

# Dot Blot 检测标准操作流程

## 一、实验仪器试剂和耗材

- (1) Blocking Buffer (RK05742)
- (2) Antibody Dilution Buffer (RK05743)
- (3) TBST Buffer (RM00013)
- (4) HRP 偶联二抗 (AS014, AS003)
- (5) SignalFire™ ECL Reagent (RM00020/RM00021)
- (6) Nitrocellulose membrane (0.45  $\mu$  m) (RM00017)
- (7) Nitrocellulose membrane (0.2  $\mu$  m) (RM02801)

## 二、实验步骤

### 1、膜的准备

Dot Blot 检测采用 NC 膜，取 NC 膜裁成 6.5cm 宽长条，并在其上画长宽为 1cm $\times$ 1cm 正方形小格（在膜上面的蓝色纸上画，画格时膜（白色）与蓝色纸必须完全重叠，让蓝色纸上的正方形小格能在膜上留下正确的划痕）。

多肽使用 0.45  $\mu$  M 的 NC 膜，DNA/RNA Oligo 使用 0.2  $\mu$  m 的 NC 膜。

### 2、多肽稀释或 DNA/RNA Oligo 稀释

将不同浓度的多肽用 PBS 稀释为成 50ng/ $\mu$ l（稀释为需要的浓度即可）。或者将不同浓度的 DNA/RNA Oligo 用无酶水稀释至 10  $\mu$  M（稀释为需要的浓度即可）。

### 3、多肽或 DNA/RNA Oligo 包被

揭开膜上面的蓝色保护纸，用移液器吸取 50ng/ $\mu$ L 多肽稀释液 2 $\mu$ l 点在膜上 1cm $\times$ 1cm 正方形小格中心，即多肽包被量为 100ng（包被量根据需求调整）。点样完成后，将 NC 膜放入 37 $^{\circ}$ C 烘箱中 30min。

如样本为 DNA/RNA Oligo，则用移液器吸取 10  $\mu$  M DNA/RNA Oligo 稀释液 2 $\mu$ l 点在膜上 1cm $\times$ 1cm 正方形小格中心，即每小格 DNA/RNA Oligo 包被量为 100  $\mu$  M（包被量根据需求调整）。点样完成后，将 NC 膜放入 37 $^{\circ}$ C 烘箱中 30min，再用紫外交联 20min。

### 4、封闭

把膜放入相应的大小的抗体孵育容器中，加入适量 Blocking Buffer 室温封闭 1h。

### 5、一抗孵育

封闭结束 10min 前，用 Antibody Dilution Buffer 稀释一抗备用。封闭结束后去除封

闭液，加入稀释好的一抗工作液，室温 2h 或 4℃ 过夜。

## 6、洗涤

去除一抗工作液，加入适量 TBST Buffer 洗杂 4 次，5min/次。

## 7、二抗孵育

洗杂结束前 10min，用 Antibody Dilution Buffer 稀释二抗备用。去除 TBST Buffer，加入稀释好的二抗工作液，室温 1h。

## 8、洗涤

去除二抗工作液，加入适量 TBST Buffer 洗杂 4 次，5min/次。

## 9、曝光

a. 根据膜的大小，按 1cm\*1cm 的膜使用 20ul 工作液，按比例吸取等体积的 Solution I 和 Solution II 混匀，配制成发光检测工作液。

b. 用平头镊子将膜取出，膜的下缘轻轻接触吸水纸，去除膜上多余的液体。用移液器将工作液加到转印膜上，使其均有覆盖，室温孵育 1-2min，此步骤可在洁净保鲜膜上或塑料盒中完成。

c. 压片检测：将膜固定于片夹内。暗室内压片 30s，立即显影定影，根据结果再调整压片时间。或直接分别压片 10s、30s、60s、90s，然后一起显影定影观察结果。

d. 荧光成像仪检测：将膜放置到荧光成像仪内，参考仪器说明书进行检测。