

蛋白免疫印迹（Western Blot）试剂盒（抗兔）

产品货号：WB001

产品规格：36T

产品描述： Bioss 在 Western 印迹法中，待测样品溶解于去污剂和还原剂的溶液中，经过 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳后转移到固相支持物上(常用硝酸纤维素滤膜)，可被染色，随后滤膜可与抗靶蛋白一抗反应。最后，特异性结合抗体可用多种二级免疫学试剂(与辣根过氧化物酶 HRP 或碱性磷酸酶 AP 或荧光标记)进行显色检测。

产品内容：

组分编号	组分名称	规格	储存条件	使用方法
5K-1	10×电泳液	100ml×1 瓶	2-8℃保存，一年有效。	如下
5K-2	10×电转液	100ml×1 瓶	2-8℃保存，一年有效。	如下
5K-3	10×TBST	100ml×1 瓶	2-8℃保存，一年有效。	即用
5K-4	2×上样缓冲液	1ml×1 管	-20℃保存，一年有效。	即用
5K-5	NC 膜 (6.3cm×8.3cm)	4 张×1 袋	常温保存，一年有效。	即用
5K-6	显色 A 液	6ml×1 瓶	2-8℃避光保存，一年有效。	即用
5K-7	显色 B 液	6ml×1 瓶	2-8℃保存，一年有效。	即用
5K-8	BSA	5g×1 袋	2-8℃防潮保存，一年有效。	如下
5K-9	脱脂奶粉	5g×1 袋	2-8℃防潮保存，一年有效。	如下
5K-10	预染 Marker (11-180kD)	20ul×1 管	-20℃保存，一年有效。	即用
5K-11	二抗 (Anti-R-HRP)	20ul×1 管	-20℃避光保存，一年有效。	即用

注：各组分试剂瓶打开后 2-8℃保存一周。

注：NC 膜（5K-5）默认发 0.45um 孔径的，如需孔径 0.2um 的 NC 膜，请单独备注

自备材料：

1. 适合目的蛋白浓度的凝胶板，可购买 C-0047（SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒）；
2. 电泳仪及相关设备；
3. 电转仪及相关设备；
4. 抗体孵育相关仪器；
5. 高精度可调移液器（已校准）及吸头：0.5-10, 2-20, 20-200, 200-1000 μ l。
6. 甲醇

样品处理：

取样---裂解组织或细胞---低温、高速离心管得上清---BCA 测浓度---稀释到一致浓度---添加 2 \times 上样缓冲液（样品：2 \times 上样缓冲液=1:1）---蛋白样品变性。

溶液配制：

- 电泳缓冲液：取 10 \times 电泳液 100ml，加入双蒸水，定容至 1000ml。
- 电转缓冲液：取 10 \times 电转液 100ml，加 200ml 无水甲醇，加入双蒸水，定容至 1000ml。
- 1 \times TBST：取 10 \times TBST 溶液 100ml，加入双蒸水，定容至 1000ml。

操作步骤：

1. **样品**：取准备好的蛋白裂解液，和 2 \times 上样缓冲液等体积混合，混匀后于 100 度煮 10min，12000rpm 离心 5min，取适量体积上样。
2. **电泳**：使用配制好的电泳液，80V 电泳 20min，120V 电泳至结束。
3. **转膜**：使用配制好的电转液，100V 恒压电转 90min。
4. **封闭**：用 1 \times TBST 配制 5%的脱脂奶粉/BSA 溶液，将膜置于 5%的脱脂奶粉/BSA 溶液中，室温摇床上孵育 60min。
5. **孵育一抗**：5%脱脂奶粉/BSA 稀释一抗，条件为 2-8 度摇床上孵育过夜。
6. **洗涤**：用 1 \times TBST 洗 3 次，每次 10min。
7. **孵育二抗**：5%脱脂奶粉/BSA 稀释二抗，条件为室温摇床上孵育 60min。
8. **洗涤**：用 1 \times TBST 洗 3 次，每次 10min。
9. **显色和曝光**：取显色 A 液和 B 液等体积混合，将混合后的液体铺满整张膜，反应 2min，之后即可进行曝光操作。

常见问题分析及解决方法：

问题	可能原因	解决办法
背景色深	封闭时间短，或抗体浓度高	适当增加封闭时间； 降低二抗浓度，增加二抗稀释比例。
	洗膜不充分	二抗孵育完应进行 TBST 进行 3 次洗膜，可适当增加洗膜时间。
	曝光时间过长	缩短曝光时间和与底物反应时间
	封闭液选择不当	查看抗体信息，选择正确的封闭液
	膜上出现点状黑背景	磷酸化抗体对蛋白磷酸化检测，可换成 BSA 封闭
	洗涤操作不规范	遵照操作流程进行实验
	膜干燥	过程中应充分保证 NC 膜处于湿润状态
杂带多	上样量太大	减少样品上样量
	抗体稀释比例过大	降低一抗浓度，增加稀释比例
	曝光时间长	缩短曝光时间
无条带	抗体出现的问题	查看二抗是否失效及验证其灵敏度
	化学显色发光	发光液或者显色试剂失效
	蛋白出现问题	做考染观察目的蛋白分子量条带
		参考内参抗体结果

注意事项：

1. 组织、细胞蛋白样品的上样量为 20-40ug，但是纯蛋白上样量为 4ug 左右。
2. 电极不平衡或加样操作偏斜会导致条带向两边扩散。
3. 叠氮钠是一种 HRP 的抑制剂，使用 HRP 标记的二抗时，缓冲液不能使用叠氮钠作为防腐剂。
4. 转膜时一定要先将 NC 膜用转膜缓冲液完全浸透，防止转膜时有气泡产生。
5. 转膜过程中，需保持转膜缓冲液低温，最好在缓冲液中放冰袋降温，防止高温致蛋白条带变形。
6. 转膜时注意方向，胶靠近在负极，膜靠近正极。
7. 封闭时，生物素标记的二抗就不宜用牛奶，因为牛奶中含有生物素，用 BSA 效果更好，磷酸化抗体检测应使用 BSA 封闭。
8. 一抗与二抗孵育时应放置摇床，孵育均匀，防止出现条带不一致现象。

相关辅助试剂：

编号	英文名称	中文名称	规格
C05-01001	RIPA Lysis Buffer	RIPA 组织及细胞蛋白裂解液	30/60/100ml
C05-01002	PMSF	PMSF (100mM)	1ml
C05-04001	Coomassie Blue Fast Staining Solution	考马斯亮蓝快速染色液	250ml
C05-04002	Ponceau S Staining Solution	丽春红染色液 10X	10ml
C05-07004	ECL Plus Luminol Reagent Kit	超敏 ECL 化学发光试剂盒	25ml
C-0047	SDS-PAGE kit	SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒	40-60 块
bs-40295G- IRDye8	IRDye® 800CW Goat anti-Rabbit IgG	®IRDye 800cw 羊抗兔 IgG-荧 光二抗	100ul
bs-40296G- IRDye8	IRDye800CW Conjugated Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	IRDye800CW 标记的山羊抗小 鼠 IgG (H+L) -荧光二抗	100ul