

Western Blotting

实验操作指南

提高实验效率!

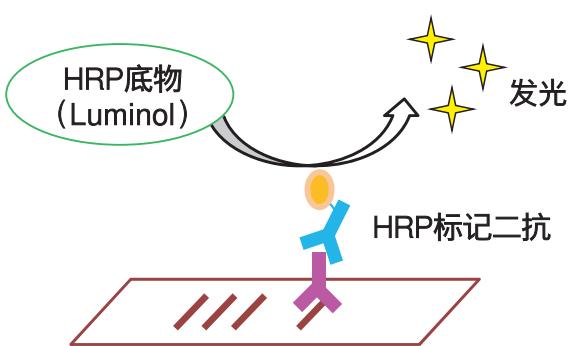
目录

Western Blotting检测的操作方法及注意事项

1. 电泳 (SDS-PAGE)
2. 转膜
3. 封闭
4. 一抗反应
5. 二抗反应
6. 检测 (化学发光法)

Troubleshooting

Western Blotting关联试剂



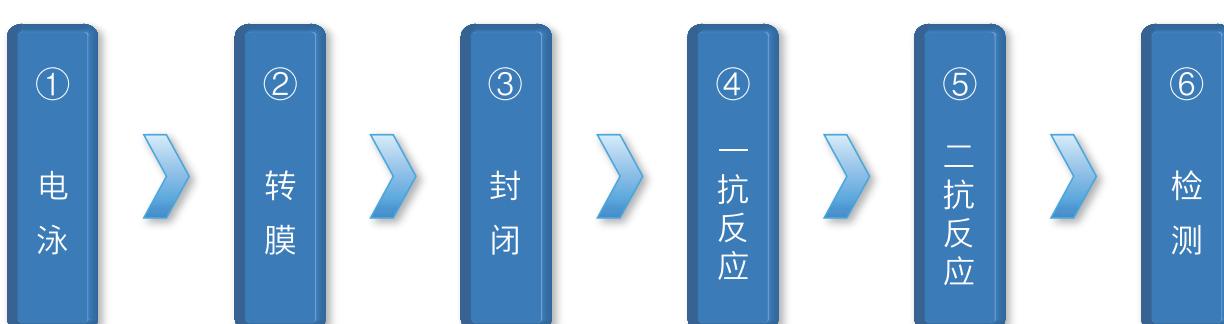
本手册旨在表明利用Western Blotting技术检测蛋白质时的操作要点。

Western Blotting技术是将蛋白质样品经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后，转移到固相载体（例如纤维素薄膜）上，利用抗原抗体反应来检测目的蛋白质的方法。如果整个实验过程中每一个实验步骤都能成功，就可以获得很好的实验结果。

本手册按照Western Blotting实验操作流程，对各步骤的操作方法和注意事项进行了通俗易懂的说明和介绍。

另外，本手册中的Troubleshooting（故障排除）可为您解决实验操作中遇到的各种问题。

【操作流程】



Western Blotting检测的操作方法和注意事项

① 电泳 (SDS-PAGE)

1.5 hr

凝胶电泳分为SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）、等电聚焦电泳、二维电泳。Western Blotting通常使用SDS-PAGE。

① 电泳前的注意事项

凝胶的选择

如果已知目的蛋白的分子量，选择的分离胶浓度应使蛋白的迁移位置在中央。如果是未知分子量的蛋白样品，使用梯度凝胶。

样品制备

通常将检测样品还原处理后再进行凝胶电泳，但经DTT及巯基乙醇等处理的蛋白立体结构会发生变化，有可能抗体不能很好的识别特定的位点，就不能结合上去。应同时对非还原处理的样品进行凝胶电泳。

分子量Marker的选择

为了确认转膜是否正确，应选择有色分子量Marker。但使用有色Marker时，蛋白会与色素结合，不适用于准确分子量的测定。估算分子量时请选择适合的Marker。

设立对照样品

为了验证凝胶电泳及转膜正常进行，检测样品应与阴性对照和阳性对照同时进行凝胶电泳和转膜。

设立比对样品

因转膜效率及检测体系不同，在不同膜上截留的蛋白会存在差异，应将比对样品和检测样品在同一个凝胶上进行电泳。

② 转膜

半干法 1.5 hr
湿法 过夜

蛋白质从SDS聚丙烯酰胺凝胶转移到膜上。
蛋白质的转膜一般使用电转移。

② 转膜前注意事项

转膜仪的选择

转膜仪分为半干转膜仪和湿电转膜仪。湿法转膜法转膜效率高且转膜均匀，但使用的电转液用量多，需边冷却边转膜，转膜时间长。而半干转膜法转膜时间短，只需要少量的电转液。因高分子量蛋白及碱性蛋白转膜效率低，适合使用湿电转膜仪。

