

M5 One Step Western Kit HRP (Rabbit)

使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 One Step Western Kit HRP (Rabbit)	50T	MF410-05

【储存条件】

2-8°C保存，避免冷冻

【产品组分】

Blocking Buffer	500 ml
Antibody Pretreat Solution (HRP/Rabbit)	5x1ml
Dilution Buffer	500 ml
Wash Buffer (10×)	500 ml

【产品简介】

一步法快速 WB 试剂盒（兔）是 Western Blot 检测试剂盒，能够在 1 小时左右得到高质量的 Western Blot 结果，且操作简便、检测灵敏度高、背景低、不需再加入二抗、系统稳定性强。常规的 Western Blot 间接法检测过程（封闭、一抗结合和二抗结合）需要较长的时间，实验流程复杂且需要多步条件优化。胶上的蛋白转移到载体膜上后，使用试剂盒中的封闭液孵育 5 min，再用抗体反应液处理后的一抗孵育载体膜，经洗涤三次（每次 5 min）后，即可进行发光或显色检测。本试剂盒针对目的蛋白一抗为兔来源的实验系统使用。

【注意事项】

1. 客户需自己准备兔来源的一抗。
2. 使用 Blocking Buffer 封闭液、Antibody Pretreat Solution (HRP/Rabbit) 抗体反应液（兔）、Wash Buffer (10×) 漂洗液之前请充分混匀。
3. 漂洗液如在 2-8°C 保存时出现沉淀，请恢复到室温，把沉淀溶解后正常使用，1×漂洗液可在室温保存一个月。
4. 建议转膜完成后用丽春红等试剂染色，并把膜上多余部分剪去以增加试剂的使用效率。
5. 一抗和抗体反应液 HRP（兔）需要通过预实验来确定最佳的稀释用量。
6. 抗体反应液 HRP（兔）、抗体稀释液和抗体用量可根据膜的大小按比例放大或减少。
7. 加入一抗的抗体稀释液可以回收重复使用一次。特异性及亲和力低的抗体不建议重复使用。回收后抗体如在 1-2 天内使用放置在 2-8°C，长期保存请在 -20°C 冻存，避免多次反复冻融。
8. 如果存在较高背景的情况，请调整抗体的用量，并增加洗膜次数。
9. 试剂盒内所有试剂请于 2-8°C 保存，避免冻融。

【使用方法】

本产品适用于转膜完成后的封闭及抗体孵育步骤，以 5 cm×8 cm 膜为例：

1. 漂洗液准备：取 10 ml Wash Buffer (10×) 用蒸馏水稀释至 100 ml，即为 1×WashBuffer，待用。每次洗膜用 8-10 ml。
2. 封闭：转膜完成后，将膜浸没到 10 ml Blocking Buffer 中，室温封闭 5 分钟。

3. 漂洗：倒掉封闭液，加入 8-10 ml 1×Wash Buffer，于摇床上用较大速度漂洗 1 分钟。
 4. 洗膜的同时可准备抗体孵育液：取 Antibody Pretreat Solution (HRP/Rabbit) 100 μl 到离心管中，加入兔源一抗 3-10 μg，枪头吸打至充分混匀，室温孵育 5 分钟。加入至 10 ml Dilution Buffer 中，充分混匀。
- 注意：1) 一抗的用量也可根据抗体的稀释度来进行调整。以抗体的最终稀释度 1:1000 为例，取 100 μl 抗体反应液 HRP (兔) 到 EP 管中，加入 10 μl 一抗，加入到 10 ml 抗体稀释液中，充分混匀，室温孵育 5 分钟。**
- 2) 如果膜面积较小，可按比例减少抗体、反应液及稀释液的用量。**
5. 完成步骤 3 后，倒掉漂洗液，将一抗、Antibody Pretreat Solution (HRP/Rabbit) 及 Dilution Buffer 混合而成的抗体孵育液加到膜上（确保孵育液完全浸没膜表面），在摇床上以 60 rpm 左右的速度室温孵育 40 分钟。
 6. 弃去（回收）抗体孵育液，用配制的 1×Wash Buffer 漂洗 3-5 次，每次 3 分钟。
 7. 进行后续检测。建议采用 ECL 或者 DAB 法进行检测。

【常见问题及解决方案】

问题	可能原因	解决方案
信号太弱或者看不到条带	蛋白上样量太少	进行SDS-PAGE电泳时加大上样量。
	蛋白转膜效率太低	优化转膜时间或者电流，确保转膜时膜与胶之间没有气泡。
	一抗亲和力较低	增加膜在溶液中的孵育时间或者增加抗体浓度可以增加信号
	一抗亲和力较低	对于低亲和力抗体来说，减少洗膜时间可以增加信号。由每次10min，减少到每次5min可以增加信号。
背景偏高	一抗使用过量	减少一抗的使用量。
	一抗有非特异性结合或者与封闭试剂有交叉反应	使用和二抗来源一致的血清或者无IgG的BSA
	洗膜时间太短	增加洗涤的步骤可以进一步的降低背景。
	曝光显影时间过长	减少曝光时间。如果信号和背景都高，可以等待一段时间，等背景信号减弱后，再进行曝光。
	容器或者试剂被污染	每次洗涤的时候使用清洁的容器。带手套，使用清洁的镊子处理膜。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。