

蛋
白
质
系
列

CAT#:81215A-20
CAT#:81215B-20
常温运输, 4℃保存

TIANDZ

一站式 Western 印迹套装

One-Stop Western Blotting Pack

使用手册 V1.3

北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 26 号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦 506

网址: www.tiandz.com; 电话: 400-6765278; 电邮: order@tiandz.com

<p>产品及特点</p>	<p>Western Blot 是检测固定在固相基质上的蛋白质的免疫方法，又叫免疫印迹 (immunoblotting)。该方法的是先将蛋白质从凝胶中转移到固相基质（硝酸纤维素膜）上；再对其进行特异性抗体检测。由于涉及多种溶液，用户单独配制的活十分繁琐，为此天泽基因开发了本产品。它具有下列特点：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 一站式，提供除水、样品和抗体以外的所有成分（检测方法有 HRP 或 AP 检测法两种）。 2. 即开即用，用户不需单独准备各种成分，十分方便。 3. 灵敏，可检测 10 pg 的蛋白质（HRP 或 AP 检测法）。 4. 灵活，与 SDS-PAGE、非变性 PAGE 胶、等电聚焦电泳等兼容。 																																																															
<p>规格及成分</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>成份</th> <th>编号</th> <th>A 型</th> <th>B 型</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>湿法电转液 (100928-20)</td> <td>100928</td> <td>20L(干粉)</td> <td>20L(干粉)</td> </tr> <tr> <td>硝酸纤维素膜 (10×10 cm)</td> <td>100930</td> <td>20 张</td> <td>20 张</td> </tr> <tr> <td>Western 封膜液 (81210-100)</td> <td>81210</td> <td>100 mL</td> <td>100 mL</td> </tr> <tr> <td>Western 洗膜液 (81211-250)</td> <td>81211</td> <td>250 mL</td> <td>250 mL</td> </tr> <tr> <td>抗体稀释液 (81208) 成分一</td> <td>81208A</td> <td>100 mL</td> <td>100 mL</td> </tr> <tr> <td>抗体稀释液 (81208) 成分二</td> <td>81208B</td> <td>0.5 g</td> <td>0.5 g</td> </tr> <tr> <td>杂交袋 (90206-20)</td> <td>90206</td> <td>20 个</td> <td>20 个</td> </tr> <tr> <td>HRP 显色试剂之 TMB 溶液 A</td> <td></td> <td>10 mL</td> <td>无</td> </tr> <tr> <td>HRP 显色试剂之 TMB 溶液 B</td> <td></td> <td>10 mL</td> <td>无</td> </tr> <tr> <td>AP 显色试剂之 10×AP 缓冲液</td> <td></td> <td>无</td> <td>50 mL</td> </tr> <tr> <td>AP 显色试剂之 BCIP 溶液</td> <td></td> <td>无</td> <td>1 mL</td> </tr> <tr> <td>AP 显色试剂之 NBT 溶液</td> <td></td> <td>无</td> <td>1 mL</td> </tr> <tr> <td>Western 抗体清除剂 (80813-200)</td> <td>80813</td> <td>200 mL</td> <td>200 mL</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>81215sc</td> <td>1 份</td> <td>1 份</td> </tr> </tbody> </table>				成份	编号	A 型	B 型	湿法电转液 (100928-20)	100928	20L(干粉)	20L(干粉)	硝酸纤维素膜 (10×10 cm)	100930	20 张	20 张	Western 封膜液 (81210-100)	81210	100 mL	100 mL	Western 洗膜液 (81211-250)	81211	250 mL	250 mL	抗体稀释液 (81208) 成分一	81208A	100 mL	100 mL	抗体稀释液 (81208) 成分二	81208B	0.5 g	0.5 g	杂交袋 (90206-20)	90206	20 个	20 个	HRP 显色试剂之 TMB 溶液 A		10 mL	无	HRP 显色试剂之 TMB 溶液 B		10 mL	无	AP 显色试剂之 10×AP 缓冲液		无	50 mL	AP 显色试剂之 BCIP 溶液		无	1 mL	AP 显色试剂之 NBT 溶液		无	1 mL	Western 抗体清除剂 (80813-200)	80813	200 mL	200 mL	使用手册	81215sc	1 份	1 份
成份	编号	A 型	B 型																																																													
湿法电转液 (100928-20)	100928	20L(干粉)	20L(干粉)																																																													
硝酸纤维素膜 (10×10 cm)	100930	20 张	20 张																																																													
Western 封膜液 (81210-100)	81210	100 mL	100 mL																																																													
Western 洗膜液 (81211-250)	81211	250 mL	250 mL																																																													
抗体稀释液 (81208) 成分一	81208A	100 mL	100 mL																																																													
抗体稀释液 (81208) 成分二	81208B	0.5 g	0.5 g																																																													
杂交袋 (90206-20)	90206	20 个	20 个																																																													
HRP 显色试剂之 TMB 溶液 A		10 mL	无																																																													
HRP 显色试剂之 TMB 溶液 B		10 mL	无																																																													
AP 显色试剂之 10×AP 缓冲液		无	50 mL																																																													
AP 显色试剂之 BCIP 溶液		无	1 mL																																																													
AP 显色试剂之 NBT 溶液		无	1 mL																																																													
Western 抗体清除剂 (80813-200)	80813	200 mL	200 mL																																																													
使用手册	81215sc	1 份	1 份																																																													
<p>运输及保存</p>	<p>常温运输和保存，显色试剂需 4℃ 保存，有效期一年。</p>																																																															
<p>自备试剂</p>	<p>去离子水、滤纸、特异一抗、HRP 或 AP 标记的二抗。</p>																																																															
<p>使用方法</p>	<p>一：转膜（湿法电转移）</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 制备湿法电转液:将湿法电转液干粉全部溶解在 1 L 去离子水中得 20×湿法电转液，用时用去离子水稀释 20 倍预冷待用。 																																																															

