



蛋白印迹 (WB) 通用试剂盒

(生物素/亲和素-HRP/TMB)

产品编号: 4034-1 抗兔, 4034-2 抗鼠, 4034-3 抗大鼠

将亲和层析纯化的具有高度特异性的抗体标记辣根过氧化物酶 (HRP), 配合沉淀性 TMB 底物, 可以在膜上建立蛋白质的显色分析方法, 用已知抗体分析固定在膜上的蛋白质或用已知固定在膜上的蛋白质分析单克隆抗体或血清中的抗体。

首先将蛋白样品通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 再转移到膜上, 或者直接点到膜上, 然后将膜顺序与一抗、酶标二抗反应, 对目标抗原 (或抗体) 进行特异性检测, 通过观察显色条带判断结果。

TMB 蛋白印迹试剂盒包括亲和层析纯化的二抗 (抗鼠或抗兔的免疫球蛋白), 二抗标记生物素, 亲和素标记上辣根过氧化物酶 (HRP), 二者以浓缩状态保存在稳定剂中, 使用前稀释。沉淀性 TMB 底物为即用型, 直接使用, 可在 HRP 作用下形成沉淀性蓝色产物, 易于观察, 灵敏度高。

1. 试剂盒组份

- 1.1 浓缩封闭液 (5×浓缩) 120ml×2 瓶
- 1.2 浓缩洗涤液(20×浓缩) 100ml×3 瓶
- 1.3 TMB 显色液 (沉淀性) 100ml×2 瓶
- 1.4 生物素标记二抗: 1.5.1 山羊抗兔 IgG(H+L) 1ml 或 1.5.2 山羊抗鼠 IgG(H+L) 1ml
- 1.5 亲和素-HRP 0.1mg/ml, 1ml

试剂足够用于 2500 cm² 膜 (约 44 张 8 cm×7 cm 膜), 试剂在 2~8°C 储存稳定至少 1 年。

2. 实验需要但试剂盒不提供的材料或设备

- 2.1 兔或小鼠一抗
- 2.2 硝酸纤维素膜、PVDF 膜或尼龙膜
- 2.3 用于试剂孵育的反应平皿或反应盒
- 2.4 水平摇床或振荡器
- 2.5 手套
- 2.6 考马斯亮蓝染液
- 2.7 丽春红或氨基黑染液
- 2.8 蛋白质分子量标准
- 2.9 聚丙烯酰胺凝胶
- 2.10 电泳设备

3. 注意事项

3.1 使用试剂盒之前务必仔细阅读说明书

3.2 实验过程中穿戴手套和实验服, 既可保护操作者自身安全, 亦可防止膜或试剂被操作者皮肤的油脂和蛋白质污染。

3.3 谨慎处理聚丙烯酰胺凝胶, 丙烯酰胺单体有神经毒性。

3.4 为了能够正确分析实验结果, 应该在实验中包括阳性对照、阴性对照、空白对照以及蛋白质标准等。

3.5 应用此试剂盒之前, 目标蛋白首先必须固定在膜上, 硝酸纤维素膜、PVDF 膜和尼龙膜都适合本试剂。



4. 工作缓冲液的准备

4.1 1×封闭液 – 每日现配

4.1.1. 根据需要的量配制相应体积的 1×封闭液，称取 1% w/v 封闭蛋白粉(每 100ml 1×封闭液中加入 1g 封闭蛋白粉)，如果封闭液不是每天现配，可能会降低灵敏度和增加本底。

4.1.2. 将封闭蛋白粉倒入三角瓶中，加入相当于准备配制的 1×封闭液体积的 4/5 的水加入三角瓶中，震荡使之完全溶解（配制 100ml 1X 封闭液需要加入 80ml 水）

4.1.3. 蛋白粉在溶液中溶解后，加入相当于准备配制的 1×封闭液体积的 1/5 的 5×封闭液

例如：100 mL of 1×封闭液，封闭蛋白粉 1.0 g，蒸馏水 80 mL，5×封闭液 20 mL。确保蛋白粉完全溶解，蛋白粉的量可以增加以降低本底，但是过度使用封闭蛋白粉会降低敏感度。

4.2 1×洗涤液

将 20X 洗涤浓缩液用蒸馏水进行 20 倍稀释(例如 5 mL 浓缩洗液 + 95 mL 蒸馏水)

5. 蛋白印迹流程（总时间 4 小时）

聚丙烯酰胺凝胶电泳→将蛋白固定在膜上→封闭膜(1 小时或过夜)→与一抗孵育(1 小时)→洗涤膜(3 x 5 分钟)→与酶标二抗孵育(1 小时)→洗涤膜 (3 x 5 分钟)→与 TMB 底物孵育 (5~15 分钟)→终止反应 (1~2 分钟)

