

此为临时链接，仅用于预览，将在短期内失效。

## WB检测磷酸化蛋白的实验方案

abcam abcam 2018-10-17

**请关注：** ↑Abcam 助您更快实现研究使命

将细胞或组织样品在裂解缓冲液中匀浆，裂解缓冲液需新鲜制备，加入**蛋白酶抑制剂**（检测磷酸化蛋白时还应加入**磷酸酶抑制剂**）。

一旦开始裂解，蛋白水解、去磷酸化和变性也随即开始。始终将样品置于冰上或维持在 4 °C，并在一开始就向裂解缓冲液中新鲜加入合适的抑制剂，能够显著减缓这些反应。

使用加入了新鲜**蛋白酶和磷酸酶抑制剂**的 RIPA 或 NP40 缓冲液。

### 实验步骤

1. 向含有 1-100 ng 靶蛋白（500 μg 裂解物）的蛋白样品中加入等体积的 2x SDS-PAGE 样品缓冲液。对于还原样品，样品缓冲液中应该同时加入 DTT 或 β-巯基乙醇。对于非还原样品，不加入 DTT 或 β-巯基乙醇。
2. 将样品加热到 95 °C 或煮沸 5 分钟，使蛋白变性。
3. 上样并在标准条件下跑胶。
4. 通过半干法或湿法将蛋白转印至 PVDF 膜上。请注意：PVDF 膜必须预先在甲醇溶液中湿润后。
5. 如有需要，可以在丽春红染料中对膜进行简单地（10 秒）染色，以确定转膜效率。可以用 PBST 或 TBST 清洗去除染料。我们不建议在蒸馏水中清洗，因为某些情况下可能会使蛋白质脱落下来。
6. 在 TBST 中加入 5% w/v BSA 对膜进行封闭。在摇床上 4 °C 孵育 1 小时。
7. 使用 TBST 稀释一抗至建议稀释度。我们推荐在封闭的袋子、杂交管或 50 mL Falcon 管（约 2.5 mL 缓冲液）中进行孵育。在摇床上 4 °C 孵育过夜。
8. 室温下使用 TBST 洗膜 3 至 4 次，每次 5 分钟。
9. 在 TBST 中，按照建议的稀释度（虽然需要对特定应用进行优化，1/5000 是较好的通用工作稀释度）稀释 HRP 二抗。
10. 室温下使用 TBST 洗膜 3 至 4 次，每次 5 分钟。
11. 进行 ECL Plus 检测。

### 注意事项

此为临时链接，保存有期限，请在有效期内使用。

1. 使蛋白保持在磷酸化的状态，加入充足的磷酸酶抑制剂，并始终将样品置于冰上。
2. 使用 5% w/v BSA (fractionV) 而非牛奶（牛奶中包含的酪蛋白是一种磷酸化蛋白；而抗体会检测牛奶中的酪蛋白导致高背景）封闭膜。
3. 请记住磷酸化可能需要被诱导。信号弱或无信号可能意味着诱导不充分。建议使用推荐的阳性对照。
4. 研究磷酸化时，请记得向裂解液中加入磷酸酶抑制剂

[点击阅读原文，可查看英文原版实验方案](#)

[阅读原文](#)