膜的选择

常用的转移膜主要有PVDF膜（Polyvinylidene Fluoride）和硝酸纤维素膜。PVDF膜与目的蛋白的结合能力高，灵敏度高，不易破碎，同时也适用于再次标记（Reprobing）（PVDF膜使用前需浸泡在甲醇中以增加膜的亲水性）。而硝酸纤维素膜虽不需要浸泡但极易破碎。

③ 封闭

1.0 hr以上 or 过夜

为了防止蛋白质检测用抗体非特异性与膜结合，对未结合蛋白质的膜区域进行封闭很重要。

③ 封闭前的注意事项

膜标记正反面

转膜后有时会分不清膜的正反面。凝胶电泳时使用有色分子量Marker或转膜后在膜上稍微剪断一个角（可自由决定剪断方向），会有利于判断膜的方向。

封闭剂的选择

有时特定的封闭剂达不到预期的封闭效果。另外封闭时间过长会抑制抗原抗体反应及标记抗体的酶活性，应准备几种封闭剂进行点杂交预研讨实验选择合适的封闭剂。

★注意避免让膜变干。

洗涤

根据需要

Western Blotting操作过程中需洗膜，洗膜可除去未反应的试剂，抑制背景。

洗涤时的注意事项

洗涤液的选择

一般使用PBS或TBS缓冲液。根据目的蛋白质和检测试剂选择洗涤液。选择不含抑制HRP的叠氮化钠的洗涤液比较好。磷酸化蛋白质适合使用TBS缓冲液或含Tween 20的TBS缓冲液。

添加Tween 20

根据需要在洗涤液中添加Tween 20（终浓度为0.05%），洗涤液的用量能够浸没膜即可。

④ 一抗反应

1.0 hr以上 or 过夜

使用一抗进行目的蛋白质的检测。

洗涤

0.5 hr

④ 一抗反应时的注意事项

一抗的选择

抗体有识别1个抗原决定簇的单克隆抗体和识别多个抗原决定簇的多克隆抗体。另外有的抗体识别一级结构，有的抗体识别立体结构，后者不能与变性或还原的蛋白质结合。制备抗体时，如果免疫原是变性蛋白质，那么制备的抗体只能与变性蛋白质结合，不能与天然蛋白质结合。

用于Western Blotting的一抗一般都有销售。购买抗体时要考虑以上几点，选择抗体时，对同一个抗原的不同类型抗体在产品数据上进行详细调查后再购买，尽量使用特异性高的单克隆抗体。

反应方法

减少失败的最好方法是将高度稀释的低浓度抗体溶液添加到托盘中，放入膜后，4℃缓慢摇动过夜反应，如果抗体使用量有限制建议使用杂交袋，使用杂交袋时要确保不能有气泡。

⑤ 二抗反应

1.0 hr

使用二抗进行一抗的检测。二抗反应前应进行点杂交预实验，研讨二抗的正确使用量。

洗涤

0.5~1.0 hr

⑤ 二抗反应时的注意事项

二抗的选择

从不同宿主获得的二抗，如果背景较高，使用另一种宿主的二抗可减少背景。还有商品化的对动物种属来源血清蛋白进行吸附操作的抗体。确认动物种属后根据检测方法选择合适的抗体。

一般使用HRP（辣根过氧化物酶）标记二抗的方法进行化学发光检测。还可以使用AP（碱性磷酸酶）（对发光物质进行检测）、荧光物质及放射性同位素标记的二抗。

⑥ 检测 (化学发光/显色)

检测方法有化学发光法和显色法。显色法操作简便，但化学发光检测法检测灵敏度高，一般经常使用化学发光检测法。化学发光检测法是利用底物被二抗的HRP分解时生成的有色物对目的蛋白质的有无及蛋白质的量进行检测。

⑥ 化学发光检测时的注意事项

按照各试剂的操作流程进行重复操作，研讨最佳实验条件。

- ★ 将转膜后的膜放置在保鲜膜上，将检测试剂滴加在膜上，确保试剂均匀覆盖在膜上。
- ★ 因目的蛋白质的浓度和使用的抗体浓度不同，胶片曝光条件也不同，因此要进行预研讨实验。

