

## Western blot 通用试剂盒（兔）

货号：SWBT-001A/SWBT-001B

规格：36T

保质期：1 年

产品应用：本试剂盒针对一抗为兔来源的 Western blot 实验使用。

产品组分：



产品编号	产品名称	规格	储存温度
T1073	5×Tris-甘氨酸电泳缓冲液（粉剂）	500mL	RT
D1060	10×电泳转移缓冲液（转膜液）	100mL×2	RT
T1081	10×TBST 缓冲液	100mL×1	RT
P1040	5×蛋白上样缓冲液（含 DTT）	1mL×1	-20°C
PE0010	ECL Plus 超敏发光液	2×6mL×1	2-8°C
A8020	牛血清白蛋白 BSA-V	5g×1	2-8°C
D8340	Skim Milk 脱脂奶粉	5g×1	RT
PR1920	彩虹 245 广谱蛋白 Marker（11-245KD）	10T×1	-20°C
KTZ-134	羊抗兔 IgG-HRP	10μL×1	-20°C
IPVH00010 /SEQ00010	PVDF 膜（0.45μm）Millipore /PVDF 膜（0.22μm）Millipore	4.5cm*8cm×4	RT
	说明书	1 份	

\*货号 SWBT-001A 的试剂盒中只含有 PVDF 膜（0.45μm），建议用于分子量大于 20kDa 的蛋白质。

\*货号 SWBT-001B 的试剂盒中只含有 PVDF 膜（0.22μm），建议用于分子量小于 20kDa 的蛋白质。

**\*收到该试剂盒后，请核对各试剂组分并按照说明书所提供的储存温度进行保存。**

注意事项：

1. 本试剂盒仅用于科研，不能应用于临床。
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。



## 自备材料及试剂:

1. 适合目的蛋白的凝胶板;
2. 电泳仪, 电转仪, 抗体孵育及相关设备;
3. 高精度可调移液器 (已校准) 及吸头;
4. 兔源一抗;
5. 甲醇, 双蒸水;
6. 化学发光仪或相关仪器。

## 溶液配制:

1. 电泳工作液: 取出包装袋中全部粉剂溶于 400ml 的去离子水或蒸馏水中, 定容至 500ml, 即为 5×Tris-甘氨酸电泳缓冲液; 电泳前, 将 5×Tris-甘氨酸电泳缓冲液稀释 5 倍后使用。
2. 转膜工作液: 每瓶 10×电泳转移缓冲液 (转膜液) 100 mL, 加 200 mL 无水甲醇, 加入双蒸水, 定容至 1000 mL, 工作液 4°C 预冷保存。
3. 1×TBST 缓冲液: 取 10×TBST 缓冲液 100 mL, 加入双蒸水, 定容至 1000 mL, 室温暂存。
4. 封闭工作液: 根据需求选择配制 5% 脱脂奶粉或 5% BSA 缓冲液 (**二选一**), 取 5 g 脱脂奶粉/BSA, 加入 1×TBST 缓冲液, 定容至 100 mL, 溶解完全后暂存 4°C。

\*检测含有生物素或使用生物素标记的抗体时封闭液不宜用脱脂奶粉, 因为脱脂奶粉中含有生物素, 用 BSA 效果更好, 磷酸化抗体检测应使用 BSA 进行封闭。

## 操作步骤:

1. **样品制备:** 取组织或细胞裂解样本, 低温高速离心取上清, 测定蛋白浓度, 具体样本蛋白浓度可根据需求自行调整, 样本与 5×蛋白上样缓冲液以 4:1 体积混合, 混匀后于 100 度煮沸 10 min。
2. **上样:** 组织、细胞全蛋白样品上样量一般为 20-40 μg, 重组蛋白上样量一般为 10-200 ng, 蛋白 Marker 上样量为每孔 5 μL。
3. **电泳:** 使用电泳工作液, 80 V 电泳 20 min, 120 V 电泳至结束。电泳条件仅供参考, 可根据实际情况调整。
4. **转膜:** 将 PVDF 膜用甲醇激活 30 sec 以上, 置于转膜工作液中平衡 2 min 左右, 完成转膜“三明治结构”, 填充转膜工作液至电转槽内, 转膜过程中需保持低温。根据目的蛋白分子量确定湿转转膜条件, 可参考下表。