2. 根据 PAGE 胶的大小剪切同样大小的滤纸和各边都大 1 mm 的硝酸纤维素膜 (以下简称膜)。避免手直接接触膜。
3. 将切好的膜浸泡在新鲜稀释的 1×湿法电转液 (下简称转移液) 中 15-20 分钟。注意: 最好用镊子夹住膜的一边轻轻置于转移液上, 只让膜下层与转移液接触, 通过毛细管作用使整个膜浸湿。避免让膜沉入转移液中, 否则膜与转移液之间形成的气泡会阻止膜的湿润。
4. 在容器中将两块海绵垫、六层滤纸用转移液浸湿。
5. 在转移夹上依次放上一张浸湿的海绵垫、三层浸湿的滤纸、一块 PAGE 胶 (只要分离胶部分)、一张浸湿的膜、三层浸湿的滤纸、一张浸湿的海绵垫。注意: 每叠加层一定要用玻棒来回擀几遍以擀走里面的气泡。**膜两边的滤纸绝对不能相互接触, 否则电转移时会发生短路, 烧坏装置。**
6. 合起转移夹并放入转移槽中 (一定要注意方向, 转印带负电荷的蛋白质时电极方向是膜正胶负; 转印带正电荷的蛋白质时, 电极方向是膜负胶正), 然后用预冷的转移液灌满转移槽。
7. 插上电极, 一般在冷却条件下用 100V 恒压转移 30-60 分钟或冷室中 14V 转移过夜。

注意: 一定要检查电流的大小, 电流一般在 0.1-0.4A。应根据蛋白分子量的大小确定转膜时间, 对于小分子量的蛋白, 转膜时最好垫 2 张或更多张膜 (最多可 10 张), 即使白质已经转过了第一张膜, 还会在其它膜上检测到; 对于大分子量的蛋白, 转膜时电压要高一点, 时间也要延长一点, 开始最好也用两块或多张膜。转移时间长的时候特别要注意加强降温措施。如果目的蛋白转移效率低, 可以在转移液中加终浓度为 20%的甲醇或 0.1%的 SDS。
8. 终止转移后, 取出膜, 并在膜上剪去一个小角以标记方向。如有必要可用自备的各种染液对胶或膜进行染色以确定蛋白质转移效率。

