



Toll-free:400-611-2007

Order:010-62617225 62979301

Email:zomanbio@126.com

Http://www.zomanbio.com

## Western Blotting 检测试剂盒

(目录号: ZD320)

For Research Use Only

Store at -20°C for one year

Expire date: 20150322

# ZOMANBIO

为生命科学研究探索提供每一款好的产品

北京庄盟国际生物基因科技有限公司  
Beijing Zoman Biotechnology Co.,Ltd.

Order: 010-6261-7225

Free Phone: 400-611-2007

Technical: 010-6297-9301

Fax: 010-6296-8805

Email: zomanbio@126.com

Http://www.zomanbio.com

实验室使用，仅用于科研

北京庄盟国际生物基因科技有限公司  
Beijing Zoman Biotechnology Co.,Ltd.

## ■ 试剂盒说明

蛋白印迹，也称Western，Western blot、Western blotting、Western印迹，简称WB，是用免疫学方法检测蛋白，研究。蛋白质的表达调控的重要方法之一。在蛋白质进行SDS-PAGE电泳后，利用我公司的Western Blotting 检测试剂盒可以完成转膜，膜的封闭，一抗孵育，二抗孵育的工作。另外在检测方面我们提供了ECL化学发光检测和HRP-DAB显色检测供您选择。

## ■ 试剂盒组份

组份	ZD320-01 (10次)	ZD320-02 (20次)	储存温度
PVDF膜 (6.5×7.0cm) 0.45um	10张	20张	RT
转移缓冲液 (20×)	500 mL	500 mL ×2	4℃
Tween 20	1.5 mL	3.0 mL	4℃
洗涤液 (10×)	500 mL	500 mL ×2	4℃
脱脂奶粉	10g	20g	4℃
BSA	6g	12g	4℃
丽春红染色液	60ml	120ml	4℃
<b>二抗 (三种供选择)</b>			
羊抗小鼠IgG-HRP (M)	20ul	40ul	-20℃
兔抗羊IgG-HRP(G)	20ul	40ul	-20℃
羊抗兔IgG-HRP(R)	20ul	40ul	-20℃
<b>ECL化学发光试剂 (E)</b>			
ECL A液	10 mL	20 mL	4℃
ECL B液	10 mL	20 mL	4℃
<b>HRP-DAB显色检测(D)</b>			
DAB-试剂A	1.5ml	3ml	-20℃
DAB-试剂B	30ml	60ml	4℃

## 备注：

备注1：转膜缓冲液配制：50ml转移缓冲液 (20×) + 200ml无水甲醇 + 750ml去离子水；

备注2：洗涤液的配制：30ml洗涤液 (10×) + 270ml去离子水 + 150ul Tween 20；

备注3：封闭液的配制：20ml洗涤液 + 1.0g脱脂奶粉 或 20ml洗涤液 + 0.6g BSA；

备注4：通常20KD以上的大分子蛋白用0.45um孔径的膜，小于20KD的话建议选择0.2um的。

## ■ 操作步骤

**客户自备的试剂：一抗，无水甲醇，磷酸蛋白的检测需自备BSA，X光片，显影液，定影液**

按常规方法完成SDS-PAGE后，配制转膜缓冲液（见备注1），然后把转膜缓冲液倒入小槽中备用。

### I 转膜

**1. PVDF膜及滤纸的预处理：**转膜前，裁剪与胶大小一致的PVDF膜泡入甲醇中，时间约为1min，小心取出膜放入蒸馏水中浸泡2min，然后把膜放置盛有转膜缓冲液的小槽中平衡15min，同时把已裁剪好的滤纸（与胶大小一致）和海绵也放入盛有转膜缓冲液的小槽中平衡15min。

### 2. 转膜：

#### a、干式电转印

将转印槽阴极平放工作台上，并在上面加三张经转膜缓冲液平衡好的1mm厚的滤纸，将经转膜缓冲液平衡好的PVDF膜放在滤纸上，再将凝胶平放在PVDF膜上，最后在凝胶上加盖三层经转膜缓冲液平衡好1mm厚的滤纸，接通电源，15V进行恒压转膜的时间根据蛋白分子量的大小而调整，分子量为40 - 100KD的蛋白转膜30-45min。

#### b、湿式电转印

打开电转夹，每侧垫上一块专用的转膜缓冲液平衡好的海面垫，再各放三块经转膜缓冲液平衡好的滤纸，滤纸与海面垫大小相同或与PVDF膜、凝胶大小相同均可，将凝胶平放在阴极侧滤纸上，最后将经转膜缓冲液平衡好PVDF膜平放在凝胶上，按照 (-) 夹板-海绵-滤纸-凝胶-PVDF膜-滤纸-海绵-夹板 (+) 装好，除尽气泡，夹好电转印夹。电泳槽（槽的一边放一块冰来降温）加满预冷的转膜缓冲液，插入电转印夹，连接好电极，接通电流，转印夹的PVDF膜应对电泳槽的正极，100v恒压进行转膜，转膜的时间根据蛋白分子量的大小而调整，分子量为40 - 100KD的蛋白转膜60min。

