

ONE-HOUR Complete IP-Western Kit

Technical Manual No. 0218

Version 06192009

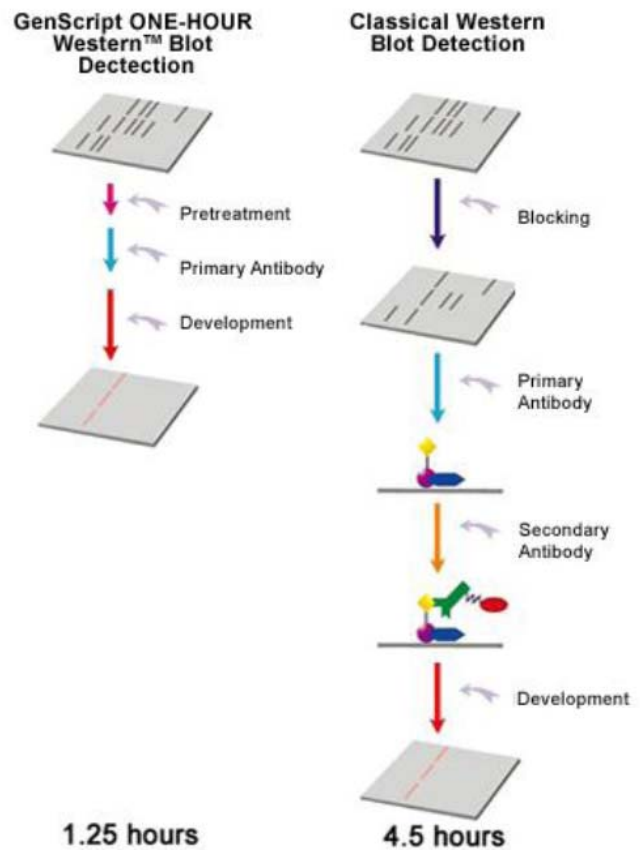
| | |
|--|---|
| I. 产品描述 | 1 |
| II. 试剂盒包含的产品: | 2 |
| III. 相关产品 | 2 |
| IV. 主要特色 | 2 |
| V. 储存条件 | 2 |
| VI. ONE-HOUR WESTERN™ KIT PROTOCOL | 3 |
| VII. 实验案例 | 4 |
| VIII. 常见问题及解决办法: | 6 |
| IX. 订购信息 | 7 |

I. 产品描述

金斯瑞ONE-HOUR Complete IP-Western Kit 应用了突破性免疫学技术（专利申请中），可以帮助实验人员在很短时间内完成IP-Western检测。试剂盒中包含了IP-Western检测所需的全部试剂、缓冲液，NC膜和化学发光用底物。实验人员将蛋白从PAGE胶转膜后，只需使用试剂盒中的 Pretreat溶液和WB溶液分别孵育后，再经过三次洗膜，即可通过试剂盒提供的HRP底物进行发光检测。与传统Western实验三个步骤相比，ONE-HOUR Western™ blot试剂盒仅需一步即可完成，不仅显著减少了实验时间，而且由于减少了操作步骤，降低了实验过程中人为操作对实验结果的不利影响。

ONE-HOUR Complete IP-Western Kit 适用于 rabbit、mouse 和 goat 种属的一抗进行的 IP-WB 检测，能够检测到 ng 级的抗原蛋白，当每条泳道中免疫沉淀的应用一抗少于 2 μg 时，即可得到清楚可见的目的条带。Mouse 和 goat 试剂盒中的 A&G blocker 能够去除由 protein A、G 或者 A/G 引起的杂带。对于 rabbit 试剂盒，如果使用 protein G 或者 A/G 进行免疫沉淀反应，则只需 protein G blocker 就能够去除杂带。

试剂盒里提供的优化好的 WestClear™ Nitrocellulose Membrane (0.2 μm) 和 LumiSensor™ Chemiluminescent HRP substrate，保证了获得理想的实验结果。客户也可根据自己的实际需要，单独购买 WestClear™ Nitrocellulose Membrane (0.2 μm) 和 LumiSensor™ Chemiluminescent HRP substrate。



