



One Step WB

新型一步法快速WB实验有节约实验时间、检测灵敏度高和背景低等多种优点。常规的Western Blot间接法检测过程（封闭，洗涤，一抗结合，洗涤，二抗结合和洗涤）需要5-6个小时（一抗过夜需要时间更久），实验流程复杂且需要多步条件优化，使用一步法抗体可以在不减弱实验灵敏度的情况下，将封闭，洗涤，一抗结合，洗涤，二抗结合合并为一个步骤，把实验时间锐减为2小时左右。胶上的蛋白转移到印迹膜上后，使用一抗和二抗稀释而成的抗体孵育液短时间孵育印迹膜后，经简单洗涤，即可进行发光或显色检测。

I WB一步法实验流程

● 1. 制胶

根据目的蛋白分子量大小选择合适的分离胶浓度。

● 2. 电泳

采用恒压模式，先采用恒压80V，大约25min后，蛋白从浓缩胶进入分离胶，调节电压为恒压120V，溴酚蓝跑至分离胶底部时，终止电泳。

● 3. 转膜

根据目的蛋白分子量大小选择合适的转膜条件。注意，若使用PVDF膜，需将膜放入甲醇中活化。

● 4. 抗体孵育

转膜完成后，用TBST洗膜2-3次，除去残留的转膜缓冲液。将一抗按1:1000稀释比，二抗按1:4000稀释比同时加入3%脱脂牛奶中，室温孵育2个小时。

● 5. 洗膜

抗体孵育完成后，TBST洗膜5min*4次

● 6. 曝光

I WB流程示意图