**注 (转膜的操作要点) :**

将夹子打开使黑的一面保持水平。在上面垫一张海绵垫,用玻棒来回擀几遍以擀走里面的气泡。(一手擀另一手要压住垫子使其不能随便移动。)在垫子上垫三层滤纸(可三张纸先叠在一起在垫于垫子上),一手固定滤纸一手用玻棒擀去其中的气泡。

要先将玻璃板撬掉才可剥胶,撬的时候动作要轻,要在两个边上轻轻的反复撬(可边撬边用流水缓缓冲洗)。撬一会儿玻璃板便开始松动,直到撬去玻板。(撬时一定要小心,胶很易裂,要用巧劲)除去小玻璃板后,将浓缩胶轻轻刮去(浓缩胶影响操作),要避免把分离胶刮破。小心剥下分离胶盖于滤纸上,用手调整使其与滤纸对齐,轻轻用玻棒擀去气泡。将膜盖于胶上,要盖满整个胶(膜盖下后不可再移动)并除气泡。在膜上盖3张滤纸并除去气泡。最后盖上另一个海绵垫,擀几下就可合起夹子。整个操作在转移液中进行,要不断的擀去气泡。膜两边的滤纸不能相互接触(接触后会发短路)。转移液含甲醇,操作时要戴手套,实验室要开门以使空气流通。

**转膜检测 (可选步骤)**

丽春红 (Ponceau S) 带负电荷,可以与带正电荷的氨基酸残基结合,也可以与蛋白的非极性区相结合,从而形成红色的条带,因此常用于PVDF膜、硝酸纤维素膜和醋酸纤维素膜上的蛋白印迹的检测。操作如下:

1. 将PVDF膜、硝酸纤维素膜或醋酸纤维素膜浸没在丽春红染色液中,振摇5-10分钟或更长时间,直至出现清晰条带,记录结果。

2. 弃去染液,将膜放入20ml漂洗液(蒸馏水、PBS或TBS)中,在室温下漂洗两次。去除丽春红染液,进行后续的WesternBlot检测。

● 一般情况下,两次漂洗即可,如果膜洗得不够,也可以用去离子水漂洗!

**II 膜的封闭**

转膜完毕后,立即把蛋白膜放置到预先准备好的洗涤液(见备注2)中,漂洗1~2分钟,以洗去膜上的转膜液。从转膜完毕起,以后所有的步骤均要注意膜的保湿,避免膜的干燥,否则极易产生较高的背景。用巴斯特吸管吸尽洗涤液,加入封闭液(见备注3),在摇床上缓慢摇动,室温封闭60分钟。如背景较高,可以在4°C 封闭过夜。在整个Western过程中可使用侧摆摇床,侧向摆动速度比较缓慢,而且也容易让溶液覆盖膜。

**III 一抗孵育**

参考一抗的说明书,按比例用封闭液稀释一抗。可用10×10cm杂交袋进行一抗孵育,所需一抗孵育约为1.0ml,室温或4°C在侧摆摇床上缓慢摇动孵育一小时。如果效果不佳,可以在4°C缓慢摇动孵育过夜。取出膜,加入洗涤液,在侧摆摇床上缓慢摇动洗涤10分钟。吸尽洗涤液后,再加入洗涤液,漂洗3~5次,每次0分钟。如果结果背景较高可以适当延长漂洗时间并增加漂洗次数。

**IV 二抗孵育**

根据一抗的类型,选择合适的二抗并参考二抗的说明书,按照适当比例用封闭液稀释辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗。可用10×10cm杂交袋进行二抗孵育,所需二抗孵育约为1.0ml,室温或4°C在侧摆摇床上缓慢摇动孵育一小时。加入洗涤液,在侧摆摇床上缓慢摇动洗涤10分钟。吸尽洗涤液后,再加入洗涤液,漂洗3~5次,每次10分钟。如果显色结果背景较高,可以适当延长洗涤时间并增加洗涤次数。

**V 检测****a、ECL化学发光检测****1、ECL工作液的配制**

取适量的 ECL-A和ECL-B等体积配成工作液,混合后即成为ECL工作液(ECL工作液应现配现用)。将膜片平铺,滴加ECL工作液使其将膜片完全覆盖(每平方米膜片至少使用0.1mL ECL工作液)。室温孵育2-3分钟。

**2、蛋白信号显现**

1. 用平头镊钳住膜片,垂直置于吸水纸以吸去过量ECL工作液。
2. 置膜片于二层保鲜膜之间,小心赶尽气泡。
3. 将膜片吸附蛋白面朝上,置于X光片盒中。
4. 于暗室中压上X光片。
5. 曝光30秒,显影之。
6. 根据实际荧光强度选择合适曝光时间。曝光完毕后,进行显影和定影,冲洗胶片。

**b、HRP-DAB显色检测**

在试管中依次加入DAB-试剂A 50μl, DAB-试剂B 1 mL 混匀即可,可按此比例放大配制量。配制好的溶液应

避光存放,30分钟内使用,染色结果为褐色。DAB有潜在致突变作用,操作时应注意穿戴好防护用品。

将膜片平铺,滴加约 3ml HRP-DAB显色工作液使其将膜片完全覆盖。室温下染色时间约5~30分钟,可根据颜色变化掌握染色时间(染色时间过长可能会导致背景加深)。