1.25 hours 4.5 hours
Figure 1. Overview of Western Procedures

II. 试剂盒包含的产品:

三种 ONE-HOUR Complete IP-Western Kits 可供选择, L00231、L00232、L00233 分别针对 rabbit、mouse 和 goat 三种不同种属的一抗。每个试剂盒中提供了足够检测十张 minigel (7.5 x 8 cm) IP-Western blots 的试剂。

| Kit Components | 10 Assays L00231 (Rabbit) | 10 Assays L00232 (Mouse) | 10 Assays L00233 (Goat) |
|---|------------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| Pretreat A solution | 100 ml | 100 ml | 100 ml |
| Pretreat B solution | 100 ml | 100 ml | 100 ml |
| A&G blocker (100X) | | 1 ml | 1 ml |
| Protein G blocker (100X) | 1 ml | | |
| IP-WB 1 solution | 1 ml | 1 ml | 1 ml |
| IP-WB 2 solution | 1 ml | 1 ml | 1 ml |
| IP-WB 3 solution | 100 ml | 100 ml | 100 ml |
| 10X Wash solution | 125 ml | 125 ml | 125 ml |
| WestClear™ Nitrocellulose Membrane (0.2 μm, 7.5 x 8 cm) | 10 Sheets | 10 Sheets | 10 Sheets |
| LumiSensor™ Chemiluminescent HRP Substrate | 2 x 30 ml | 2 x 30 ml | 2 x 30 ml |
| Protocol | 1 | 1 | 1 |

III. 相关产品

| | |
|--|-----------|
| WestClear™ Nitrocellulose Membrane | L00224A60 |
| LumiSensor™ Chemiluminescent HRP Substrate Kit | L00221V60 |
| 10X Wash Solution | MB01011 |
| A&G Blocker (100X) | M01014 |
| Protein G Resin | L00209 |
| Protein A Resin | L00210 |

IV. 主要特色

- ◆ 操作方便: 较少的步骤能够减少人为地误差。
- ◆ 二抗, protein A, G 和 A/G 能够有效的封闭杂带, 得到清楚地 IP-Western 结果。
- ◆ 低背景: 优化好的 WestClear™ Nitrocellulose Membrane (0.2 μm) 和 LumiSensor™ Chemiluminescent HRP Substrate Kit 能够有效的降低背景。
- ◆ 高灵敏度: 试剂盒的灵敏度高于常规方法 4-5 小时得到的结果 (和所用抗体的质量和数量有一定关系)。
- ◆ 重复性: 试剂盒具有很高的可重复性。
- ◆ 不需要二抗。
- ◆ 与常规的三步法检测相比, ONE-HOUR Complete IP-Western Kit 只需要很少的优化。

