

制胶 WB 套组

货号：BRK0052

规格：1 Kit



◆ 产品简介

Western blot 是一种常用于研究中分离和鉴定蛋白质的技术。它利用凝胶电泳来分离指定样品中包含的各种蛋白质，然后将分离的蛋白质转移到硝酸纤维 NC 或 PVDF 膜上，接下来将膜与对感目标蛋白质的特异抗体一起孵育。在洗膜过程中，未结合的抗体被洗掉，只留下与目标蛋白质结合的抗体，最后通过显影胶片或荧光扫描来检测结合的抗体。但是准备样本、制胶、电泳、转膜、封闭、孵育、显影各种流程十分繁琐，ABclonal 提供高效的蛋白电泳制胶 WB 套组方案，涵盖蛋白分析实验所需的裂解液、一步法制胶试剂盒、蛋白 Marker、电泳缓冲液、蛋白酶抑制剂、膜、转膜液、封闭液、发光液等产品。

◆ 产品特点

1. 一站式，即开即用，用户不需单独准备各种成分，十分方便。
2. 我们提供一步法彩色快速凝胶试剂盒套组，上样更方便，配胶快捷，高效兼容传统的电泳液和转膜液。
3. 本产品中的快速转膜液粉末可实现 20mins 免冰浴快速转膜。
4. 本产品中含有 20 片 6cm*9cm 硝酸纤维 NC 膜。
5. 本产品中的洗脱液需大约 15-20 分钟即可实现蛋白膜的重叠使用。
6. 本产品中发光液为超敏 ECL，可实现低飞克级 HRP 显影。

◆ 产品组成

组分编号	名称	规格 (1 Kit)
RM02999	RIPA Lysis Buffer (Medium)	100mL

RM02916	蛋白酶抑制剂 Cocktail (不含 EDTA, 100X DMSO 储液)	2*1mL
RM00001	SDS-PAGE Sample Loading Buffer (5*)	5*1mL
RM19001P	ColorMixed Protein Marker 180 (10-180 kDa) Plus {蛋白 marker}	4*250uL
BRK0003	One-Step Color Fast Gel Preparation Kit (10%) {一步法彩色快速凝胶试剂盒(10%)}	125T
BR00007	超快电泳缓冲液(Tris-甘氨酸 SDS 粉末)	30*500mL
RM00017	Nitrocellulose membrane (6×9cm)(0.45μm) {NC 膜(0.45μm)}	20pcs
BR00009	Ultra-Fast Transfer Buffer Powder {超快转膜缓冲液粉末}	10*500mL
RM02956	Rapid Blocking Buffer {快速封闭液(5*)}	100mL
BR00016	Western Blot Stripping buffer 抗体洗脱液 (WB 专用)	100mL
RM02867	ECL Super Kit {ECL 化学发光底物(超敏型)}	50mL+50mL

◆ 保存条件

各组分按包装标签温度储存，保质期见各组分包装。

◆ 注意事项

请收到货后，按照各组分温区分别存放

各实验具体操作步骤请参照套盒内各产品说明书，如有疑问请咨询当地销售或 ABclonal 技术支持

① 样本处理的注意事项

一般组织，请尽快处理足量的样本，

细胞样本，细胞量要求为 5×10^6 以上，对应至少一个 6 孔板的细胞量，

上清样本，需准备至少 20μL，1μg/μL 以上

全血样本，至少 1mL

1.以上样本量，使用 150μL 裂解液 (RM02999) 已足够，若细胞密度非常高可以适当加大裂解液的用量到 200μL 或 250 μL。每 100 万动物细胞用 100μL 本产品裂解后获得的上清，其蛋白浓度约为 2-4mg/mL，不同细胞有所不同。

2.每 20mg 冻存的小鼠肝脏组织用 200 μL 本裂解液裂解后获得的上清，其蛋白浓度约为 15-25mg/mL，不同状态的不同组织有所不同。

3.如果组织样品本身非常细小，可以适当剪切后直接加入裂解液裂解，通过强烈涡旋使样品裂解充分。然后同样离心取上清，用于后续实验。直接裂解的优点是比较方便，不必使用匀浆器或研磨设备，缺点是不如匀浆或研磨那样裂解比较充分。

②电泳的注意事项

制胶试剂盒组分为 A、B、C、D、PAGE 胶凝固剂 5 个组分，其中 A、B、C、D 液为 2-8℃保存，PAGE 胶凝固剂为-20℃

保存

样品制备

本试剂盒里 SDS-PAGE Sample Loading Buffer (RM00001) 含有还原剂组份, 经过 DTT 及巯基乙醇等处理的蛋白质 立体结构会发生变化, 有可能抗体不能很好的识别特定的位点, 就不能结合上去。 需要进行非还原凝胶电泳请单独使用 Naive Loading。

② 转膜前注意事项

转膜仪的选择

转膜仪分为半干转膜仪和湿电转膜仪。湿法转膜法转膜效率高且转膜均匀, 但使用的转膜液量多, 需边冷却边转膜, 转膜时间长。而半干转膜法转膜时间短, 只需要少量的转膜液。

③ 封闭前的注意事项

膜标记好正反面

转膜后为避免分不清膜的正反面。可在膜上稍微剪断一个角 (可自由决定剪断方向), 以判断膜正反面。

④ 洗涤时的注意事项

洗涤液的选择

一般使用 PBS 或 TBS 缓冲液。根据目的蛋白和检测试剂选择洗涤液。磷酸化蛋白质适合使用 TBS 缓冲液或含 Tween20 的 TBS 缓冲液。

⑤ 一抗反应时的注意事项

一抗的选择

抗体有识别 1 个抗原决定簇的单克隆抗体和识别多个抗原决定簇的多克隆抗体。另外有的抗体识别一级结构, 有的抗体识别立体结构, 后者不能与变性或还原的蛋白质结合。制备抗体时, 如果免疫原是变性蛋白, 那么制备的抗体只能与变性蛋白结合, 不能与天然蛋白质结合。

用于 Western Blotting 的一抗一般都有销售。购买抗体时要考虑以上几点, 选择抗体时, 对同一个抗原的不同类型抗体在产品数据上进行详细调查后再购买, 尽量使用特异性高的单克隆抗体, ABclonal 提供众多抗体选择, 抗体相关信息请访

问 ABclonal 官网。

反应方法

减少失败的最好方法是将高度稀释的低浓度抗体溶液添加到托盘中，放入膜后，2-8 °C 缓慢摇动过夜反应、如果抗体使用量有限建议限制使用杂交袋，使用杂交袋时要确保不能有气泡。

⑥二抗反应时的注意事项

二抗的选择

可从不同宿主获得的二抗，如果背景较高，使用另一种宿主的二抗可减少背景。还销售宿主以外的对动物种属来源血清蛋白进行吸收操作的抗体。确认动物种属后根据检测方法选择合适的抗体。

一般使用 HRP（辣根过氧化物酶）标记的二抗进行化学发光检测的方法。其它还有使用 AP（碱性磷酸酶）标记抗体（对发光物质进行检测）、荧光物质及放射性同位素标记的二抗。

⑦化学发光检测时的注意事项

按照各试剂的操作流程进行重复操作，研讨最佳实验条件。

- ★ 将转膜后的膜放置在保鲜膜上，将检测试剂滴加在膜上，确保试剂均匀覆盖在膜上。
- ★ 因目的蛋白的浓度和使用的抗体浓度不同，胶片曝光条件也不同，因此要进行预研讨实验。

在发光持续时间内可改变胶片曝光条件进行多次检测。