



## SA2025--兔 IgG

### Western Blotting DAB 显色法检测试剂盒（蓝色）

**产品编号：** SA2025（适于一抗为兔来源抗体）

**产品规格：** 1KIT

**保存条件：** -20℃冷冻保存一年。DAB 显色试剂应避光保存。

试剂盒组份	含量	用途	保存条件
蛋白干粉	10g×2 包	封闭试剂	-20℃ 冷 冻 保存一年。 DAB 显 色 试 剂 应 避 光 保 存。
浓缩抗体稀释液	20ml	稀释抗体	
聚合过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (效价 1:200-400)	0.2ml	亲和纯化抗体， 经聚合法标记过氧化物酶	
DAB 显色剂 A 液	3ml	DAB 浓缩液	
DAB 显色剂 B 液	3ml	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 浓缩液	
DAB 显色剂 C 液	3ml	TBS 浓缩缓冲液	

#### 工作原理：

聚合标记法是武汉博士德生物工程有限公司独创的一种酶标记方法，其敏感性比普通酶标法有明显提高。用于 Western Blotting 的免疫学检测，更能体现其优点。不仅能大量地节约一抗，更重要的是使条带更清晰，甚至能检测出普通酶标法无法检测出的微量条带。DAB 是过氧化物酶最重要的显色剂之一，反应产物为不溶于水、二甲苯和醇的棕色沉淀物，适合于免疫印迹的显色反应。本产品采用特殊配方，具有操作简单，储存稳定，信号灵敏度高，持续时间长，背景低，结果易保存等优点。

#### 实验客户需自备试剂和器材：

1. 转印了蛋白样品的NC膜或PVDF膜：通过SDS-PAGE凝胶电泳分离蛋白质抗原，将PAG胶上的蛋白质转印到硝酸纤维素膜（NC膜）或PVDF膜上。
2. 稀释缓冲液：使用中性稀释缓冲液即0.02M PBS（AR0030）或0.02M TBS（AR0144）配制封闭液和抗体稀释液。

0.02M PBS (pH7.2-7.6)：1000ml蒸馏水加Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.8g，NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.4g，NaCl 8.5g。

如果用的是含水磷酸盐，应加上分子式中水的含量。

0.02M TBS (pH7.2-7.6)：1000ml蒸馏水中加Tris 2.42g，NaCl 9g；纯乙酸或浓盐酸调节pH值(7.2-7.6)。

3. 洗涤缓冲液：每1000ml中性稀释缓冲液中加入0.5ml Tween20即可。

4. 一抗：选择适合的一抗，用**抗体稀释液**稀释相应的一抗，一般特异性抗体工作浓度为  $1\mu\text{g/ml}$ ，具体的稀释度取决于特异性的一抗和膜上的抗原的量。
5. 摇床：膜的封闭、抗体孵育和洗涤都需平稳摇晃，需在摇床上操作。
6. 相机：记录结果。

#### 操作程序：

1. 通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白样本和分子量标准。
2. 将蛋白样本转移至硝酸纤维素膜或 PVDF 膜上。
3. 封闭硝酸纤维膜：用封闭蛋白干粉 2g，加稀释缓冲液 100ml，20-37 °C 封闭 1-2 小时。用量以浸没整张膜为准。
4. 洗涤缓冲液洗涤硝酸纤维素膜 5min, 1 次。
5. 配制**抗体稀释液**：取 90ml 稀释缓冲液加 1g 封闭蛋白干粉和 10ml 浓缩抗体稀释液即可。一抗、二抗均用此稀释液稀释。
6. 硝酸纤维膜孵育一抗：用**抗体稀释液**稀释相应的一抗，一般特异性抗体浓度  $1\mu\text{g/ml}$ ，20-37°C 孵育 2 小时左右。如果缺乏特异性的条带或阳性不强，应提高一抗的浓度；如果有非特异性的条带，应提高一抗的稀释度。
7. 用洗涤缓冲液振荡洗涤硝酸纤维素膜 3 次，每次 5min。
8. 硝酸纤维膜孵育二抗：用**抗体稀释液**稀释相应的酶标二抗，效价 1:200-400。37°C 孵育一个半小时左右。用户可根据实际染色情况对稀释度做适当调整。
9. 用洗涤缓冲液振荡洗涤硝酸纤维膜 4 次，每次 5min。
10. DAB 显色:使用 DAB 显色试剂。按每 2ml 蒸馏水加显色剂 A，B，C 各 1 滴，混匀。混匀后加至膜上。室温显色。一般显色 1-30min。若无背景出现则可继续显色。显色后用蒸馏水洗涤以终止反应。
11. 观察，照相。

**备注：**可访问博士德网站获取详细的 Western blotting 流程及全套产品信息。

#### 注意事项：

1. 试剂频繁使用时置 4°C，不常使用时置 -20°C。显色剂 A 需置 -20°C 冷冻保存。如有结晶析出，应确保结晶完全溶解再行使用。
2. 显色工作液应新鲜配制。