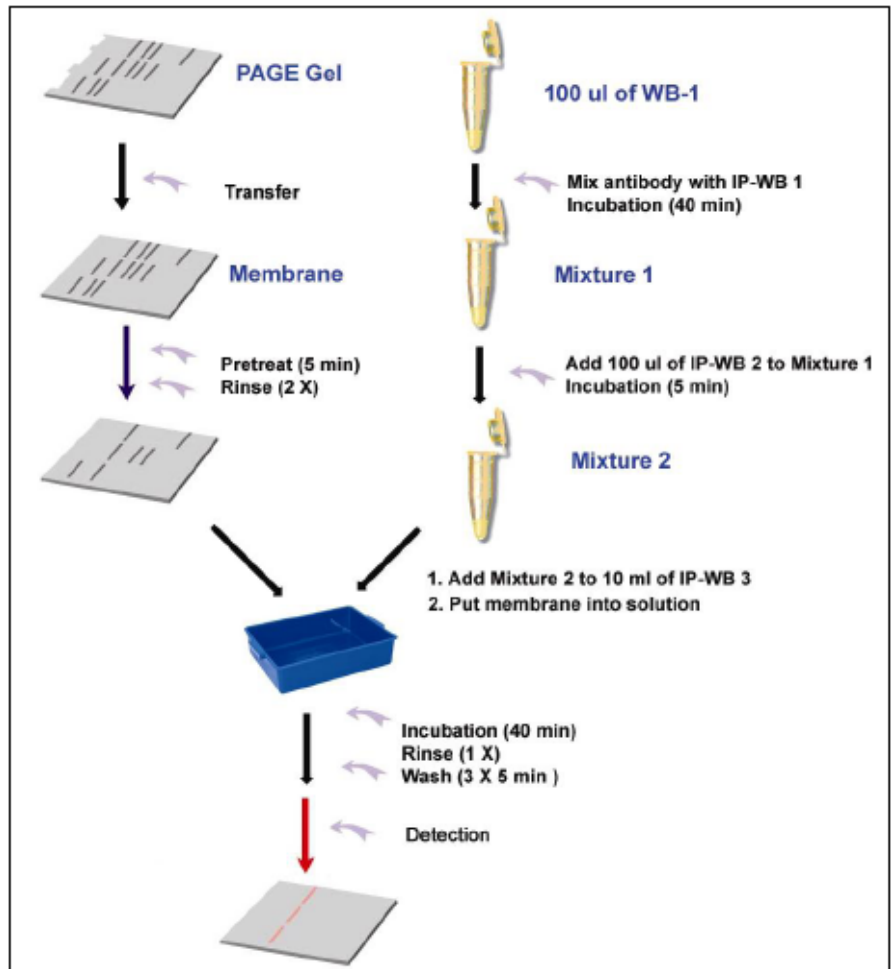
V. 储存条件

WestClear™ Nitrocellulose Membrane 室温下保存, 试剂盒中其余试剂 4℃ 条件下可以稳定保存 6 个月。不要冷冻试剂盒内的任一试剂。

VI. ONE-HOUR WESTERN™ KIT PROTOCOL

说明:

1. 本操作步骤是按照 7.5 x 8 cm 的膜进行优化。具体实验过程中，请根据膜的实际大小，按比例调整所用试剂的使用体积。
2. 本产品能够有效的去除每条泳道 2 μg 抗体的杂带。每条泳道的抗体上样量请不要超过 2 μg （理论上 2 μg 抗体能够沉淀 1.33 μg 50 kD 大小的抗原）。
3. 在进行 Western blot 检测实验过程中，如果在免疫沉淀时使用 protein A、G 或者 A/G 树脂，使用本产品系列中的 mouse (L00232)试剂盒或 goat (L00233)试剂盒时，需以 A&G blocker 去除残留的 protein A、G 或者 A/G 蛋白条带；使用本产品系列中的 rabbit (L00231)试剂盒，则需 protein G blocker 去除多余的 protein G 或者 A/G 蛋白条带（用 rabbit 抗体检测时，protein A 不会影响 Western blot 的检测结果）。所有的检测试剂盒都经过了优化，每条泳道可以封闭至少 50 ng protein A、G 或者 A/G。



试剂盒里未提供的试剂:

一抗，推荐使用亲和纯化得到的抗体。Rabbit 多抗要用整个 IgG 分子的。Fab 的片段化会明显降低信号。金斯瑞能够提供多种抗体用来检测信号通路或者其他应用。具体信息请见网页：

http://www.genscript.com.cn/antibody_product.html

使用前请按照以下要求进行准备所需材料:

用 112.5 ml 去离子水稀释 12.5 ml 10X wash solution，制成 125 ml 1X wash solution，冲洗每次使用 15 ml 1X wash solution，洗膜每次使用 20 ml 1X wash solution，如果 10X wash solution 在储存过程中有沉淀产生，请用水浴（50℃）加热到沉淀全部溶解。稀释好的 1X buffer 储存于 4℃。

Western blot 步骤:

1. 准备 Mixture1

在转膜之前或者期间准备 Mixture 1。用 100 μl IP-WB 1 和 10 μg 一抗（或者更多）混合，置于离心管内，离心数秒使 Mixture 1 混匀并沉在管子底部。室温下孵育 Mixture 1 至少 40 min。4℃ 孵育过夜能够得到更好结果。

Note: 如果 Western 检测用抗体用量少于 10 μg ，IP-WB 1 的使用体积也要相应的减少。例如，用 50 μl IP WB 1 和 5 μg 一抗制成 Mixture 1。其它试剂不需要调整。

2. 预处理膜和准备 Mixture 2

用塑料容器混合 10 ml pretreat A solution 和 10 ml pretreat B solution 制备成 pretreat solution。蛋白转膜后用 pretreat solution 室温下在摇床上孵育 5 min。孵育后，用 1X wash solution 洗膜两次，每次 15 ml。

同时准备 Mixture 2，把 100 μ l IP-WB 2 加入到 Mixture 1，离心数秒使 Mixture 2 混匀并沉在管子底部，Mixture 2 室温下孵育 5min。

3. Protein A 和 protein G 活性位点的封闭（可选）

对于 mouse 和 goat 的试剂盒：如果在免疫沉淀时选用了 protein A、G、A/G 树脂，用 10 ml 1X wash solution 稀释 100 μ l A&G blocker，在摇床上用稀释好的 A&G blocker 孵育膜（在步骤 2 中得到），室温下 5 min，不需要洗涤。

对于 rabbit 试剂盒：如果在免疫沉淀时选用了 protein G 或者 A/G 树脂，把 Mixture 2 加入到 10 ml IP-WB 3，然后再加入 100 μ l protein G blocker 制成 combined solution，混匀。

4. 孵育预处理过的膜

a) 加入 Mixture 2 到 10 ml IP-WB 3 在塑料容器里，混匀。用含有 Mixture 2 的 IP-WB 室温下摇床孵育 40min。

b) 用 15 ml 1X wash solution 冲洗膜一次，在摇床上洗膜三次，每次用 15 ml 1X wash solution 浸泡 5 min。每次冲洗或者洗膜的步骤要使用清洁的容器以避免和降低背景。

5. 显影

a) 用 3 ml reagent A 和 3 ml reagent B 离心数秒制备成工作液，每 cm^2 膜使用 0.1 ml 工作液。混合好的工作液能够在室温下避光保存数小时。

b) 用镊子夹起膜，使膜树脂，膜的边缘接触吸水纸，吸干膜上多余的 wash solution。把膜放在干净、平整的表面，用工作液覆盖膜。

c) 室温下孵育膜 3 min。把膜置于柔软、清洁吸水纸。用另一张吸水纸去除多余的工作液。把膜置于曝光用暗盒。

d) 用胶片曝光 1 min，然后显影。重复几次，尝试不同的曝光时间，以得到最好的结果。

VII. 实验案例

1. 使用 rabbit 一抗，ONE-HOUR IP-Western blot 与常规 Western blot 比较：

使用 rabbit anti-GST-tag

(GenScript, A00097) 多克隆抗体，ONE-HOUR IP-Western blot 与常规 Western blot 比较：用 rabbit anti-GST-tag (GenScript, A00097) 进行常规 Western blot 检测的比较：常规方法 (4.5hours, 图 2, 左图所示)，ONE-HOUR IP-Western blot (1 hour, 图 2, 右图所示)。

