

通用型免疫印迹 (WB) 工具箱

Cat #: KTD106-CN

Size: 20 T

	通用型免疫印迹 (WB) 工具箱		
	货号: KTD106-CN		批号: 见产品标签
	应用: 动植物组织、细胞、细菌		
	保质期: 按各组分标签提示分开存储, 保质期 12 个月		

原理

免疫印迹又称蛋白质印迹 (Western blotting), 是根据抗原抗体的特异性结合检测复杂样品中某种蛋白的方法。由于免疫印迹具有 SDS-PAGE 的高分辨力和固相免疫测定的高特异性和敏感性, 现已成为蛋白分析的一种常规技术。基于传统的 WB 实验操作繁琐耗时、试剂用品种类繁多、背景高、实验结果稳定性差的痛点, Abbkine 开发出通用型免疫印迹 (WB) 工具箱, 经精心设计钻研, 该工具箱包含: ①经优化的裂解液, 可满足样本 WB 需求; ②操作便捷, 即用型试剂, 无需准备复杂试剂, 开盒即可开始实验; ③即用型 WB 阳性对照, 可直接上样, 以提供真正的 WB 实验参照; ④提供 SuperKine™ 超敏型 ECL 发光液 (飞克级), 高灵敏度的显色液, 提升免疫学实验的化学信号, 获得极佳的实验结果。

包装清单

试剂盒组分		规格 (20 T)	储存条件
Part 1 of 2	Lysis Buffer	2 mL	4 °C
	Running Buffer (10×)	100 mL	4 °C
	Transfer Buffer (10×)	100 mL	4 °C
	TBST (10×)	100 mL	4 °C
	BSA	3 g	4 °C
	PVDF Membrane (8.5 cm×6 cm)	2	RT
	SuperKine™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate A	4 mL	4 °C避光
	SuperKine™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate B	4 mL	4 °C
Part 2 of 2	WB Positive Control	40 µL	-20 °C
	Anti-GAPDH Mouse Monoclonal Antibody (2B5)	6 µL	-20 °C
	Colorcode Prestained Protein Marker (10-180 kDa)	5 µL	-20 °C
	HRP, Goat Anti-Mouse IgG	3 µL	-20 °C

	HRP, Goat Anti-Rabbit IgG	3 μ L	-20°C
	SDS-PAGE Loading Buffer (5 $\times$)	1 mL	-20°C

自备耗材

- 适合目的蛋白浓度的凝胶
- 甲醇
- 滤纸
- 一抗
- 电泳槽, 转膜仪
- 水浴锅或金属浴, 摇床

试剂准备

Lysis Buffer: 变性蛋白裂解液, 用于 WB 样本的提取, 即用型; 置于冰上待用; 4°C 保存。

1 $\times$ Running Buffer: 临用前配制, 用去离子水将 Running Buffer (10 $\times$) 稀释 10 倍得到 1 $\times$ Running Buffer, 4°C 保存。

1 $\times$ Transfer Buffer: 临用前配制, 取 100 mL 的 Transfer Buffer (10 $\times$), 加入 200 mL 无水甲醇混匀, 加入去离子水定容至 1 L, 4°C 保存。

1 $\times$ TBST: 临用前配制, 用去离子水将 TBST (10 $\times$) 稀释 10 倍得到 1 $\times$ TBST, 4°C 保存。

注意: Running Buffer (10 $\times$)、Transfer Buffer (10 $\times$) 和 TBST (10 $\times$) 浓度较高, 低温等原因会导致液体中晶体析出。建议 37°C 水浴使其溶解后再使用。

Blocking Buffer, Primary/Secondary Antibody Dilution Buffer: 临用前配制, 每 15 mL 1 $\times$ TBST+0.45 g BSA。

WB Positive Control: 即用型试剂, 作为 WB 实验中的动物阳性样本对照。

Anti-GAPDH Mouse Monoclonal Antibody (2B5): 广泛应用的内参蛋白 GAPDH 的单克隆抗体, 目的蛋白分子量为 37 kDa; 推荐稀释比例 1:5,000。

