



Welbox蛋白免疫印迹试剂盒

Welbox Kit for Western Blot

Catalog # AIWB-WB5/10

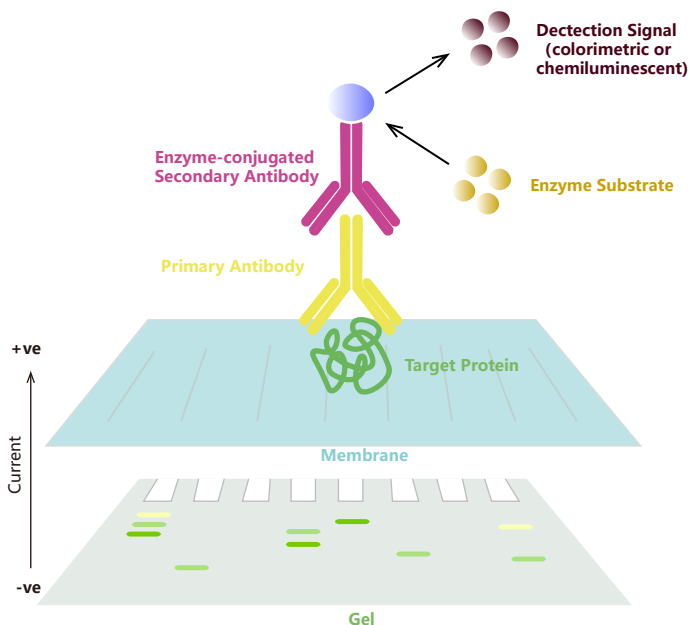
使用说明书



www.affinibody.com
Swiss Affinibody LifeScience

Version 2.2 V

目录 Contents



01 产品概述	02
02 产品品类	02
03 产品运输	02
04 适用范围	02
05 操作步骤	03
05-1 电泳	03
05-2 转膜	03
05-3 免疫印迹	04
05-4 ECL显色	05
06 常见问题及原因解析	05
06-1 背景高	05
06-2 信号弱或无信号	05
06-3 非特异性条带	06
06-4 条带变形 (微笑、拖尾、扭曲)	07

01 产品概述

蛋白免疫印迹 (Western Blot, WB)是生物学领域中最常见和最经典的实验技术之一，用于目的蛋白的检测，分析以及定量。首先，通过聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)，将蛋白质样品按照分子量大小分离，再转移到杂交膜 (Blot) 上，然后使用特异性一抗/二抗复合物对靶蛋白进行着色，通过分析着色的位置或深度，获得该蛋白质在细胞或组织中的表达情况。

WB检测试剂盒是一款快速，灵敏，高效的试剂盒，包含WB实验所需的预制胶，5×上样缓冲液，50×浓缩电泳液，TBST洗液，封闭液及发光液等，使用者只需额外准备蛋白样品和抗体，操作简便，新手友好，实验结果重复性高。此外，本试剂盒的体系已经过极致优化，相比于传统的WB，灵敏度能够达到皮克级别，背景低，且2-4 h内即可获得实验结果，提速达70%。

02 产品品类

AIWB	WB5	WB10	保质期
PNP Gel预制蛋白胶 (4-20%, 12-well)	5 pieces	10 pieces	12个月
50×TRIP Buffer	130 mL	260 mL	24个月
5×SDS Loading Buffer	1 mL	2 mL	长期有效
RTU-NC/PVDF膜 (配厚滤纸)	10 pieces	20 pieces	长期有效
MinuteBlock低背景快速封闭液	60 mL	120 mL	12个月
50×TBST Buffer	10 mL	20 mL	24个月
Robust ECL皮克级高敏发光液	1.5 mL×2	1.5 mL×4	12个月
曝光膜夹	5 pieces	10 pieces	长期有效

