

免疫印染 (Western Blotting) 试剂盒说明书

产品号：80021

产品简介：本试剂盒被设计为探测经 PAGE 胶转移或斑点印迹在固相膜上的特定蛋白质而使用的，提供的试液包括酶标的第二抗体和相应的底物，另外可选择相关实验材料和试剂。

试剂盒组成

标准配置内容物		装量 (10 片次用)	保存条件
Reagent A：封闭粉剂 (Block power)		25g	2-8
Reagent B：抗鼠二抗 (HRP 标记) (1:5000)		40 μ l	2-8
Reagent C：抗兔二抗 (HRP 标记) (1:5000)		40 μ l	2-8
Reagent D：底物	D1 - A 试液	10ml	2-8 (避光)
	D2 - B 试液	10ml	2-8 (避光)
待选配置内容物 (需另外订购)			
Reagent F：PVDF 膜		10 (7.0 \times 9.5cm)	
Reagent G：一抗类 (兔抗)	GST 抗体 (1:2500)	100 μ l	2-8
	6 \times HIS 抗体 (1:2000)	100 μ l	2-8
	GFP 抗体 (1:2000)	100 μ l	2-8
	特殊抗体 (可在 PTGLAB.COM 上查找)	100 μ l	
	一抗二抗去除液	100ml	室温

实验操作步骤

1. 试液的配制：

TBST 溶液：NaCl 80g、Tris-Base 30g 和 Tween-20 2ml，先以少量蒸馏水溶解，加蒸馏水至 1000ml，用 HCl 调 PH 值为 7.6，充分摇匀。

封闭液：2.5g Reagent A：封闭粉剂溶于 50ml TBST 溶液。

底物溶液：Reagent D1：A 和 Reagent D2：B 等量混合 (每次各 1ml) (现用现配)。

2. 封闭：将电转后的固相膜 (如 Reagent F：PVDF 膜等) 置 15ml 封闭液室温 1-2 小时或者 4 过夜。
3. 一抗孵育：取合适量的一抗用 15ml 封闭液稀释，将膜与之室温孵育 1 小时。
4. 洗涤：用 TBST 溶液洗涤三次，每次 10 分钟。
5. 二抗孵育：取 3 μ l 的二抗用 15ml 封闭液稀释，将膜与之室温孵育 1 小时。
6. 洗涤：用 TBST 溶液洗涤三次，每次 10 分钟。
7. 底物孵育：取 2ml 底物液，将膜与之室温孵育 30 秒钟，用保鲜膜将膜包住。
8. 曝光显色：将 X 光胶片在膜上曝光，定影显影 (暗室操作)。

相关说明

1. 如需要可选购电转常用的固相膜 Reagent F：PVDF 膜，其大小可用于 BIORAD 和六一电泳仪配套使用。

2. 如需要, 可选购本公司 Reagent G: 一抗类 (兔抗), 包括有检测表达的 GST 融合蛋白、HIS 融合蛋白和 GFP 融合蛋白, 另外可在本公司的抗体库中选取合适的抗体。

实验过程中出现问题的可能原因

问题	可能原因
膜无显色	<ol style="list-style-type: none">1. 电转不成功, 直接染色膜验证, 电转前, PVDF 膜必须经甲醇充分浸泡2. 遗漏一抗或者二抗孵育步骤3. 不稳定的抗原被破坏4. 样本固定方法不适合或操作不恰当5. 一抗、二抗不匹配6. 一抗稀释度过大7. 检查酶/底物溶液, 注意现配现用。
膜无显色弱	<ol style="list-style-type: none">1. 样本经洗涤步骤后有过多液体残留2. 孵育时间不够3. 底物准备不恰当4. 抗体的稀释度过大
杂带太多膜高背景显色	<ol style="list-style-type: none">1. 封闭时间不足或该步骤遗忘2. 一抗使用浓度是否过高3. 洗涤次数和时间不足4. 底物显色过久