

## Western blotting DAB 检测试剂盒

### 货号:

- AC17114 Western blotting (小鼠 IgG)DAB 显色试剂盒
- AC17115 Western blotting (兔 IgG)DAB 显色试剂盒
- AC17116 Western blotting (山羊 IgG)DAB 显色试剂盒
- AC17117 Western blotting(小鼠/兔 IgG)DAB 显色试剂盒

### 产品内容:

- 1. 封闭试剂 30g。
- 2. 10 倍浓缩抗体稀释液 50ml。
- 3. HRP 标记二抗 0.1ml, 效价 1: 5000-10000。
- 4. 20 倍 DAB 浓缩显色液 5ml A+5ml B。

### 保存:

-20℃避光密闭保存, 一年有效。若经常使用, 可将封闭试剂, 抗体稀释液和 20 倍 DAB 显色液 B 存放于 2-8℃以方便使用。

### 产品简介:

SDS-PAGE电泳后, 蛋白质按照分子量大小分离, 转移到固相载体(例如硝酸纤维素薄膜)后, 固相载体以非共价键形式吸附蛋白质, 以固相载体上的蛋白质或多肽作为抗原, 与对应的抗体起免疫反应, 再与酶标记的第二抗体起反应, 经过底物显色以检测电泳分离的特异性的蛋白。

### 操作步骤: (仅供参考)

常规电泳转膜后:

- 1) 清洗转印膜: 将膜剥离下后, 作好标记, 一般在左上角剪一缺口。室温用 TBS-T 漂洗 3 次每次 5min, 以尽量洗去转印膜上的 SDS, 防止影响后面的抗体结合。
- 2) 按 5g 封闭试剂加 100ml 双蒸水计, 配制膜封闭液, 配好的膜封闭液为乳白色悬液, 将漂洗过的转印膜, 封闭液内, 摇床震动, 室温封闭 30min。用 TBS-T, PH7.6 洗液, 室温漂洗 3 次每次 5min。
- 3) 将 10×抗体稀释液用双蒸水稀释成 1× (10ml 10×抗体稀释液加入 90ml 双蒸水, 混匀, 可 4℃保存三个月)。此稀释液可作为一抗和二抗的稀释液。
- 4) 用 1×的抗体稀释液稀释抗体。根据用量以及一抗的推荐稀释浓度来稀释一抗。将杂交膜放入杂交袋中, 加入一抗工作液, 封口, 4℃孵育过夜或 37℃摇动孵育 2h。此用过的抗体一般可回收第二天再使用一次。注: 如果所加一抗不同, 可在此步将膜沿电泳方向剪成条, 分别作好标记, 分开孵育。
- 5) 用 TBS-T, PH7.6 洗液, 室温漂洗 3 次每次 5min。
- 6) 用稀释好的抗体稀释液稀释抗体。根据用量, 按 10ml 抗体稀释液加入 1-2ul HRP 标记二抗的比例, 配制二抗工作液。将杂交膜放入杂交袋中, 加入二抗工作液, 封口, 37℃摇动孵育 1h。此用过的抗体一般可回收第二天再使用一次。

7) 用 TBS-T , PH7.6 洗液, 室温漂洗 3 次每次 10min。

8) 配制 DAB 显色: 根据用量, 取 TBS-T 4ml, 加入 DAB 显色液 A、DAB 显色液 B 各 200ul, 混匀, 加在膜正面, 室温下显色。在目标条带显出后, 而且背景未出时, 放入水中终止显色。

#### **注意事项:**

1. 请根据一抗来源选择试剂盒。

2. western blotting DAB 显色法操作简单, 但其敏感性与 ECL 发光发有一定的差距, 一般只适用于丰度较高的蛋白。

3. 可以根据显色结果来优化实验反应时间。如背景过深, 可延长膜封闭时间, 加长最终漂洗次数与时间。如果条带过弱, 可延长抗体孵育时间。

4. 如果完全没有条带, 请检查前期蛋白处理及实验过程, 如果确认无误, 反复两次依旧无结果, 请换用 ECL 发光法显色。

5. TBS-T (0.01M) 配制方法: 称取 NaCl 8.5g , Tris 1.21g , 用 800ml 的双蒸水溶解, 用盐酸调 PH 到 7.6, 再加入 0.5ml Tween-20, 用双蒸水 加至 1000ml, 混匀即可。(也可按照自己的配制习惯来配制)