6. 操作步骤

6.1 聚丙烯酰胺凝胶电泳和转移电泳

6.1.1. 将样品稀释到合适的浓度，100°C 煮 3 分钟，然后上样。

6.1.2. 开始电泳，电泳条件参照电泳设备制造商的建议条件，根据所用胶进行调整。

6.1.3. 电泳的同时，在转移缓冲液中浸湿纤维垫、滤纸和转移膜。硝酸纤维素膜和尼龙膜都可以直接用转移缓冲液处理，PVDF 膜需要先用无水甲醇润湿，然后浸到转移缓冲液中。

6.1.4. 电泳后，在胶底的右角以帮助正确标记胶在转移设备中的方向。

6.1.5. 根据设备制造商的说明安装转移盒，确保转移后胶的定向，使泳道在膜上以需要的顺序排列。

6.1.6. 根据设备制造商的说明进行转移电泳，高浓度胶和大分子量的蛋白需要更长的时间转移成功，通过实验确定最佳转移时间。

6.1.7. 可选项：转移后用考马斯亮蓝染胶以确定转移效率，在胶上存在染色蛋白表示没达到最佳转移条件，可以使用预染标准以监控转移效率。

6.1.8. 可选项：用丽春红染色膜蛋白，室温 10 分钟并摇动。染液没过膜。将膜从染液中取出，在蒸馏水中润洗去除多余染液，背景褪色后，蛋白带显现。此时不再继续润洗以免特异性蛋白染色带褪色。也可以用氨基黑染色，氨基黑是一种永久性染料，用氨基黑时，要用甲醇/乙酸溶液脱色。

6.1.9. 可选项：将特定的道切下以作为对照，染色的蛋白标准，染色的未知蛋白可以在膜上切下，空气干燥，可以作为与免疫检测对比分析蛋白成分。

6.2 检测前的膜准备

6.2.1 检测前，标记蛋白标本在膜上的位置。

6.2.2 膜此时可以剪成条，或者在封闭后再切成条。

6.3 蛋白印迹实验

6.3.1. 将膜浸入 1X 封闭液进行封闭，液体量 0.18 mL/cm² 膜室温封闭 1 小时，轻轻震动或摇动，2~8°C 静置过夜。

6.3.2. 将膜与一抗或血清标本孵育至少 1 小时，抗体用 1X 封闭液稀释。首先应该通过



倍比稀释确定工作浓度。一抗室温封闭一小时通常足够。

6.3.3. 用 1X 洗涤液洗膜，每遍用洗液量 0.27 mL/cm² 洗 3 次每次 5 分钟。

6.3.4. 将酶标记物 1/1,000 用新鲜配制的 1X 封闭液稀释，0.18 mL/cm²（例如：1 uL 酶标物 + 999 uL 稀释液，不同的反应系统用量可能不一样，通过滴定确定最佳工作浓度。

6.3.5. 室温孵育酶标物工作液 1 小时。

6.3.6. 重复步骤 3。

6.3.7. 加 TMB 底物，0.05 mL/cm²，室温孵育 5~15 分钟。

6.3.8. 显色到合适的深度后，将膜进入蒸馏水中 1~2 分钟终止反应。

6.3.9. 晾干膜，为永久保存记录，立即照相（用塑料密封，可减少褪色）。

7.可能出现的问题和解决办法

7.1 无颜色

7.1.1. 排除酶失活：取 10 uL 稀释的酶标物加入到 1ml 底物中，确认是否有酶活性。

7.1.2. 检查酶标二抗是否正确，即特异性是否针对一抗的动物来源。

7.1.3. 用蛋白染色未封闭的膜，确定目标蛋白是否在膜上。

7.1.4. 检查膜的标记位置，是否在膜的样品面反应。

7.1.5. 确认没有使用叠氮钠，叠氮钠抑制 HRP 活性。

7.2 颜色弱

7.2.1. 抗体用量不足，优化抗体浓度。蛋白质通过 SDS-PAGE 后与一抗的亲合力发生变化。

7.2.2. 上样的蛋白量太少，增加电泳胶上样量。

7.2.3. 抗体与目标蛋白反应不充分，与一抗和酶标二抗的孵育时间延长。

7.2.4. 过度洗涤，确认是否严格按照操作规程。

7.3 信号过强或背景过高

7.3.1. 抗体浓度过高，优化抗体使用浓度，进一步稀释一抗和酶标二抗。

7.3.2. 缩短底物和酶标二抗的孵育时间。

7.3.3. 封闭或洗涤不充分，引起非特异性染色，延长封闭时间。

7.3.4. 蛋白上样量过大，减少样品在电泳胶上的上样量。

7.3.5. 标本中有内源性过氧化物酶。将 TMB 直接加到封闭的膜上，如果产生颜色，使用含 3% H₂O₂ 的无水甲醇以去除内源性过氧化物酶活性。

7.4 条带或斑点模糊

7.4.1 蛋白转膜不佳，按照设备生产商的建议操作

7.4.2 膜处理不正确，某些膜需要特殊处理，检查膜的正确处理方法。