Al termine della corsa recuperare la membrana,
- Lavarla bene la membrana con 10 ml di PBS 1X.
- Trasferirla in 15 ml di PBS 1X, 5% latte in polvere e lasciare in agitazione 45 minuti.
- Lavare la membrane 3 volte in PBS 1X.
- Porre la membrana in 10 ml di PBS + 100 mg BSA (preparare 10 ml soluzione per membrana (per 2 gruppi)). 5µl di Anticorpo (Ab).
- Lasciare in agitazione 1.5 ore.
- Lavare la membrane 3 volte in PBS 1X.
- Trasferire la membrana nella seguente soluzione per la rivelazione:  
  
15 mg di cloronaftolo,  
5 ml di metanolo,  
20 ml di PBS 1X
- Aggiungere 50 µl di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- Lasciare reagire per qualche minuto
- Lavare con H<sub>2</sub>O e lasciare asciugare.