

免疫印染 (Western Blotting) 试剂盒说明书

产品号：800023

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 (AP 标记) (1：5000)	40 μ l	2-8
Reagent C：抗兔二抗 (AP 标记) (1：5000)	40 μ l	2-8
Reagent D：底物 D1 - BCIP	200 μ l	2-8 (避光)
D2 - NBT	100 μ l	2-8 (避光)
Reagent D：10 \times AP 底物缓冲液	10 ml	2-8
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)		

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：0.7ml Reagent D：10 \times AP 底物缓冲液加蒸馏水至 7ml，加 Reagent D1：BCIP 10 μ l 和 Reagent D2：NTB 20 μ l (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：取合适量的底物液稀释，将膜与之室温孵育 5-15 分钟，至区带清晰，终止反应。

自然干燥保存。

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5. 转移不完全
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