

Оценивают полноту переноса белков визуально по переносу окрашенных маркеров молекулярных масс, все основные белковые полосы которого должны быть выявлены на мембране.

Детекция

Для детекции результатов метода вестерн-блот проводят обработку (гибридизацию) исследуемого препарата антителами. Для этого мембрану с перенесенными на нее белками помещают в контейнер с блокирующим буферным раствором и инкубируют на орбитальном шейкере в течение 30 – 60 мин (если не предусмотрено иное в фармакопейной статье или нормативной документации) для предотвращения неспецифической сорбции антител на мембране.

После этого промывают мембрану в буферном растворе для отмывки трижды по 5 мин, если не указано иное в фармакопейной статье или нормативной документации.

Затем мембрану обрабатывают раствором первых антител к анализируемому белку, приготовленным с использованием буферного раствора для антител (если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации) непосредственно перед использованием в соответствии с инструкцией по применению. Обработку антителами проводят при комнатной температуре в течение 30 – 60 мин (если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации).

Далее трижды по 5 мин проводят отмывку мембраны буферным раствором от несвязавшихся антител на орбитальном шейкере при комнатной температуре, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

После отмывки мембраны, проводят обработку (гибридизацию) раствором вторых антител. В качестве вторых антител используют поликлональные антитела к иммуноглобулинам того вида животного, которое использовалось для получения первых антител. Данные антитела конъюгированы с ферментом (пероксидаза из корней хрена или щелочная