二: 封膜

1. 将膜转移至杂交袋中, 加 5-10 mL Western 封膜液后热密封杂交袋开口。

提供的封膜液只适用于硝酸纤维素膜和 PVDF 膜, 不用于尼龙膜。
2. 室温下用脱色摇床摇动杂交袋 30-60 分钟。

三: 与一抗二抗结合

1. 用 5 mL Western 抗体稀释液 (配制方法: 将抗体稀释液成分干粉到入

成分一溶液中，溶解后即可。未用完的抗体稀释液需-20℃保存)将自备的一抗稀释至适当的倍数(一般需要稀释 10-100000 倍使用，最佳稀释倍数跟一抗效价相关，需摸索)。

2. 剪开杂交袋的一角，倒去封膜液，加入 5 mL 新鲜稀释的一抗溶液，加热密封杂交袋开口。
3. 室温下在脱色摇床上摇动杂交袋 30-60 分钟。
4. 用抗体稀释液将自备的 HRP 或 AP 标记的二抗稀释至适当浓度(一般需要稀释 500-4000 倍。最佳稀释倍数跟二抗效价相关，需摸索)。
5. 剪开杂交袋的一角，倒去一抗溶液(可留存)，加入 5 mL 新鲜稀释的二抗溶液，加热密封杂交袋开口。
6. 室温下在脱色摇床上摇动杂交袋 30-60 分钟，也可过夜孵育。
7. 剪开杂交袋的一角，倒去二抗溶液(可留存)。
8. 剪开杂交袋，用镊子取出膜，用 Western 洗膜液在器皿中洗 3 次，每次 10 分钟。
9. 根据二抗的标记酶选择下面两种显色方法之一。

五：HRP 显色检测 (对 HRP 标记的二抗，本产品 A 型)

1. 将膜平放，在吸附了抗原抗体的一面加入 100-500 μ L TMB 溶液 A 和 100-500 μ L TMB 溶液 B，铺满整个膜表面(具体用量可按膜的大小增减)。
2. 置于平式摇荡仪上，在室温下孵育 2 至 5 分钟，直至深蓝色条带出现。
3. 用镊子夹起膜，放入去离子水中洗膜 3 次终止反应，每次 30 分钟。
4. 空气中晾干后照相保存。注意：膜显色后的颜色在数小时后将会褪色，不能永久存在，故需要及时照相。

六：AP 显色检测 (对 AP 标记的二抗，本产品 B 型)

1. 用新鲜配制的 1 \times AP 缓冲液洗涤硝酸纤维素膜 5 分钟。
2. 将膜转移到新配制的 BCIP-NBT 法 AP 显色液中，每 cm^2 膜需要 0.1 mL 显色液。新鲜配制 BCIP-NBT 法 AP 显色液(以 10 mL 为例)的方法：将 9 mL 去离子水、1 mL 10 \times AP 缓冲液、50 μ L BCIP 溶液和 50 μ L NBT 溶液混匀。此溶液必须在 1 小时内使用。
3. 室温摇晃 5-30 分钟显色(37 $^{\circ}$ C 可加速反应)。
4. 显色到合适程度后用自备去离子水洗膜 3 次终止反应，每次 30 分钟。

5. 用吸水纸吸干膜上的水分，避光干燥保存或在一周内照相。

七：Western 抗体清除剂（说明：此处理可能会使蛋白质失去某些表位）

1. 将膜浸泡在 Western 抗体清除剂中，70℃摇晃孵育 30 分钟，去除一抗和二抗。用 Western 洗膜液洗膜两次，每次 10 分钟。
 2. 膜即可用于下一次 Western 检测的膜封堵步骤。
-