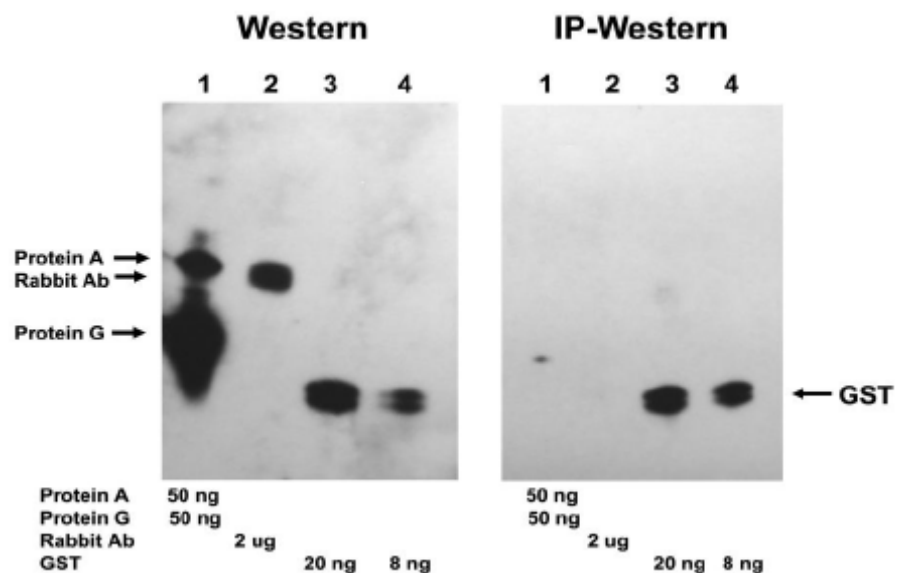


图 2，分别用 ONE-HOUR IP-Western blot (L00231) 和常规 Western blot 两种方法检测 GST 蛋白，两组使用都使用了试剂盒里提供的 LumiSensor™ Chemiluminescent HRP substrate。

2. 使用 mouse 一抗，ONE-HOUR IP-Western blot 与常规 Western blot 比较：

使用 ONE-HOUR IP-Western blot 与常规 Western blot 检测纯化的 multiple-Tag (M.Tag) 融合蛋白的结果比较：用 mouse anti-Trx-tag 单克隆抗体 (Genscript, A00180) 不同方法检测两张同样的膜：常规 Western blot 检测 (4.5 hours, 图 3, 左图所示)，ONE-HOUR IP-Western blot (1 hour, 图 3, 右图所示)。

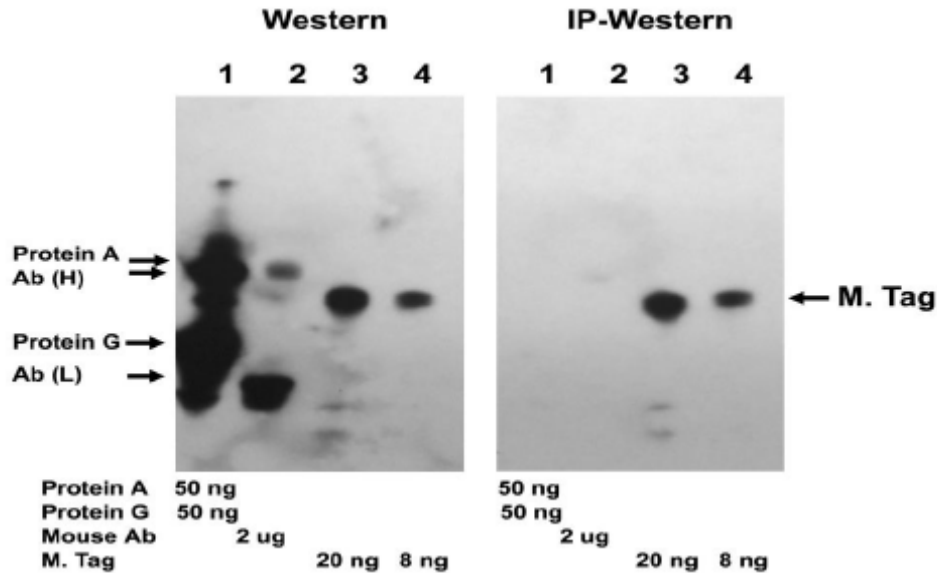


图 3，分别用ONE-HOUR IP-Western blot (L00232) 和常规Western blot两种方法检测multiple-Tag 融合蛋白，两组使用都使用了试剂盒里提供的LumiSensor™ Chemiluminescent HRP substrate。