在发光持续时间内可改变胶片曝光条件进行多次检测。

去除抗体 (stripping) 和重复检测 (reprobing)

使用专用缓冲液从膜上将一抗、二抗和检测试剂除去后可在同一膜上进行目的蛋白质和其它蛋白质的再次检测，可对检测条件及最佳检测条件进行研讨。

◆有污渍或斑点，整体背景普遍偏高

原 因	解决方法
洗膜不充分	<ul style="list-style-type: none"> 增加洗涤液量和洗涤次数。 使用含Tween 20的洗涤液，添加Tween 20使其终浓度为0.05%。 (注：Tween 20浓度过高，蛋白质会从膜上溶解分离)。
抗体浓度过高	<ul style="list-style-type: none"> 一抗、二抗浓度过高，会产生高背景。降低抗体浓度。
曝光时间过长	<ul style="list-style-type: none"> 缩短胶片曝光时间。
封闭不充分	<ul style="list-style-type: none"> 更换合适的封闭剂。检测系统不同所适用的封闭剂也不同。 提高封闭剂中的蛋白质浓度。 摸索最佳封闭时间和温度。至少在室温下封闭1小时以上或4℃过夜封闭。 在封闭液中添加Tween 20 (终浓度为0.05%)。
使用杂交袋进行抗体反应时，杂交袋内有残留气泡	<ul style="list-style-type: none"> 在密封杂交袋前确保完全除去气泡。不要一次完全密封，在密封处留出一小部分，可完全排除气泡。
封闭剂与一抗或二抗有交叉反应	<ul style="list-style-type: none"> 更换封闭剂。 因脱脂奶粉中含有生物素，不可用于生物素-亲和素检测系统的膜封闭。 进行与封闭剂的交叉反应实验。新的膜封闭后，使用实验中使用的抗体进行反应，再使用实验中使用的检测试剂（底物）进行检测。 降低二抗的浓度。
使用的封闭剂不适合	<ul style="list-style-type: none"> 研讨并更换不同的封闭剂。
HRP标记抗体发生凝集	<ul style="list-style-type: none"> HRP标记抗体发生凝集，会形成斑点。 使用0.2 μm滤器进行过滤。 使用新的、质量好的抗体。
使用的膜有问题	<ul style="list-style-type: none"> 按照生产厂家的操作流程进行操作，确保膜保持湿润。 使用新的膜。 防止膜干燥、操作过程中要确保膜充分浸泡在反应液中。 反应时要保持摇动。 使用膜时要小心，膜受损会产生背景。 不要直接用手取膜，取膜时请戴干净的手套或使用镊子。
实验器具有污染	<ul style="list-style-type: none"> 电泳槽、转膜仪及抗体反应时所使用的托盘要保持清洁，注意要防止异物混入。
缓冲液有污染	<ul style="list-style-type: none"> 制备新的缓冲液。 使用缓冲液前需过滤。

◆出现白色条带

抗体浓度过高	<ul style="list-style-type: none"> 降低抗体浓度，特别要降低HRP标记抗体的浓度。HRP量过多会出现白色条带。
--------	---

◆出现非特异性条带

抗体浓度过高	<ul style="list-style-type: none"> 降低抗体浓度。
SDS对蛋白质的非特异性吸附	<ul style="list-style-type: none"> 转膜后要洗涤膜。 免疫分析过程中避免使用SDS。

