



Western Blot 检测试剂盒

产品货号: AR0040

产品名称: Western Blot 检测试剂盒

产品批号: 见包装标签

产品组份: 见表格

产品规格: 见表格

保存条件: 见表格

产品	规格	储存温度	保质期
RIPA 裂解液	5ml	4°C	一年
PMSF	50μl	-20°C	一年
磷酸酶抑制剂	50μl	-20°C	一年
BCA 蛋白浓度测定试剂盒	50T	室温	一年
ECL 发光检测液	15ml+15ml	4°C	一年
彩色预染 Marker(10-180KDa)	25μl	-20°C	一年
Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)-HRP	20μl	4°C	一年
Goat Anti-Mouse IgG(H+L)-HRP	20μl	4°C	一年
脱脂奶粉	15g	4°C	一年
5 × SDS-PAGE 上样缓冲液	1ml×2	-20°C	一年
PBS 缓冲液(10×)	125ml	室温	一年
TBS-T 缓冲液(10×)	125ml×2	室温	一年
电泳缓冲液(10×)	125ml×2	室温	一年
转膜缓冲液(10×)	125ml×2	室温	一年
PVDF 膜(6×8.5cm)	5 片 0.2μm+5 片 0.45μm	室温	一年
转膜滤纸(9×7.5cm)	30 片	室温	一年

未提供试剂: 甲醇

使用说明:

本试剂盒提供的产品可提供完成 5 块凝胶 (约 50 个样) 对应的 Western Blot 实验, 收到该试剂盒后, 请按照说明书所提供的保存条件进行保存。

上述列表中的物品如有损失和缺失, 请及时联系技术支持。本试剂盒只能应用于科研, 不能应用于临床。

实验操作指南:

蛋白样品的制备

1.样品的处理

取适当量的 RIPA 裂解液 (见附表), 放与 4°C 预冷, 使用前数分钟内加入 PMSF (见



附表)和磷酸酶抑制剂(见附表)。

组织样本处理:

手术切除的组织块迅速置于预冷的 PBS (见附表)中,漂洗数次,洗净组织血迹,用滤纸吸干组织表面液体,将组织切成几个较小的组织块。称量组织,按组织净重(g):裂解液(ml)=1:10的比例,加入相应体积的裂解液进行匀浆,匀浆器匀浆,肉眼观察无明显组织块,冰上孵育 30 分钟。10000g 离心 10 分钟,取上清,即为蛋白提取物。

细胞样本处理:

贴壁细胞,细胞刮刮下细胞,计数,并收集 5×10^6 个细胞,600g 离心 5 分钟,尽量吸尽上清,用预冷的 PBS (见附表)重悬细胞,600g 离心 5 分钟收集细胞,尽量吸尽上清,加入 0.5ml 的预冷的裂解液,用移液器吹打数下,冰上孵育 30 分钟,10000g 离心 10 分钟,取上清,即为蛋白提取物。

悬浮细胞,计数,并收集 5×10^6 个细胞,600g 离心 5 分钟,尽量吸尽上清,用预冷的 PBS (见附表)重悬细胞,600g 离心 5 分钟收集细胞,尽量吸尽上清,加入 0.5ml 的预冷的裂解液,用移液器吹打数下,冰上孵育 30 分钟,10000g 离心 10 分钟,取上清,即为蛋白提取物。

注:裂解产物中经常会出现一小团透明胶状物,属正常现象。该透明胶状物为含有基因组 DNA 的复合物,可以通过超声处理打碎打散该透明胶状物,随后离心取上清用于后续实验,超声条件:在 100-120W 的功率下,超声处理样本 1min,冰浴条件下进行,超声 2s,间隔 2s。

2. BCA 法测定蛋白浓度(参见附录中 BCA 蛋白浓度测定试剂盒使用说明)。

3. 用 PBS 调整蛋白浓度,加入 5×SDS-PAGE 上样缓冲液(使用说明参见附录)。

注:待测样本建议总蛋白上样量为 50μg,尽量保持单个待测样本上样体积为 10μl。

电泳

1. 根据靶蛋白的分子量大小配制不同浓度的凝胶(凝胶配制见附录)。每个泳道加入待测样本和蛋白 Marker (见附录),加入电泳缓冲液(见附录),开始电泳。

2. 80V 恒压电泳,待溴酚蓝跑到凝胶分界处,改为恒压 120V,跑完全程,电泳结束。

转膜

1. 根据靶蛋白的分子量选择不同孔径的 PVDF 膜(见附表),将 PVDF 膜置于甲醇中 15s 使其活化,将 PVDF 膜浸入水中 1-2min 以置换甲醇,将 PVDF 膜浸泡在转膜缓冲液(见附录)



中 5min 以置换水，同时将滤纸和纤维垫浸泡在转膜缓冲液中待用。

2.按照黑色板（负极）-纤维垫-滤纸-凝胶-膜-滤纸-纤维垫-白色板（正极）依次放好，排出气泡，夹紧后放入湿转电转槽内，根据靶蛋白分子量调整转膜条件。转膜过程在低温下进行。

注：此为湿转的参考步骤，如用其他转膜方法，请依据具体情况进行调整。

3.转膜完成后，小心取出 PVDF 膜，TBS-T 溶液（见附表）洗涤 3 次，每次 10min。

免疫印迹

1.用含 5%脱脂奶粉（见附表）的 TBS-T 溶液浸泡 PVDF 膜，室温封闭 1.5h，摇床摇晃。

2.用含 5%脱脂奶粉的 TBS-T 溶液按照说明书推荐的稀释比稀释相应的一抗，使 PVDF 膜浸泡于一抗孵育液中，4°C 孵育过夜，摇床摇晃。

3.TBS-T 溶液洗涤 PVDF 膜 3 次，每次 10min。

4.用含 5%脱脂奶粉的 TBS-T 溶液按照说明书推荐的稀释比稀释相应的二抗，室温孵育 1.5h，摇床摇晃。

5.TBS-T 溶液洗涤 PVDF 膜 3 次，每次 10min。

显色曝光

1.将 ECL 发光检测液中的 A 液和 B 液按 1:1 比例混匀。

2.PVDF 膜从 TBS-T 溶液洗液中取出后用滤纸吸干，均匀滴加 ECL 混合液与 PVDF 膜上，排出气泡，即可曝光。

3.调节仪器，多次曝光获取最佳图片效果。