显色过程中需要避光,在显色后可拍照或扫描。显色后可用苏木精或甲基绿复染(Hematoxylinor methyigreen)。

**■ 常见问题的原因及推荐解决方案**

问题	可能原因	验证或解决办法
背景高	封闭不充分	延长封闭时间, 更换合适的封闭剂(脱脂奶粉, BSA, 血清等)
	一抗浓度过高	增加一抗稀释倍数,
	抗体孵育温度过高	4°C孵育
	二抗非特异性结合 或与封闭剂交叉反应	设置二抗对照(不加一抗),降低二抗浓度
	一抗或二抗与封闭剂 有交叉反应	在孵育和洗涤液中加入Tween-20以减少交叉反应.
	洗膜不充分	增加洗涤次数
	膜不合适	NC膜比PVDF膜背景低
	膜干燥	保证充分的反应液, 避免出现干膜现象
没有阳性条带或很弱	一抗、二抗等不匹配	订购试剂时认真选取一抗与组织种属, 一抗与二抗或/和底物与酶系统之间相匹配的抗体及底物。可通过设置内参可以验证二级检测系统的有效性。
	一抗或/和二抗浓度低	增加抗体浓度, 延长孵育时间
	封闭剂与一抗或二抗有交叉反应	封闭时使用温和的去污剂, 如TWEEN20, 或更换封闭剂(常用的脱脂奶、BSA、血清或明胶)
	一抗不识别目的物种的靶蛋白	检查说明书, 或做ClustalW比对, 设阳性对照
	样本中无靶蛋白或靶蛋白含量过低(抗原无效)	设置阳性对照, 如果阳性对照有结果, 但标本没有则可能是标本中不含靶蛋白或靶蛋白含量太低。后者可增加标本上样量至少每孔20-30ug蛋白, 样本制备时使用蛋白酶抑制剂, 或分级提取目的蛋白。

问题	可能原因	验证或解决办法
没有阳性条带或很弱	转膜不充分,或洗膜过度	使用丽春红S检测转膜效果,PVDF膜需浸透,需正确的转膜操作,勿过度洗膜
	过度封闭	使用含0.5%脱脂奶或无脱脂奶的抗体稀释液,或更换封闭剂,减少封闭时间
	一抗失效	使用有效期内抗体,分装保存,避免反复冻融取用,工作液现配现用
	二抗受叠氮钠抑制	所用溶液和容器中避免含有叠氮钠(HRP的抑制剂)
	酶和底物失效	直接将酶和底物进行混合,如果不显色则说明酶失活了。选择在有效期内、有活性的酶联物,使用新鲜的底物.
	曝光时间过短	延长曝光时间
	多非特异性条带或条带位置不对	细胞传代次数过多,使其蛋白表达模式的分化
体内表达的蛋白样本具有多种修饰形式:乙酰化、磷酸化、甲基化、烷基化、糖基化等		查文献,使用去修饰的试剂使蛋白恢复其正确的大小
蛋白样本降解		使用新鲜制备的标本,并使用蛋白酶抑制剂
新蛋白或同族蛋白的分享同种表位的不同剪接方式		查其它文献报导,或BLAST搜寻,使用说明书报导的细胞株或组织
一抗浓度过高		降低抗体浓度,可以减少非特异性条带
二抗浓度过高产生非特异性结合		降低抗体浓度,增加二抗对照选择特异性更强,只针对重链的二抗
抗体未纯化		使用单克隆或亲和纯化的抗体,减少非特异条带
蛋白存在二聚体或多聚体	SDS-PAGE电泳上样前,煮沸10 min,以增强蛋白质解聚变性	

问题	可能原因	验证或解决办法
背景有白色/黑色斑点	转膜时有气泡或抗体分布不均	尽量去除气泡, 抗体孵育时保持摇动
	抗体与封闭剂结合	过滤封闭剂
暗片现白条带	一抗或二抗加入过多	稀释抗体的浓度
目的条带过低/过高	SDS-PAGE胶浓度选择不合适	调整胶浓度, 分子量大的蛋白用低浓度胶, 分子量小的蛋白用高浓度胶
“微笑”条带	迁移过快 电泳温度过高	降低电泳速度, 低温电泳(冷室)
转膜不充分	膜没有完全均匀湿透	使用100% methanol浸透膜
	靶蛋白分子量小于10,000	选择小孔径的膜, 缩短转移时间
	靶蛋白等电点等于或接近转移缓冲液pH值	可尝试使用其他缓冲液如CAPS缓冲液(pH 10.5)或使用低pH值缓冲液如乙酸缓冲液
	甲醇浓度过高	过高甲醇浓度会导致蛋白质与SDS分离, 从而沉淀在凝胶中, 同时会使凝胶收缩或变硬, 从而抑制高分子量蛋白的转移。降低甲醇浓度或者使用乙醇或异丙醇代替
	转移时间不够Thick gel	对于厚的胶以及高分子量蛋白需要延长转移时间