◆信号弱或无信号

 Western BLoT Immuno Booster (制品code T7111A) 可有效改善结果。

 Western BLoT Rapid Detect v2.0 (制品code T7122A) 可有效改善结果。

原 因	解决方法
蛋白质转膜不成功  	<ul style="list-style-type: none"> 转膜后，凝胶染色查看转膜效率。 (注：蛋白质染色后，有可能不能检测出少量的抗原。) 转膜时，注意要确保凝胶与膜完全接触。 注意转膜仪组装是否正确，确认电极的方向和凝胶与膜的放置顺序。 按照生产厂家的操作流程进行操作，确保膜保持湿润。 电转移过程中要避免转膜仪变热。 添加阳性对照或分子量Marker。 摸索最佳转膜时间和电流。 样品制备过程中要确保不要丢失样品的抗原性。 (一部分蛋白质在非还原条件下有时不能被电泳。)
目的蛋白质量较差  	<ul style="list-style-type: none"> 增加蛋白质电泳量。
抗体量不充分  	<ul style="list-style-type: none"> 有可能目的蛋白质对应的抗体亲和性较弱。提高抗体浓度。 抗体活性有可能下降。Dot blot试验确定抗体活性。
标记抗体失活	<ul style="list-style-type: none"> 使用不含有叠氮化钠的抗体。叠氮化钠抑制HRP活性。
发光底物劣化	<ul style="list-style-type: none"> 调查底物活性。可以少量调制working solution，暗室内加入少量HRP标识抗体观察是否有蓝光出现。如果没有蓝光出现，说明底物或HRP标识抗体已经劣化。 注意装有试剂的瓶子不要出现污染。保存的底物试剂与其他试剂混合，也有可能导致底物劣化。
进行了stripping和reprobing	<ul style="list-style-type: none"> 进行stripping时，有可能导致目的蛋白质剥落或变性。优化洗膜方法。 只在必要时进行reprobing。 尽量避免在同一张膜上进行重新标记。
封闭后目的蛋白质被屏蔽	<ul style="list-style-type: none"> 研讨其他种类的blocking buffer。 优化blocking buffer的蛋白质浓度。
发光底物反应时间过短	<ul style="list-style-type: none"> 优化发光底物反应时间。 调查基础试剂活性。
曝光时间过短	<ul style="list-style-type: none"> 延长曝光时间。
膜上的蛋白质分解	<ul style="list-style-type: none"> Blocking用试剂的成分可能含有蛋白酶活性（例：明胶）。

◆膜上部分无信号

转膜不完全	<ul style="list-style-type: none"> 转膜时，注意要确保凝胶与膜完全接触。不要有气泡。 按照生产厂家的操作流程进行操作，确保膜保持湿润。 不能徒手操作，一定戴干净的手套，使用镊子操作。 使用新的膜。 为了使膜在温育过程中不相互重叠，多个膜要分开温育，样品制备过程中要确保不要丢失样品的抗原性。
-------	---

◆条带扩散

抗体浓度过高	<ul style="list-style-type: none"> 下调抗体浓度。
电泳用的蛋白质上样量过高	<ul style="list-style-type: none"> 减少电泳的蛋白质上样量。

Western Blotting用试剂<1>

① 电泳 (SDS-PAGE)

■分子量Marker

制品名称	包装量	制品code
CLEARLY Protein Ladder (Unstained)	500 μl	3453A
CLEARLY Stained Protein Ladder	500 μl	3454A
Premixed Protein Marker(Low)	500 μl	3595A
Premixed Protein Marker(High)	500 μl	3596A
Premixed Protein Marker(Broad)	500 μl	3597A

■电泳Buffer Tris-Glycine Buffer(即用型粉剂)

制品名称	Buffer 配置量	包装量	制品code
Tris-Glycine Buffer (TG) Powder, PH8.3	1包溶解于蒸馏水后配成1 L的TG Buffer。 终浓度: 25 mM Tris、192 mM Glycine	10 Pouches (for 10L)	T9102
Tris-Glycine-SDS Buffer (TG-SDS) Powder, pH8.3	1包溶解于蒸馏水后配成1 L的TG-SDS Buffer。 终浓度: 25 mM Tris、192 mM Glycine、0.1%SDS	10 Pouches (for 10L)	T9101

② 转膜

- 膜 (PVDF、硝酸纤维素膜)
- 转膜buffer

③ 封闭

■Blocking Buffer除脱脂奶粉、BSA以外，还建议使用以下制品

◆ 使用鱼来源明胶作为封闭剂

即用型 (ready-to-use)

与脱脂奶粉、BSA等动物来源封闭试剂相比，鱼来源明胶与动物来源抗体的非特异性交叉反应非常低，可进行清晰的检测。

制品名称	包装量	制品code
Western BLoT Blocking Buffer(Fish Gelatin)	1 L	T7131A

◆ 全部组份为化学成分的无蛋白质封闭剂

即用型 (ready-to-use)

- 抑制非特异性信号
- 比一般使用的脱脂奶粉检测灵敏度高
- 除检测一般样品外，也可有效检测磷酸化蛋白质

制品名称	包装量	制品code
Western BLoT Blocking Buffer(Protein free)	500 ml	T7132A

Western Blotting用试剂<2>

④ 一抗反应

洗涤

- 各种一次抗体、HRP标记二次抗体

请查询本公司官方网站!