Colorcode Prestained Protein Marker (10-180 kDa): 彩色预染蛋白质 Marker (10-180 kDa) 包含 3 种颜色, 总计 10 条蛋白质标准品 (10, 17, 25, 33, 40, 53, 70, 95, 130, 180 kDa), 橘色条带为 70 kDa; 绿色条带为 10 kDa, 推荐上样量 2.5 μ L。

HRP, Goat Anti-Mouse IgG: 山羊抗小鼠 IgG 二抗, HRP 辣根过氧化物酶标记; 推荐稀释比例 1:10,000。

HRP, Goat Anti-Rabbit IgG: 山羊抗兔 IgG 二抗, HRP 辣根过氧化物酶标记; 推荐稀释比例 1:10,000。

SDS-PAGE Loading Buffer (5 $\times$): 即用型; -20°C 保存。

实验步骤

A. 蛋白样品的准备

1. 细胞蛋白提取:

(1) 细胞收集 (贴壁细胞: 10 cm 细胞培养皿中单层细胞长满 80%-90%, 吸除细胞培养液, PBS 洗涤 1 次; 悬浮细胞: 离心收集 0.5-1 $\times$ 10⁶ 个细胞, PBS 洗涤 1 次)。

(2) 加 50-100 μ L 预冷的 Lysis Buffer 到细胞中, 用移液枪反复吹打几次, 然后将细胞悬浮液转移到新的离心管中。

(3) 12,000 rpm, 4°C, 离心 3-5 min, 收集上清。

2. 组织蛋白提取:

(1) 称取 10 mg 组织, 加入 100 μ L Lysis Buffer, 匀浆器研磨。(若需要提高蛋白浓度, 可以适当减少 Lysis Buffer 用量)。

(2) 将匀浆液转移至新的离心管中, 冰上裂解 1-2 min。

(3) 12,000 rpm, 4°C, 离心 3-5 min, 收集上清。

3. 细菌蛋白提取:

(1) 12,000 rpm, 4°C, 离心 2 min 收集细菌, PBS 洗涤 1 次。

(2) 每 1 mL 菌液加 100 μ L Lysis Buffer 重悬细菌, 冰浴超声波破碎细菌 5 min (功率 20% 或 200 W, 超声 3 s, 间隔 7 s, 重复 30 次)。

(3) 12,000 rpm, 4°C, 离心 3-5 min, 收集上清。

4. 按照 SDS-PAGE Loading Buffer (5×): 蛋白样本=1: 4 的比例加入 SDS-PAGE Loading Buffer (5×), 混匀后煮沸 10 min。12,000 rpm, 4℃, 离心 5 min, 取适量体积上清上样。

注意: (1) 蛋白酶抑制剂不是必须加入, 但是如果下游实验需要较长时间或者蛋白提取后保存较长时间, 建议添加蛋白酶抑制剂。推荐使用 BCA 试剂盒用于蛋白浓度测定 (Abbkine 货号: KTD3001)。研究蛋白磷酸化, 磷酸酶抑制剂应在使用前加入 Lysis Buffer; (2) 若蛋白浓度较低, 可增加起始样本的量或减少 Lysis Buffer 的体积; (3) 若高分子量范围 (100-300 kDa) 蛋白条带弱, 可增加 Lysis Buffer 的体积, 确保样本裂解充分。

B. 制胶

根据靶蛋白的分子量大小, 配制不同浓度的分离胶 (下层胶), 分离胶凝固后再配制 5% 的浓缩胶 (上层胶), 以下仅供参考。

目的蛋白分子量	分离胶 (下层胶) 浓度
<10 kDa	15%
10-30 kDa	12%
30-70 kDa	8%
>70 kDa	6%

C. 电泳

在凝胶上样孔中加入样本和 Colorcode Prestained Protein Marker, 加入 1×Running Buffer, 90 V 电泳约 30 min 待溴酚蓝电泳至分离胶后, 调节电压 120 V 电泳至结束。