03 储存条件

本产品常温运输,常温储存。

04 适用范围

本试剂盒适用于蛋白免疫印迹实验。

05 操作步骤

05-1 电泳

- ① 小心剪开PNP Gel预制蛋白胶的包装，取出胶板，撕掉底部橙色胶纸，将预制胶固定在电泳槽中；
- ② 向24 g 50×TRIP Buffer浓缩液中加入1 L 超纯水，充分混匀后，将其加入电泳槽，没过加样孔，外槽与内槽液面的高度需保持一致，并将梳子平稳缓慢拔出；
- ③ 将蛋白样品与5×SDS Loading Buffer按照体积比4:1混合，在95-100°C水浴加热5min 变性，高速离心1min后上样，并预留一个泳道加入 5 μ L的预染蛋白 Marker；
- ④ 恒压300V，时间约10min，直接在室温下操作，不必使用冰浴。待溴酚蓝泳动到合适位置后，即可停止电泳；
- ⑤ 取出凝胶，使用起胶器或其他工具插入到胶板两侧之间的空隙中，慢慢地上下撬动上、中、下三个不同的位置，然后在另一侧重复操作，直至胶板两侧完全打开。然后掰开两板，可以用切胶板将凝胶多余的部分切掉。
- ⑥ 胶板打开后，用切胶板轻轻压住凝胶一侧，并用拇指按住凝胶，将胶板倾斜至水中，轻轻拨动凝胶，使凝胶自由掉落到装有水的器皿中，晃动清洗凝胶，然后取出进行后续的转膜实验。

 a. 固定预制胶时，请将加样孔的一面朝内，即带有梳子的一面朝内；

b. 配制电泳缓冲液时，若出现白色浑浊，说明所用水质重金属离子超标，微波加热即可澄清；

c. 上样前，可以使用移液枪吸取缓冲液，轻轻吹打，清洗加样孔，去除孔内残留的储存缓冲液和杂质；

d. 用移液器吸取样品后将枪头垂直插入到上样孔中即可上样。注意枪头不要戳破凝胶，也不要过度插入梳孔使胶板变形造成样品渗漏；

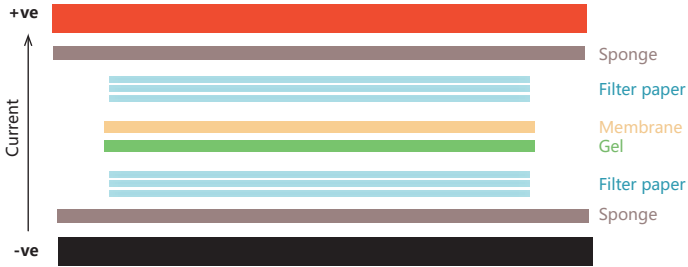
e. 若电压达不到300V，可选择恒压250V，时间延长至25-30 min；

f. 推荐配套使用三色预染蛋白marker (Cat#AIWB-010/010M/010B)，性质稳定，条带清晰，易于观察。

05-2 转膜

- ① 根据实验需要选择相应的膜（PVDF或NC），并配制相应的转膜缓冲液，配方可参考下方备注；

- ② 用电泳步骤⑥的方法轻轻将凝胶转移至转膜缓冲液中，同时将海绵，RTU-NC膜以及附赠的滤纸浸泡在转膜缓冲液中待用；
- ③ 按照顺序组装“三明治”：负极--海绵--滤纸3张--凝胶--NC膜--滤纸3张--海绵垫--正极（如下图）。需完全排出气泡，夹紧后放入湿转电转槽内；



- ④ 在室温下恒压120V，转膜15-20min；
- ⑤ 转膜结束后，用镊子小心取出NC膜，用灭菌水或者稀释好的TBST漂洗5min。（可使用免洗丽春红染色液（Cat#AIWB-013）染色确定大小分子转膜效率）

- ◆ a. 转膜缓冲液配方：800mL电泳缓冲液+200mL无水乙醇（NC膜）；700 mL电泳缓冲液+300 mL无水乙醇（PVDF膜）。请勿使用甲醇。添加无水乙醇后需充分混匀；
- b. PVDF膜需要提前在甲醇中浸泡1 min活化，并用转膜缓冲液清洗；
- c. 转膜时，如果起始电流小于330mA，可以适当调整电压使电流超过330mA，结束时的电流在500mA左右；如果仪器电流上限是400mA，则适当延长转膜时间5min左右或采用恒流400mA转膜20min。

05-3 免疫印迹

- ① 将膜置于孵育盒中，加入MinuteBlock封闭液直至没过膜，在室温下，将孵育盒置于摇床上封闭5-10min；
- ② 使用MinuteBlock封闭液按比例稀释一抗。对于高表达蛋白(内参级别的表达)，室温孵育1-2h，痕量蛋白则延长至2-4h即可；
- ③ 一抗孵育结束后，使用稀释好的TBST，先冲洗一遍，然后在摇床上充分漂洗三次，每次10 min；