⑤ 二抗反应

洗涤

■ 预混型洗涤Buffer (片剂)

制品名称	Buffer配置量	包装量	制品code
Phosphate Buffered Saline with Tween 20(PBS-T) Tablets, pH7.4	1 tablet溶解于蒸馏水后配成1 L的PBS-T	100 tablets	T9183
Tris Buffered Saline with Tween 20(TBS-T) Tablets, pH7.6	1 tablet溶解于蒸馏水后配成500 ml的TBS-T	100 tablets	T9142

推荐试剂-1 抗原抗体反应促进剂

满足这些需求

- 即使使用少量抗体也可有效进行抗体反应
- 信号弱或无信号，想提高信号强度

Western BLoT Immuno Booster/ Immuno Booster PF

抗体反应时使用
可提高检测灵敏度!

- 使用Immuno Booster作为抗体稀释液，相比于一般方法，可将检测灵敏度提高几倍至几十倍。

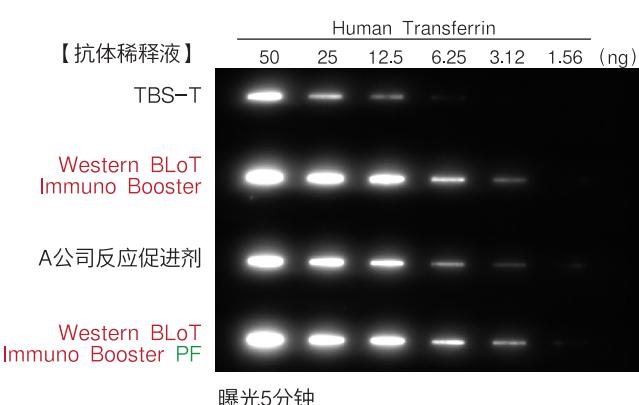
制品名称	最适封闭条件	包装量	制品code
Western BLoT Immuno Booster	无特殊条件	各 250 ml	T7111A
Western BLoT Immuno Booster PF	无蛋白质★	250 ml	T7115A

★ Western BLoT Immuno Booster PF是完全化学成分的无蛋白质的促进抗原抗体反应的试剂。无蛋白质条件时的专用试剂，建议封闭剂也使用无蛋白质的封闭剂。



无蛋白质试剂适用于磷酸化蛋白质、特殊蛋白质的检测，及防止试剂来源的蛋白质混入到反应体系中。

使用Immuno Booster 可提高检测灵敏度



封闭剂:

Western BLoT Blocking Buffer (Protein Free)
(制品code: T7132A)

一抗:

Goat anti-Human Transferrin affinity purified
(终浓度: 0.5 μg/ml)

二抗:

Affinity Purified Antibody Peroxidase Label
Rabbit anti-Goat IgG(H+L)

底物:

Western BLoT Chemiluminescence HRP Substrate
(制品code: T7101A)

洗涤液: TBS-T

(数据来源于Takara Bio Inc.)

Western Blotting用试剂<3>



推荐试剂-2 快速、高灵敏度检测试剂

满足这些需求

- ✓ 想在短时间内有效进行抗体反应
- ✓ 想节省准备各动物种属HRP标记二抗的时间
- ✓ 信号弱或无信号，想提高信号强度

Western Blot Rapid Detect v2.0

替代HRP标记二抗，
可快速、高灵敏度检测！

- 有转膜后1小时内可完成检测的快速Rapid操作流程，还有提高检测灵敏度的操作流程。
- 以Rapid Detect代替HRP标记二抗对多种一抗同时检测，不需要准备不同动物种属的HRP标记二抗。

制品名称	包装量	制品code
Western Blot Rapid Detect v2.0	50 次	T7122A

* 对Human IgG3和Goat IgG型一抗检测时，不能用作二抗替代物，但与二抗联合使用可增强检测信号。

⑥ 化学发光检出用HRP基质

■ Western Blot HRP Substrate系列

【可使用的膜】PVDF、硝酸纤维素膜

【检出】Chemiluminescence：X光底片

Quant、Hyper、Ultra Sensitive：CCD camera、X光底片

制品名称	特点	包装量	制品code
Western Blot Chemiluminescence HRP Substrate	与其他公司同类产品相比，信号更清晰。 【检出界限】pg级	7 ml	T7101Q
		250 ml (※1)	T7101A
		500 ml (A×2)	T7101B
Western Blot Quant HRP Substrate	可长时间持续稳定发光。 高敏感度的定量性。 【检出界限】低pg级	7 ml	T7102Q
		100 ml (※2)	T7102A
		200 ml (A×2)	T7102B
Western Blot Hyper HRP Substrate	即使少量抗体也能很好检出。 【检出界限】中fg级	7 ml	T7103Q
		100 ml (※2)	T7103A
		200 ml (A×2)	T7103B
Western Blot Ultra Sensitive HRP Substrate	本系列中灵敏度最高。 【检出界限】低fg级	20 ml	T7104Q
		100 ml (※2)	T7104A
		200 ml (A×2)	T7104B

