



Western Blot 检测试剂盒说明书（简化版）

（W001-1）

【产品简介】

蛋白印迹，也称 Western，Western blot、Western blotting、Western 印迹，简称 WB，是用抗体检测蛋白的重要方法之一。在蛋白质进行 SDS-PAGE 电泳后，利用 Western Blotting 检测试剂盒可以完成转膜，膜的封闭，一抗孵育，二抗孵育和 ECL 化学发光检测的工作。

【试剂盒组份】

组份	W001-1-1 10T	W001-1-2 20T	储存温度
PVDF 膜（5cm×7cm）	10 张	20 张	RT
10×转移缓冲液	500 ml	500 ml ×2	4℃
Tween 20	1.5 ml	3.0 ml	4℃
10×洗涤液	250 ml	500 ml	4℃
BSA	6g	12g	4℃
二抗（两种供选择）			
羊抗小鼠 IgG-HRP	20ul	40ul	-20℃
羊抗兔 IgG-HRP	20ul	40ul	-20℃
ECL 化学发光试剂			
A 液（避光）	5 ml	10 ml	4℃
B 液	5 ml	10 ml	4℃

【自备仪器和试剂】

可调移液器、垂直板电泳仪、X光片、双蒸水、一抗，无水甲醇，显影液，定影液

【保存条件】

PVDF膜室温保存；二抗-20℃保存；其余组份4℃保存。

【操作步骤】

1、工作液的准备：

转膜缓冲液配制（1000ml）：

100ml 10×转移缓冲液+700ml 去离子水+200ml 无水甲醇，可重复使用一次。

洗涤液的配制（300ml）： 30ml 10×洗涤液+270ml 去离子水+150ul Tween 20

封闭液的配制（20ml）： 20ml 洗涤液+0.6g BSA



2、转膜

a、PVDF 膜及滤纸的预处理：

转膜前，裁剪与胶大小一致的 PVDF 膜泡入甲醇中，时间约为 1min，小心取出膜放入蒸馏水中浸泡 2min，然后把膜放置盛有转膜缓冲液的小槽中平衡 15min，同时把已裁剪好的滤纸（与胶大小一致）和海绵也放入盛有转膜缓冲液的小槽中平衡 15min。

b、转膜

（1）、干式电转印

将转印槽阴极平放工作台上，并在上面加三张经转膜缓冲液平衡好的 1mm 厚的滤纸，将经转膜缓冲液平衡好的 PVDF 膜放在滤纸上，再将凝胶平放在 PVDF 膜上，最后在凝胶上加盖三层经转膜缓冲液平衡好 1mm 厚的滤纸，接通电源，15V 进行恒压，转膜的时间根据蛋白分子量的大小而调整，分子量为 40—100KD 的蛋白转膜 30-45min。

（2）、湿式电转印

打开电转夹，每侧垫上一块专用的转膜缓冲液平衡好的海面垫，再各放三块经转膜缓冲液平衡好的滤纸，滤纸与海面垫大小相同或与 PVDF 膜、凝胶大小相同均可，将凝胶平放在阴极侧滤纸上，最后将经转膜缓冲液平衡好 PVDF 膜平放在凝胶上，按照 (-) 夹板-海绵-滤纸-凝胶-PVDF 膜-滤纸-海绵-夹板 (+) 装好，除尽气泡，夹好电转印夹。电泳槽（槽的一边放一块冰来降温）加满预冷的转膜缓冲液，插入电转印夹，连接好电极，接通电流，转印夹的 PVDF 膜应对电泳槽的正极，100v 恒压进行转膜，转膜的时间根据蛋白分子量的大小而调整，分子量为 40—100KD 的蛋白转膜 60min。

3、膜的封闭

转膜完毕后，立即把蛋白膜放置到预先准备好的 Western 洗涤液中，漂洗 1-2 分钟，以洗去膜上的转膜液。从转膜完毕后所有的步骤，一定要注意膜的保湿，避免膜的干燥，否则极易产生较高的背景。

用滴管等吸尽洗涤液，加入 Western 封闭液，在摇床上缓慢摇动，室温封闭 60 分钟。对于一些背景较高的抗体，可以 4℃ 封闭过夜。在整个 Western 过程中我们推荐使用侧摆摇床或类似仪器，侧向摆动速度比较缓慢，而且也容易让溶液覆盖蛋白膜。

4、一抗孵育

参考一抗的说明书，按比例用封闭液稀释一抗。可用 10×10cm 杂交袋进行一抗孵育，所需一抗孵育约为 1.0ml，室温或 4℃ 在侧摆摇床上缓慢摇动孵育一小时。如果效果不佳，可以在 4℃ 缓慢摇动孵育过夜。取出膜，加入洗涤液，在侧摆摇床上缓慢摇动洗涤 10 分钟。吸尽洗涤液后，再加入洗涤液，漂洗 3~5 次，每次 5-10 分钟。如果结果背景较高可以适当延长漂洗时间并增加漂洗次数。Western 结果通常需要提供内参作为对照，通常可以选用 Tubulin 抗体或 Actin 抗体，进行内参检测。

5、二抗孵育

根据一抗的类型，选择合适的二抗并参考二抗的说明书，例如，一抗是小鼠来源的 IgG，则二抗需选择抗小鼠 IgG 的二抗；并按照适当比例用封闭液稀释辣根过氧化物酶(HRP)



标记的二抗（1:10000 左右）。可用 10×10cm 杂交袋进行二抗孵育，所需二抗孵育约为 1.0ml，室温或 4℃在侧摆摇床上缓慢摇动孵育一小时。加入洗涤液，在侧摆摇床上缓慢摇动洗涤 10 分钟。用滴管吸尽洗涤液后，再加入洗涤液，漂洗 3~5 次，每次 5-10 分钟。如果显色结果背景较高，可以适当延长洗涤时间并增加洗涤次数。

6、ECL 化学发光检测

a、ECL 工作液的配制：

取 1.5ml 的 eppendorf 管，加入 500 μ l A 液和 500 μ l B 液，然后加入 1 μ l 增强剂，混匀后即为 ECL 工作液（配制后请尽快使用）。用平头镊将膜取出，用吸水纸略吸去过多的液体（切勿接触膜的蛋白面），然后置于一洁净保鲜膜上。

b、根据膜的大小，按每 10 平方厘米膜加 1ml ECL 工作液的比例，滴加 ECL 工作液到膜上，确保使工作液均匀覆盖在膜上，放置 1-2 分钟。

c、取膜，弃 ECL 工作液，用吸水纸略吸去过多的液体。将膜放在两片保鲜膜中间，小心赶尽气泡。

d、将膜固定于片夹内。暗室内压片 1 分钟，立即显影定影，根据结果再调整压片时间。或直接分别压片 30 秒，1，3，5 分钟，然后一起显影定影观察结果。