



免疫印迹 (WB) 实验操作流程

1. 试剂和溶液

转印缓冲液：0.025M Tris base , 0.187 M 甘氨酸 , 25%甲醇

氨基黑溶液：0.1% 酸性黑 10B

1×TBST：25mM Tris-HCl (pH 8.0) , 0.2 M NaCl , 0.1%Tween 20

封闭液：TBST 配制的 5%牛奶

抗体稀释液：TBST 配制的 5%牛奶

显色系统：ECL 显色

2. 实验步骤

1. 电泳：将裂解液进行 SDS-PAGE 电泳，80v，30 分钟，120v，90 分钟；
2. 转膜：PVDF 膜在甲醇中浸泡约 30 秒左右，滤纸浸泡在转印缓冲液预湿，半干法转印到 PVDF 膜上，10v，150 分钟；
3. 染色：氨基黑染色 5 分钟，甲醇褪去背景色，观察条带；
4. 膜活化：将 PVDF 膜置于甲醇活化 1min，用纯水洗膜 2 次后再用 TBST 洗涤 3 次；
5. 封闭：将膜条置于 5%牛奶或 2% BSA 中，室温混摇 2h；
6. 一抗孵育：将待检抗体用 3%牛奶或 2% BSA 稀释到合适浓度（参照抗体说明书，根据客户预实验结果，稀释度上下浮动一个数量级都为正常），将膜放入对应的已稀释待检样品中，置 4℃混摇孵育过夜；
7. 洗涤：取出膜放在 TBST 中洗涤 3×5min；
8. 二抗孵育：将膜取出放入稀释好的 HRP 标记的二抗（参照二抗说明书进行稀释）中，室温混摇 2h；
9. 洗涤：取出膜放在 TBST 中洗涤 3×5min；
10. ECL 显色：将膜取出放入混匀的 ECL 显色液中，孵育 3min，将膜取出贴在有荧光角标的胶片上，迅速用保鲜膜包好；
11. 曝光：把底片放在暗盒中，根据荧光强度分别对 X 光胶片作不同时间段的曝光，曝光结束后，将底片取出，1min 显影，30s 清洗，1min 定影，30s 清洗，晾干；
12. 结果分析：用扫描仪将曝光后的 X 光胶片扫描，做后续结果分析。