※1: 2种溶液各125 ml混合后调成反应液(250 ml) → 可检出面积约2,500 cm²的膜。

※2: 2种溶液各50 ml混合后调成反应液(100 ml) → 可检出面积约1,000 cm²的膜。

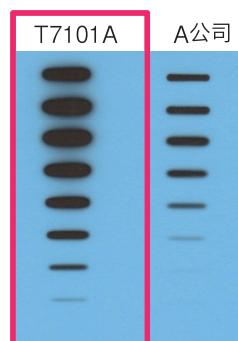
清晰的发光信号

Western Blot Chemiluminescence HRP Substrate (制品code: T7101A) 与其他公司同类HRP底物产品相比较，使用不同量的HRP标记二抗进行检测(39~5,000 pg)，结果见右图。

- 抗体：Goat Anti-Mouse IgG (H+L) Peroxidase conjugated
- 膜：硝酸纤维素膜

★ 使用Western Blot Chemiluminescence HRP Substrate，可检出非常清晰的信号。

(曝光时间5秒、使用X光底片：Takara Bio Inc.比较结果)



Western Blotting用试剂<4>



Western BLoT Rapid Detect v2.0 (Code No.T7122A) 的详细介绍

Western BLoT Rapid Detect v2.0 是以HRP标记IgG Detector作为标记二抗，是检测一抗的Western Blotting 专用检测试剂。本制品的主要组份是IgG Detector，一个粒子表面固定约100个蛋白分子，能与抗体的Fc片段相结合，并标记上了约50个HRP分子。

利用这种特别设计的HRP标记“颗粒”，Western BLoT Rapid Detect v2.0实现了一般Western Blotting法难以实现的快速、高灵敏度和多种一抗的同时检测。

◆ IgG Detector替代HRP标记二抗可缩短实验时间！

同传统制品相比，使用本产品处理更简便、检测灵敏度更高。

■迅速

- 转膜后1小时即可完成检测（Rapid操作流程、参照右图）

	一般方法	Rapid操作流程
① 封闭	60分	5分钟
② 一抗反应	60分	30分钟
③ 洗涤	30分	不需要
④ 二抗反应	60分	不需要
⑤ 洗涤	30分	25分钟
⑥ 检出	检测用底物	HRP检测用底物
①~⑤所需时间	240分钟	60分钟

■使用方法简便

- 一抗反应时仅需将本试剂和一抗混合（Rapid操作流程）
- 无需使用各动物种属的HRP标记二抗

■除Rapid操作流程外，还提供提高检测灵敏度的其他操作流程

- 2 step高灵敏度操作流程（参照下面的使用例）
- 增强二抗检测灵敏度的操作流程
- 重复检测增强检测灵敏度的操作流程

HeLa细胞裂解液中的β-actin和GAPDH检测(2 step 高灵敏度操作流程)



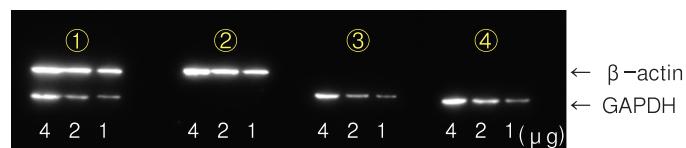
【方法】 以HeLa细胞裂解液为检测样品进行电泳和PVDF转膜后、使用Western BLoT Blocking Buffer (Protein Free) (Code No. T7132A) 进行了封闭。一抗反应时，使用小鼠抗β-actin抗体、小鼠抗GAPDH抗体反应1小时，然后再使用本试剂或二抗反应1小时。

- ① 抗β-actin抗体+抗GAPDH抗体 → 本试剂 ② 抗β-actin抗体 → 本试剂 ③ 抗GAPDH抗体 → 本试剂
④ 抗GAPDH抗体 → HRP标记二次抗体