注意: 预制胶需要使用专用的电泳缓冲液, 不能使用本工具箱提供的 Running Buffer。

D. 转膜 (以湿转为例)

PVDF Membrane 在甲醇中浸泡 1-2 min 使其活化, 然后将 PVDF Membrane、滤纸和海绵垫浸泡于 1×Transfer Buffer 中。按照黑色板 (负极) -海绵垫-滤纸-凝胶-PVDF Membrane-滤纸-海绵垫-红色板 (正极) 制备三明治夹, 排出气泡, 夹紧后放入湿转电转槽内, 加入 1×Transfer Buffer。在冰浴条件下转膜, 根据目的蛋白分子量调整转膜条件。

E. 封闭

转膜完成后将 PVDF Membrane 拿出, 1×TBST 洗涤 1 min, 加入 15 mL Blocking Buffer, 室温摇床上孵育 1 h。

F. 洗涤

1×TBST 洗涤 PVDF Membrane 3 次, 每次 5 min。

G. 孵育一抗

按照说明书推荐稀释比稀释相应的抗体, 加入 15 mL 稀释后的一抗, 室温摇床上孵育 1-2 h 或 4℃孵育过夜。

H. 洗涤

1×TBST 洗涤 PVDF Membrane 3 次, 每次 5 min。

I. 孵育二抗

按照一抗种类选择合适的二抗, 加入 15 mL 稀释后的二抗, 室温摇床上孵育 1-2 h。

J. 洗涤

1×TBST 洗涤 PVDF Membrane 3 次, 每次 5 min。

K. 显影和曝光

(1) ECL 工作液配制: SuperKine™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate A 和 SuperKine™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate B 按照 1:1 的比例混合, 配制新鲜的工作液。

(2) 用镊子将 PVDF Membrane 夹起, 用滤纸吸干水分后将 PVDF Membrane 浸泡在 ECL 工作液中 1-2 min 即可, 使用 X 光胶片曝光或者化学发光成像仪拍照。

草莓时刻: 通用型免疫印迹 (WB) 工具箱可以便捷地检测蛋白质表达, 让您的实验结果更加符合实验文献发表标准。也可用其中单品 (KTD3003/BMM3001/BMU102-CN/A21010/A21020) 进行免疫印迹 (WB) 实验。扫描右侧二维码, 关注 Abbkine 公众号, 了解更多 Abbkine 产品信息。



结果展示



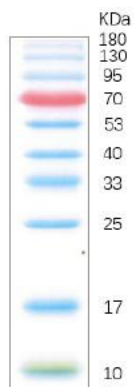


Figure 1. 15% Tris-glycine 体系，Colorcode Prestained Protein Marker (10-180 kDa)凝胶转膜后的图片，上样量为 5 μ L。

相关产品

货号	品名	推荐原因
KTD3003	SDS-PAGE蛋白上样缓冲液 (5 $\times$)	使用稳定性更好、还原效果更优、无难闻气味的还原剂
BMM3001	彩色预染蛋白质Marker (10-180 kDa)	包含3种颜色，总计10条蛋白质标准品 (10, 17, 25, 33, 40, 53, 70, 95, 130, 180 kDa)
BMU102-CN	SuperKine™ 超敏型ECL发光液 (飞克级)	高灵敏度的显色液提升免疫学实验的化学信号
A21010	HRP, Goat Anti-Mouse IgG	亲和纯化：使用固相偶联的小鼠免疫球蛋白IgG(H+L)轻链，蛋白纯度高达>95% (SDS-PAGE检测)
A21020	HRP, Goat Anti-Rabbit IgG	亲和纯化：使用固相偶联的兔免疫球蛋白IgG(H+L)轻链，蛋白纯度高达>95% (SDS-PAGE检测)

免责声明

本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。