

此为临时链接，仅用于预览，将在短期内失效。

# 口袋教材：荧光WB实验方案

abcam abcam 2017-11-08

提示：使用抗体，怎么能不关注 "[Abcam](#)" ↑

请收藏本文，以便您实验时快速参考：

了解如何使用IRDye®二抗，封闭、抗体稀释、孵育时间、洗涤步骤和成像以获得荧光免疫印迹中清晰的条带。

应用IRDye®二抗的荧光蛋白印迹是可以定量的，并且提供比基于酶的方法更宽的动态范围，使其成为**量化相对蛋白质丰度**的最佳选择。有关样品制备，运行凝胶以及将凝胶中的蛋白质转移至膜上的指导，请参阅我们的[常规westernblot方案](#)。

## 封闭与一抗孵育

1. 将膜浸没在高质量的TBS based 封闭缓冲液 (BB) 。孵育1小时。
2. 使用稀释液 (50%BB, 50%TBS 0.1%吐温20 (TBST) ) 稀释抗体。
3. 将膜浸没在10ml配好的一抗孵育液中，放在摇床上孵育。建议使用浓度梯度时间梯度来确认最佳稀释比例和孵育时间。

## 洗膜并准备二抗

1. 去除一抗孵育液并开始洗涤步骤。
2. 洗膜液使用 TBST，先快速冲洗2次，然后充分洗膜3次，室温，每次15分钟。
3. 洗膜时，配置二抗孵育液，根据建议 (见下表1) 稀释二抗。确保二抗孵育液充分混匀。荧光二抗都是光敏感的，孵化时应避光。
4. 去除TBST并孵育二抗，放置在摇床上，避光孵育1小时。
5. 孵育后，去除二抗孵育液，重复第2步的洗膜步骤。

表1：二抗与稀释度

一抗宿主物种	二抗	建议稀释比例
Rabbit	<b>Goat anti-Rabbit IgG H&amp;L (IRDye® 800CW) preadsorbed (ab216773)</b>	1:10,000

此为临时链接，仅用于预览，将在短期内失效。

	<b>Goat Anti-Rabbit IGG H&amp;L (IRDye® 6 80RD)- ab216777</b>	1:10,000
	<b>Goat anti-Mouse IgG H&amp;L (IRDye® 8 00CW) preadsorbed (ab216772)</b>	1:10,000
Mouse	<b>Goat anti-Mouse IgG H&amp;L (IRDye® 6 80RD) preadsorbed (ab216776)</b>	1:10,000

[查看其它IRDye®二抗.>>](#)

### 成像

1. 使用无绒棉布沾取70%乙醇清洁扫描区。
2. 如果扫描干燥的膜，将膜放在两张滤纸之间，并用箔片覆盖，在工作台上放置过夜。将蛋白面朝下放置在扫描区，膜上方压上硅胶垫，以确保膜平放在玻璃上。不需要滚筒。
3. 如果扫描湿润的膜，则蛋白面朝下放置在扫描区，滴取5ml TBST覆盖整个扫描区。在膜上放置硅垫，用滚筒去除气泡。组蛋白检测用湿膜扫描效果很好。
4. 盖上设备，根据设备使用说明进行相应的扫描。扫描后，将膜取下，并使用无绒棉布沾取70%乙醇清洁扫描区。

扩展阅读：[成功的荧光蛋白印迹的提示和技巧（英文）](#)