目的蛋白分子量	转膜电流	转膜时间
分子量≤20kDa	200mA	30-50min
20kDa<分子量≤100kDa	200mA	50-120min
100kDa<分子量≤200kDa	250mA	120-200min
分子量>200kDa	270mA	120-240min

5. **洗涤**：用 1×TBST 缓冲液洗 1 次，5 min。
6. **封闭**：将膜置于封闭工作液中，室温摇床上孵育 60 min。
7. **孵育一抗**：使用封闭工作液稀释一抗，2-8°C摇床上孵育过夜或室温孵育 2 小时（可参考一抗说明书确定一抗孵育条件）。
8. **洗涤**：用 1×TBST 缓冲液洗 3 次，每次 10 min。
9. **孵育二抗**：使用 1×TBST 缓冲液稀释羊抗兔 IgG-HRP（1: 5000），室温摇床上孵育 60 min。
10. **洗涤**：用 1×TBST 缓冲液洗 3 次，每次 10 min。
11. **显色和曝光**：取 ECL Plus 超敏发光液中 A 液和 B 液等体积混合，将混合后的液体铺满整张膜，进行曝光操作。

#### 相关辅助试剂：

产品编号	产品名称	规格
BC3710	全蛋白提取试剂盒（强）	50/100T
PC0020	BCA 蛋白浓度测定试剂盒	50T
P1200	SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒	25/50T
P1300	考马斯亮蓝快速染色液	500mL
P0012	10×丽春红	10mL
YA5230	WB 转膜海绵垫（免滤纸）	4*20 张/包
KTZ-001	抗体稀释液（即用型）	50mL



常见问题分析及解决方案:

问题	可能原因	参考解决方案
高背景	封闭时间短, 或抗体浓度高	适当增加封闭时间, 降低二抗浓度
	曝光时间过长	缩短曝光时间和与底物反应时间
	封闭液选择不当	查看抗体信息, 选择正确的封闭液
	膜上出现点状黑背景	过滤或充分溶解封闭液以及二抗
	洗涤不充分	按照操作流程充分洗涤, 适当增加洗涤次数
	膜干燥	PVDF 膜需处于湿润状态, 如干燥可使用甲醇重新激活
非特异性条带多	蛋白上样量过大	减少样品上样量
	抗体浓度过高	降低抗体浓度, 调整稀释比例
	一抗特异性不高	更换抗体
	底物显色与曝光时间过长	缩短底物显色以及曝光时间
	蛋白样本降解	使用新鲜蛋白样本, 提取蛋白时加入蛋白酶抑制剂
	蛋白剪切体	查找相关数据库或文献确定目的蛋白是否存在剪切体
	蛋白修饰	查找相关数据库或文献确定目的蛋白是否存在乙酰化, 磷酸化, 糖基化等多种修饰
	蛋白多聚体	增加蛋白质变性过程及强度, 电泳上样前, 煮沸 10min, 使蛋白解聚
无条带	抗体失效	查看抗体是否失效并验证其灵敏度
	一抗二抗不匹配	确保使用的是相匹配的一抗和二抗
	一抗/二抗浓度低	增加抗体浓度、延长孵育时间
	显色试剂失效	查看发光液或显色试剂是否失效
	蛋白降解	考染观察目的蛋白分子量条带, 参考内参抗体检测结果, 重新制备样品, 控制电泳和转膜的温度
	目的蛋白含量低	查询数据库或相关文献确定样本中目的蛋白表达丰度; 增加上样量; 裂解液中加入蛋白酶抑制剂
	转膜不充分	核对转膜装置和方向是否正确, 转膜后染色观察转膜效果
	洗膜过度	适当减少洗膜时间
	过度封闭	更换封闭液, 缩短封闭时间
	二抗标记的酶 (HRP) 失效	检查是否使用含有叠氮化钠的试剂或者容器