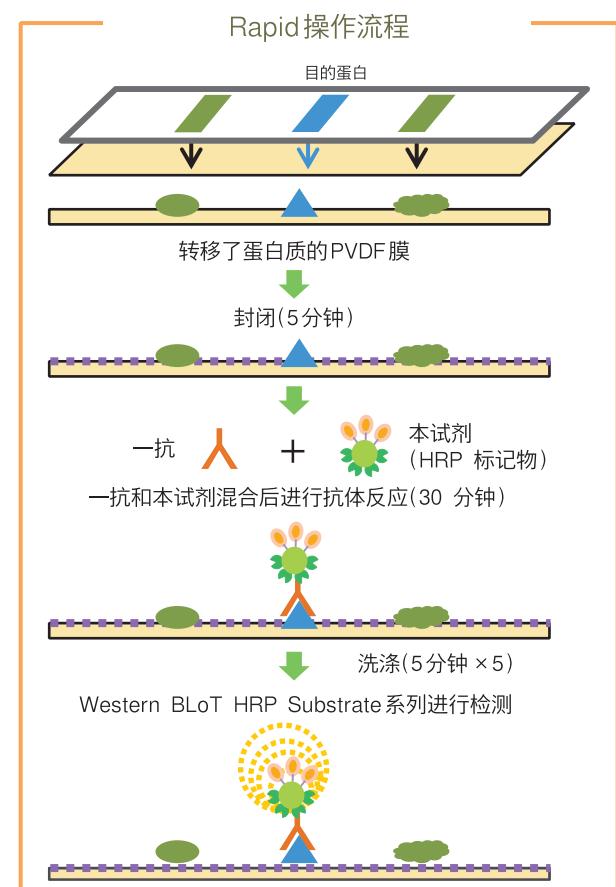
检测时使用Western BLoT Chemiluminescence HRP Substrate (Code No.T7101A) 在CCD相机上曝光5分钟

【结果】

- 从①②③可以看出 → 即使同时检测多种抗原，也与检测1种抗原的检测结果相同。
- 从③④可以看出 → 使用本试剂的检测结果与使用二抗的一般Western Blotting的检测结果相同。



试剂中含有
的IgG Detector



Wester Blotting用试剂<5>

◆ Stripping Buffer

什么是Stripping Buffer?

是指能从膜上除去一抗和二抗但不影响膜上结合的待测蛋白质的试剂。

Stripping后可在同一张膜上进行目的蛋白质和其它蛋白质的再次检测, 可对适宜检测条件进行研讨。

Western BLoT Stripping Buffer

Ready-to-use

- Western BLoT后用于洗去膜上的一抗和二抗的buffer
- 可在温和条件下洗膜

在温和的条件下（室温、30分钟）进行反应，可减轻对膜上固定的抗原蛋白质的影响。

制品名称	包装量	制品code
Western BLoT Stripping Buffer	500 ml	T7135A

BCA法定量 TaKaRa BCA Protein Assay Kit

性价比高！

- 针对不同种类蛋白质, 测定值变动很小, 可在20~2,000 μg/ml宽广的范围内获得良好线性关系。
- 不受界面活性剂或各种Buffer影响。
(~5% Triton X-100、~5% SDS、~4M Guanidine-HCl等) ※详情请参考网站。
- 2种测定方法。
 - 标准方法 (1 ml反应体系/200 μl反应体系) : 定量范围 50~2,000 μg/ml
 - 低浓度测定方法 (1 ml反应体系/200 μl反应体系) : 定量范围 ~50 μg/ml

制品名称	包装量	制品code
TaKaRa BCA Protein Assay Kit	500 次 (1 ml反应体系) 2500 次 (200 μl微量反应体系)	T9300A

Bradford法定量 TaKaRa Bradford Protein Assay Kit

性价比高！

- 操作简单迅速, 可在1~1,000 μg/ml的范围内进行定量。
- 不受还原剂影响。
(~100 mM DTT、~1M Glucose、~1M 2-ME等) ※详情请参考网站。
- 2种测定方法。
 - 标准方法 (1 ml反应体系/200 μl反应体系) : 定量范围 25~1,000 μg/ml
 - 低浓度测定方法 (1 ml反应体系/200 μl反应体系) : 定量范围 1~25 μg/ml

制品名称	包装量	制品code
TaKaRa Bradford Protein Assay Kit	500 次 (1 ml反应体系) 2500 次 (200 μl微量反应体系)	T9310A

