

## Western blotting ECL 化学发光法检测试剂盒说明书

- AC17118 Western blotting (小鼠 IgG) ECL 化学发光法显色试剂盒
- AC17119 Western blotting (兔 IgG) ECL 化学发光法显色试剂盒
- AC17120 Western blotting (山羊 IgG) ECL 化学发光法显色试剂盒
- AC17121 Western blotting(小鼠/兔 IgG) ECL 化学发光法显色试剂盒
- AC17122 Western blotting(人 IgG) ECL 化学发光法显色试剂盒

### 产品内容:

1. 封闭试剂: 30g(可配制 600ml)。
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. ECL 显色液, 25ml A+25ml 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 ECL 显色液存放于 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, 加入发光底物后, 能让胶片感光。经显影和定影后, 可以在胶片上显示出条带(抗原所在位置)。

### 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, 将漂洗过的转印膜放入封闭液内, 置摇床孵育, 室温封闭 30min。用 TBS-T 缓冲液 (PH7.6) 洗膜, 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×的抗体稀释液稀释一抗。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 缓冲液 (PH7.6) 洗膜, 室温漂洗 3 次每次 5min。
- 6) 用 1×的抗体稀释液稀释二抗。根据用量, 按 10ml 抗体稀释液加入 1-2 ul 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 缓冲液 (PH7.6) 洗膜, 室温漂洗 3 次每次 10min。
- 8) 根据用量, 取 ECL 发光液 A、B 等量混匀, 加在膜正面, 暗室显色 1-5 分钟。倾去显色液, 小心用纸吸去显色

液，在上面盖一层平整的透明纸。再取出感光胶片，做好标记，轻轻的放在膜上，显色 30 秒到 1 分钟，取出胶片浸入显影液中，观察显色情况，再放入定影液中 1 分钟。根据条带强弱，再次感光时可减短或者加长感光时间（从 5 秒到 30 分钟）以期达到理想结果。

**注意事项：**

1. 请根据一抗来源选择试剂盒。
2. 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，可增加抗体浓度，可延长抗体孵育时间或加长感光时间。
3. TBS-T (0.01M, PH7.6) 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）