



ECM Kit (大鼠 IgG)

Enhanced Chemiluminescent Method of Western Blotting

免疫印迹增强化学发光法

产品编号: EK1004

产品用途: 适于—抗为大鼠 IgG 的 Western Blotting 检测。

保存条件: 4°C可保存一年。

Western Blotting 检测试剂盒内容:

1.封闭试剂: 10g 蛋白质干粉(脱脂奶粉)。

2.HRP 标记兔抗大鼠 IgG: 0.1ml 亲和纯化抗体, 经过人血清吸附以去除交叉抗体。效价 1: 2000-10000。

3.ECM 显色剂: 总量 10ml。含 A 液 5ml(×20 倍); B 液 5ml(×20 倍)。每个试剂盒足够 10 张小膜或 800cm² 面积的膜显色。

工作原理:

蛋白质的电泳分离是重要的生物化学分离纯化技术之一, 电泳是指带电粒子在电场作用下, 向着与其电荷相反的电极移动的现象。根据所采用的支持物不同, 可分为: 琼脂糖凝胶电泳、淀粉凝胶电泳、聚丙烯酰胺凝胶电泳等。其中以聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)最广泛。它的优点为: 无电渗作用, 样品用量少(1-100μg), 分辨率高, 可检出 10⁻⁹-10⁻¹²mol 的样品, 凝胶机械强度大, 重复性好以及可以通过调节单体浓度或单体与交联剂的比例而得到孔径不同的凝胶。

SDS-PAGE 是最常用的定性分析蛋白质的电泳方式, 它根据蛋白分子大小不同, 迁移速率的不同而达到分离目的, 特别是用于蛋白质纯度检测和测定蛋白质分子量。

免疫印迹是将凝胶电泳的高分辨力和免疫化学检测的特异性融为一体。免疫印迹技术首先借助凝胶电泳将蛋白质抗原分离, 然后将凝胶中的蛋白质转印到膜上使之成为被分离的一个拷贝。免疫印迹为检测样品中是否存在目的蛋白提供一种可靠的方法, 该法鉴定蛋白质的原理是根据被测蛋白能与特异性抗体结合的特性并通过相对迁移率来体现该蛋白的分子量。如果想要了解样品中是否存在某一抗原, 以及该抗原的含量或该抗原多肽链的相对分子量以及亚型, 是否与其他蛋白结合, 蛋白质的酪氨酸残基是否发生磷酸化等有关问题均可采用免疫印迹。

免疫印迹包括多个简单步骤, 可在一到两天完成, 该方法具有高效, 简便, 灵敏等特点。

实验操作步骤:

1.蛋白质的样品制备

1) 细胞培养蛋白质样品的制备:

1: 胰酶消化后裂解: 细胞培养至 80%左右密度时, 以含 0.25%胰蛋白酶消化, 室温, 低速离



心，弃上清。细胞经预冷的 PBS 漂洗 3 次，加入 0.1-1ml 裂解液(根据细胞数量定)反复吹打。

2: 皿上直接裂解: 细胞培养至 80%左右密度时，细胞经预冷的 PBS 漂洗 3 次，加入 0.1-1ml 裂解液(根据细胞数量定)，用细胞刮刀收集，转移至离心管中，反复吹打。

2) 组织样品的制备:

新鲜组织块迅速置于预冷的生理盐水中，漂洗数次，按组织净重:

裂解液=1: 10 的比例，加入相应体积的裂解液进行匀浆，离心收集上清 (如有粘稠物可超声处理)

3) 蛋白变性:

处理后的样品加入样品缓冲液 (按样品浓度 1: 1 或 1: 2 的比例) 混匀，样品置 100°C 的水浴箱加热 3-5 min，10000g 离心 10 min，取上清液。(样品可立即使用也可以分装冻存，-20°C 可稳定保持数月。)

2.SDS-PAGE 电泳

1) 制胶:

①按比例配制分离胶 (丙烯酰胺母液: 单体: 双体=29: 1)，缓缓地摇动溶液，使激活剂混合均匀，将凝胶溶液平缓地注入两层玻璃极中，再在液面上小心注入一层水或正丁醇，以阻止氧气进入凝胶溶液中，37°C 恒温箱中静置 60min。

②同前按比例配制浓缩胶，但混匀溶液时不要过于剧烈以免引入过多的氧气。吸去不连续系统中下层分离胶上的水分，以连续平稳的液流注入凝胶溶液，然后小心插入梳子并注意不得在齿尖留有气泡，37°C 恒温箱中静置 60min 以上以保证完全聚合。

