

免疫印迹标准操作流程

聚丙烯酰胺凝胶电泳

高分子量蛋白用低浓度胶，低分子量蛋白用高浓度胶分离。

转膜

两类膜可供选择: 硝酸纤维素膜和PVDF膜，根据不同需要选择(右表)

膜染色

为检测转膜是否成功，可用丽春红染色。

膜的封闭

有两种封闭液，脱脂奶粉或BSA，封闭时，4°C 摇动，封闭1hour，再用TBST洗5秒，进入下一步抗体的孵育。

一抗的孵育

尽可能低温孵育1小时或过夜，同时保持适当的摇动使之均匀浸没膜

二抗的孵育

一抗孵育结束后，用TBST摇动洗膜数次，每次5分钟或更长，去除残留的一抗。二抗孵育，室温，1-2小时，摇动。

洗膜

取出膜，用足量的37摄氏度预温的洗涤液摇动漂洗3次，每次5-10分钟。然后用TBS摇动漂洗2次，每次5分钟。

显色

显色分为酶促底物发光和化学发光法或荧光法如为显色法，则直接孵育至显色即可，1分钟

胶片曝光显影

X光胶片或数字图像显影

蛋白分子量 (KDa) 凝胶浓度 (%)

4-40	20
12-45	15
10-70	12.5
15-100	10
25-200	8

膜选择小贴士

膜种类	PVDF膜	NC膜	尼龙膜
订购号	BSP0161	66485	60336
膜型号	FluoTrans W	BioTrace NT	Biodyne C
灵敏度和分辨率	高	高	高
背景	低	低	较低
蛋白结合能力	146-213 μg/cm ²	209μg/cm ²	非常适合于核酸检测
机械强度	较高的拉伸强度	坚固耐用	不易破裂或收缩
溶剂抗性	强	差	差
使用前是否需要浸润	100% 甲醇润湿	缓冲液润湿	缓冲液润湿
适用检测方法	显色法, 化学发光, 荧光, 放射性, 化学发光, 快速免疫检测	显色法, 化学发光, 荧光, 放射性	显色, 化学发光, 放射性
适用范围	普通蛋白WB, 糖蛋白检测, 蛋白质测序, 氨基酸分析, 重复检测	普通蛋白WB, 氨基酸分析, 重复检测	低浓度小分子蛋白, 酸性蛋白, 糖蛋白, 蛋白多糖, 核酸检测常用

内参名称 分子量大小 适用范围

Beta-actin	43KDa	胞浆和全细胞
GAPDH	30-40KDa	胞浆和全细胞
Tubulin	55KDa	胞浆和全细胞
VCD A1/Porin	31KDa	线粒体
COXIV	16KDa	线粒体
Lamin B1	66KDa	细胞核 (不适用于去除核膜的样本)
TBP	38KDa	细胞核 (不适用于去除DNA的样本)

颇尔实验室小助手

- Tris-HCl缓冲液
20mM Tris-HCl, PH 7.5
- 10x TBS缓冲液
24.23 g Trizma HCl
80.06 g NaCl
加约 800 ml 超纯水
用纯HCl调pH 至7.6
定容至 1 L.
- TBST缓冲液
量取100 ml 10x TBS + 900超纯水 + 1ml Tween20
- PBS缓冲液
1.16 g Na₂HPO₄, 0.1g KCl, 0.1g K₃PO₄,
4g NaCl (500 ml 超纯水) pH 7.4