④ 同样使用MinuteBlock封闭液按比例稀释二抗。将稀释好的二抗以及经过漂洗的膜置于孵育盒中，在摇床上室温培养45-60 min；

⑤ 二抗孵育结束后，使用稀释好的TBST，先冲洗一遍，然后在摇床上充分漂洗三次，每次10 min；

 a. 推荐使用跷跷板摇床进行孵育；

b. 回收的一抗可存放在4°C，于2-4周内使用，或者-20°C于2个月内使用，使用次数为3-5次。

05-4 ECL显色

① 将Robust ECL发光液中的A液和B液按 1:1比例混匀；

② 然后将漂洗好的膜吸干水分，置于曝光膜夹中间，加入适量（200-500 μL）混合好的显色液，尽量去除气泡，无需等待，即可进行信号检测。

06 常见问题及原因解析

06-1 背景高

问题	建议
抗体浓度过高，或者孵育时间过长	优化抗体孵育的浓度和时间
洗涤不充分	降低二抗的使用浓度，增加缓冲液体积以及洗涤次数
封闭不充分或者封闭液不合适	推荐配套使用本产品的封闭液，以达最佳效果
显影时间过长	缩短印迹膜的曝光时间
选择的膜容易产生高背景	一般NC膜的背景会比PVDF膜低
膜污染	操作过程中请勿用手触碰膜，保持膜的整洁
膜干燥	操作过程中要注意保持膜的湿润
缓冲液结块沉淀或污染	更换缓冲液
其他	带手套做实验，并保证实验仪器及用具干净无外援污染物

06-2 信号弱或无信号

问题	建议
蛋白转膜效率低	转膜结束后, 使用考马斯亮蓝来确定转膜效率 确保转膜时三明治夹层排布正确 低分子量的蛋白建议使用小孔径 (0.22 μm)的膜 确保按照说明书湿润膜, 勿使用甲醇 确保转膜过程中胶与膜充分接触
蛋白样品降解	提取蛋白时加入相应的蛋白酶抑制剂, 防止蛋白降解 建议加入蛋白上样缓冲液煮沸变性后, 将样本分装保存于 -80°C, 避免反复冻融 处理蛋白样本时请在冰上操作
抗体	调整抗体孵育浓度及时间 正确保存抗体, 避免反复冻融, 导致抗体失活 选择合适的针对一抗来源种属的抗体 选择抗体前认真阅读抗体说明书, 确定其能交叉识别并测 试种属的对应蛋白
过度转移	适当地调整转膜的时间和电流
过度洗膜	建议使用0.1%的弱去垢剂Tween-20, 洗膜时间不宜过久
曝光时间太短	适当延长胶片的曝光时间
底物孵育时间太短	适当延长底物孵育时间
样品中所表达的蛋白量过低	对表达量过低的蛋白进行富集后再进行实验; 适当延长曝光 时间

06-3 非特异性条带

问题	建议
蛋白存在二聚或者多聚体	SDS-PAGE电泳上样前充分煮沸, 以增强蛋白质解聚变性
目的蛋白有多个修饰位点, 可呈现多条带 (比如硝酸化位点, 糖基化位点, 乙酰化位点等)	查阅相关文献并进行生物学分析, 获得修饰位点信息, 通过修饰确定蛋白实际的分子量大小
上样量过高	适当减少上样量
一抗或者二抗浓度高	在满足敏感性的条件下, 适当减少抗体浓度
一抗特异性不高	重新选择或者制备高特异性的抗体
蛋白样品降解	处理样品时在冰上操作, 并加入蛋白酶抑制剂

06-4 条带变形（微笑、拖尾、扭曲）

问题	建议
上样量过多	适当调整上样量
样品中含不溶性颗粒	充分研磨组织后离心，并取澄澈的上清
封闭不充分或者封闭液不合适	推荐配套使用本产品的封闭液，以达最佳效果
凝胶制备不均匀	胶界面不平或歪斜，制胶时玻璃板一定要清洗干净，电泳时，电泳槽要水平放直
电泳系统温度偏高	降低电压，降低条带迁移速率；更换新的缓冲液，防止胶体过热
黑斑	封闭液颗粒残留，使用前应充分搅拌或则好使用溶解度更高的BSA
条带反白	抗体浓度过高或上样量过大；适当减少抗体的使用量，增加封闭时间以及漂洗时间



Swiss Affinibody LifeScience AG

网址: www.affinibody.com

邮箱: info@affinibody.com

电话: +41(0)763290285 +86 15902760422