2) 加样:

依次加入标准品和待分析样品。(加样时间要尽量短，以免样品扩散，可在未加样的孔中加入等量的样品缓冲液避免边缘效应。样品一般在 1.0mm 厚的胶加样 50-100µg/lane)。

3) 电泳:

加样完毕，选择适当的电压进行电泳即可。一般采用恒压浓缩胶 55V，分离胶 75V，电泳直至溴酚蓝染料前沿下至凝胶末端处，即停止电泳。

3.转膜

蛋白质经 SDS-PAGE 分离后，从凝胶中转移到固相支持物上，常用的支持物有：硝酸纤维膜即 NC 膜 (AR0135) 或 PVDF 膜。Tris/甘氨酸-SDS-PAGE 结束后，取出凝胶，在 Tris/甘氨酸缓冲液中漂洗数秒。蛋白质从凝胶向膜转移的过程普遍采用电转印法，包括湿式电转印和干式电转印。

1) 干式电转印: 将转印槽阴极平放工作台上，并在上面加三张电转印液浸透的 1mm 厚的滤纸，将电转印液浸透 0.45µm 的 NC 膜放在滤纸上，再将凝胶平放在 NC 膜上，最后在凝胶上加盖三层电转印液浸透 1mm 厚的滤纸，电流根据凝胶面积按 1-2mA/cm²，接通电源，经 1-1.5 小时电



转印。

2) 湿式电转印: 打开电转印夹, 每侧垫上一块专用的用转印液浸泡透的海面垫, 再各放三块转印液浸透的滤纸, 滤纸与海绵垫大小相同或与 NC 膜、凝胶大小相同均可, 将凝胶平放在阴极侧滤纸上, 最后将 NC 膜平放在凝胶上, 按照(-)夹板-海绵-滤纸-胶块-NC 膜-滤纸-海绵-夹板(+)装好, 依次除尽每层间气泡, 夹好电转印夹。电泳槽加满预冷电转印液, 插入电转印夹, 将电泳槽放入冰箱内, 连接好电极, 接通电流, 转印夹的 NC 膜应对电泳槽的正极, 4°C 250-300mA, 转印 80min (根据分子量不同, 转印时间可适当调整)。

4.膜的封闭

漂洗转印膜, 室温, 3 次× 10min, 以尽量洗去转印膜上的 SDS (以免影响抗体的结合), 放入 0.02M TBS 缓冲液配置的 5%脱脂奶粉和 1%的 BSA 混合的封闭液内, 摇床摇动, 室温封闭 2h 4°C 过夜。1 × TBS-T, PH7.6 洗液, 室温漂洗 10min。

5.抗体杂交

1) 封闭后的杂交膜放入杂交袋中, 加入用 0.02M TBS 缓冲液配置的 2%脱脂奶粉和 1%的 BSA 混合的稀释液适当稀释的一抗, 4°C孵育过夜或 37°C孵育 2h, 1 × TBS-T, PH7.6 洗液洗膜 3 次× 10min。(一抗的稀释度, 孵育时间, 温度与显色强度, 背景有直接关系。一般来说, 阳性不强时可提高一抗浓度和延长孵育时间, 而背景高, 非特异性条带多, 则降低抗体浓度和孵育时间)。

3) 用 0.02M TBS 缓冲液配置的 2%脱脂奶粉和 1%的 BSA 混合的稀释液适当稀释过氧化物酶标记羊抗小鼠 IgG 孵育膜, 20°C-37°C 1.5 小时或 4°C过夜, 1 × TBS-T 洗膜 3 × 10min。

6.显色 (ECM)

ECM 显色剂配制: 按 1ml 蒸馏水, 加显色剂 A、B 各 1 滴混匀。将杂交后印迹膜放入显色盒中, 加上混合好的显色液反应约 1-5 min。吸去印迹膜边缘显色液, 将一透明的玻璃纸盖住抚平, 以确保 X 感光胶片的干燥。印迹膜转入暗室中使胶片曝光 30 秒-5 分钟。

7.显影, 定影

将曝光后的 X 感光胶片放入显影液(博士德有售, 货号 AR0132)中冲洗至胶片上出现条带或者胶片透明为止, 再放入定影液(博士德有售, 货号 AR0133)中定影, 胶片可长期保存。

附录:

对照的设置

内参照: 提示系统的稳定性, 一般是一些管家蛋白;

阳性对照: 即肯定可以表达你的目的蛋白的组织或者细胞, 同时可以提示你一抗的质量;

阴性对照: 即肯定不会表达你的目的蛋白的组织或者细胞。