

WB 试剂盒（适用于兔一抗）

WB Kit (Apply to Rabbit primary antibody)

包装规格：5 ASSAYS / 10 ASSAYS

产品简介

WB 试剂盒具有使用方便、操作简单、检测灵敏度高、背景低和系统稳定性强等多种优点。本试剂盒适用于宿主为兔的一抗实验系统。

产品特点

1. 操作简便：无需太多准备，拿到试剂盒即能开展试验。
2. 重现性好：实验结果重复性高。
3. 适用于 HRP 显色系统。

试剂盒组成成份

成份	D601016-0005, 5 次	D601016-0010, 10 次	储存温度
上样缓冲液 (5×)	500 µl	1 ml	常温 (18-25℃)
脱脂奶粉	8 g	16 g	常温 (18-25℃)
洗涤液原液 (20×)	30 ml	60 ml	常温 (18-25℃)
吐温-20	500 µl	1 ml	常温 (18-25℃)
Marker (10,15,25,35,55,70,100,130,250KD)	25 µl	50 µl	冷冻 (-20℃)
HRP 标记的二抗 (抗兔)	10 µl	20 µl	冷冻 (-20℃)
ECL 发光液 A	10 ml	20 ml	冷藏 (2-8℃)
ECL 发光液 B	30 µl	60 µl	冷藏 (2-8℃)

试剂准备

1. 制备样本：使用上样缓冲液 (5×) 时，加样体积是样本体积的 1/4，即总体积的 1/5。
2. TBST 洗涤液配制：现配现用，先将洗涤液原液 (20×) 稀释为 1×的洗涤液，即 19 ml 蒸馏水/双蒸水/去离子水+1 ml 洗涤液 (20×)。再用 10 ml 1×的洗涤液+5 µl 吐温-20
3. 封闭液：现配现用，10 ml 1×的 TBST+0.5 g 脱脂奶粉配制成 5%的封闭液。
4. 稀释一抗：现配现用，待封闭后洗涤时准备稀释一抗，按照一抗说明书的建议稀释，稀释液即 8 ml 的封闭液+需要稀释的一抗原液 (根据 8 ml 的总体积计算一抗原液的体积)。
5. 稀释二抗：现配现用，待一抗孵育后洗涤时准备稀释二抗，即 8 ml 的封闭液 +1 µl HRP 标记的二抗 (抗兔)。
6. ECL 工作液：现配现用，1 ml ECL 发光液 A+3 µl ECL 发光液 B。

需要但未提供的试剂

电泳缓冲液，转膜缓冲液，印迹膜 (PVDF 膜需要甲醇活化，NC 膜)，一抗

需要的仪器

电泳仪，转膜仪，摇床

运输和保存条件

本试剂盒 4°C 运输，各试剂按标签标注的储存温度保存。

操作步骤

1. 制样：根据上样量和样本浓度计算样本体积，加入适量的上样缓冲液（5×），放入沸水中煮 15 分钟。
2. 制胶：根据目的蛋白分子量不同配制不同浓度的分离胶（下层胶），以下仅供参考。分离胶凝固后再配制 5%的浓缩胶（上层胶）。

分离胶浓度	蛋白相对分子量
15%	<10 kDa
12%	10-30 kDa
8%	30-70 kDa
6%	>70 kDa

3. 电泳：加入电泳缓冲液，起始电压 80V，待溴酚蓝蓝色电泳至分离胶，约 30min，将电压调至 120V 待溴酚蓝蓝色到达分离胶底部。
4. 转膜：切除浓缩胶，将分离胶放置于转膜缓冲液中，事先准备好与胶大小相同的印迹膜和滤纸。印迹膜如果是 PVDF 膜需要在甲醇中活化 2 分钟，再转入转膜缓冲液中浸泡 10 分钟。滤纸直接放在转膜缓冲液中浸泡 10 分钟。一般湿转放置顺序：转膜夹黑色面(负极)-海绵垫-滤纸-胶-印迹膜-滤纸-海绵垫-红色面(正极)；半干转：负极-滤纸-胶-印迹膜-滤纸-正极。以 6×8cm 的膜为例，湿转恒流一般设置 150mA 每张膜，可根据分子量的大小调整转膜的时间，分子量大的转膜时间长一些，反之，时间短一些。转膜需在冰浴中进行。
5. 封闭：将膜从转膜仪中取出，放入封闭液中，37°C 封闭 1-2 小时。
6. 洗涤：弃去封闭液，加入 10ml 的 TBST，置摇床上洗涤 10 分钟。
7. 孵育一抗：弃去洗涤液，加入一抗稀释液，摇床上 4°C 孵育过夜或 37°C 孵育 1-2 小时。
8. 洗涤：次日，弃去一抗稀释液，加入 10ml 的 TBST，置摇床上洗涤 10 分钟，重复 2 次。
9. 孵育二抗：弃去洗涤液，加入二抗稀释液，摇床上室温或 37°C 孵育 40-60 分钟。
10. 洗涤：弃去二抗稀释液，加入 10ml 的 TBST，置摇床上洗涤 10 分钟，重复 2 次。
11. ECL 曝光：弃去洗涤液，每 1cm²膜加入 0.05 ml 的 ECL 工作液，避光 2 分钟，直接在机器中观察，或者暗房中经显影液、定影液曝光显色。

注意事项

1. 上样缓冲液（5×）在天气冷的时候很容易有固体析出，请在用之前放在沸水中煮 5min，混匀再用。
2. 电泳时间可根据目的蛋白分子量调整。如分子量较小（<20kDa），则溴酚蓝蓝色到达分离胶 2/3 处即可停止电泳。如分子量较大（>100 kDa），则溴酚蓝蓝色到底后可继续电泳，以 Marker 的分子量判断电泳的时间，可等 55kDa 分子量电泳至分离胶底部。
3. 转膜时注意每一层的叠加不要产生气泡，以免影响转膜效果。转膜的时间根据分子量大小调整。转膜的正负极不能放错，胶在负极，膜在正极。转膜一定在冰浴中进行，如果温度过高，胶容易变形影响转膜效果。