Western Blotting 实验Note

实验memo (实验题目、样品名称、试剂用量等):

1. 电泳	1-1. 电泳					
	· 凝胶浓度 (%)					
	· 电泳buffer ()	Lot No.	制造日期 ()			
	· 电泳条件: 电流恒定 (mA) 或电压恒定 (V)					
	时间 (:) ~ (:)					
	<在进行电泳的同时准备转移步骤的相关试剂>					
	· 制备转移buffer Buffer ()	Lot No. ()				
	· 膜 (使用PVDF膜, 需在甲醇中浸润20~30秒, 然后用转移buffer替换。)					
	· 使用转移buffer浸润滤纸					
	· 准备封闭剂 封闭剂 ()	Lot No.	()			
2. 转印 (半干法)	2-1. 电泳结束后马上将凝胶从胶板上取下, 使用转移buffer进行平衡化					
	振荡10分钟 (:) ~ (:)					
	2-2. 将转移buffer浸润后的凝胶、滤纸和膜安装到转印仪器上, 注意不要产生气泡					
	阴极 (-) → 滤纸 → 凝胶 → 膜 → 滤纸 → 阳极 (+)					
	2-3. 接通电源开始转印					
	电流恒定 (mA) 或电压恒定 (V)					
	时间 (:) ~ (:)					
3. 封闭	2-4. 断开电源, 用镊子将膜取下					
	· 在膜上做标记以便于辨别膜的正反面及方向					
	3-1. 将膜置于封闭buffer中振荡1小时					
	时间 (:) ~ (:)					
	* 如果不马上进行抗体反应, 可将膜浸没在封闭buffer中4℃振荡过夜。					
	<在封闭的同时准备一抗>					
4. 一抗反应	· 一抗使用封闭buffer稀释					
	抗体 ()	Lot No.	稀释倍数 ()			
	· 制备洗涤buffer 种类 ()	Lot No.	()			
	4-1. 将膜置于稀释的一抗溶液中, 振荡反应 (室温1小时或4℃ 过夜)					
	时间 (:) ~ (:)					
5. 二抗反应	4-2. 将膜移至洗涤buffer中放置5分钟以上, 更换buffer洗涤5次					
	<一抗反应的同时准备二抗>					
	· 二抗使用封闭buffer稀释					
6. 检出 (化学发光法)	抗体 ()	Lot No.	稀释倍数 ()			
	5-1. 将膜置于稀释的二抗溶液中, 室温振荡1小时					
	时间 (:) ~ (:)					
	5-2. 将膜移至洗涤buffer中放置5分钟以上, 更换buffer清洗5次					
7. 获得检测结果	请按照所用试剂的说明书进行操作					
	· 检测试剂 ()					
	★ 如果使用Western Blot系列发光底物 (TaKaRa Bio制品), 请按下列描述操作					
	6-1. 制备Working Solution(Luminol/Enhancer Solution 和 Peroxide Reagent 等量混合)					
	6-2. 去除膜上多余的buffer, 使用Working Solution均匀的覆盖整个膜					
	6-3. 室温静置2分钟					
	6-4. 去除多余的Working Solution, 使用新鲜的保鲜膜将膜包裹好					

- 本宣传页上登载的制品，都是以科研为目的。请不要用于其它方面，如：不要用于人、动物的临床诊断和治疗。
也不能用于食品、化妆品及家庭用品等方面。
- 未经本公司许可，严禁产品的转售·转让、以转售·转让为目的的产品更改、以及用于商品的制造。
- 专利许可信息请在本公司网站上确认：<http://www.takarabiomed.com.cn/>。
- 本宣传页上登载的公司名称及制品名称即使没有特殊标注，使用的也是各公司的商标或注册商标。
- 本宣传页上记载的产品信息是2019年9月1日的信息，最新信息请参考公司官网

关注Takara微信和微博，
好礼常常有！



Takara微博



Takara微信



Takara官网



Clontech **Takara** cellartis

销售商：

宝日医生物技术（北京）有限公司

Takara Biomedical Technology (Beijing) Co., Ltd.

地址：北京市昌平区科学园路22号（中关村生命科学园内）

电话：010-80720985, 80720986

制造商：

宝生物工程（大连）有限公司

Takara Biotechnology (Dalian) Co., Ltd.

地址：辽宁省大连市经济技术开发区东北二街19号

电话：0411-87621671

技术咨询热线：4006518761, 4006518769