3. 使用 goat 一抗，ONE-HOUR IP-Western blot 与常规 Western blot 比较：

使用 ONE-HOUR IP-Western blot 与常规 Western blot 检测纯化的 multiple-Tag (M.Tag) 融合蛋白的结果比较：用 goat anti-HA 多克隆抗体 (Genscript, A00168) 不同方法检测两张同样的膜：常规 Western blot 检测 (4.5 hours, 图 4, 左图所示)，ONE-HOUR IP-Western blot (1 hour, 图 4, 右图所示)。

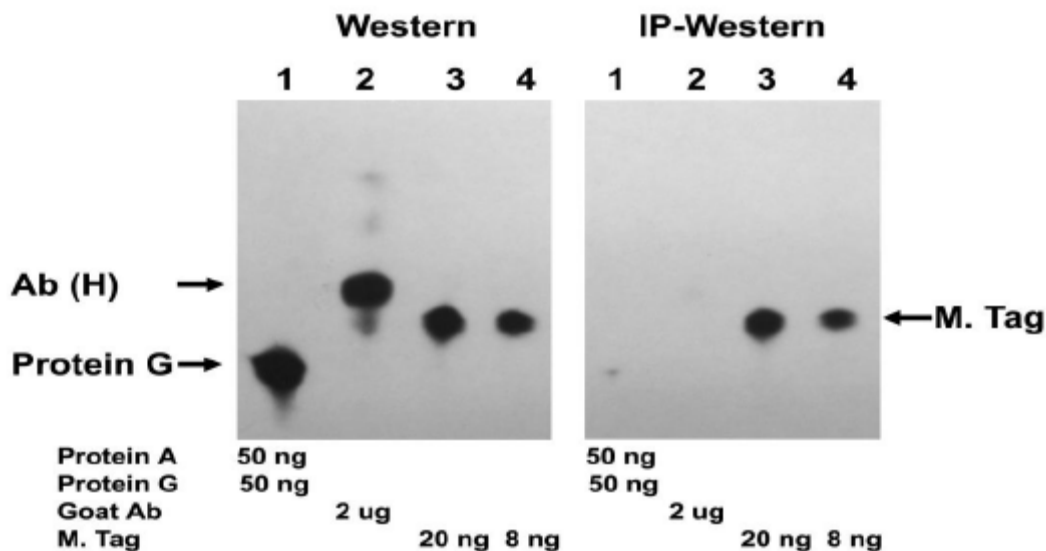


图 4，分别用ONE-HOUR IP-Western blot (L00233) 和常规Western blot两种方法检测multiple-Tag 融合蛋白，两组使用都使用了试剂盒里提供的LumiSensor™ Chemiluminescent HRP substrate。

VIII. 常见问题及解决办法:

按照下表解决及避免一些常见问题。

| 问题 | 可能的原因 | 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 |
| 背景偏高 | 一抗没有特异性结合或者有交叉反应 | 更换抗体: 选用高亲和力的一抗, 首选使用亲和纯化的一抗。 |
| | 能够看到 protein A, G 或者 A/G 的污染条带 | 增加 protein A/G 封闭时间到 10 min 或者更长。 加入一些 A&G blocker 到 IP-WB 3 solution 中, 不用 100X , 使用 200X 如果使用 rabbit kit , 使用更多的 protein G blocker |
| | 仍然可以看到重链或者轻链 | 减少样品的上样量 使用同样数量的一抗, 但是减少 WB-1 solution 。例如用 80 μl WB-1 solution 去混合 10 μg 一抗。 |
| | 一抗使用过量 | 减少 WB-1 solution 体积和加入到 step 1 中的一抗用量, 但是要保持一定得比例。例如把 100 μl WB-1 solution 稀释 10ug 一抗, 可以减少为 50 μl WB-1 solution 稀释 5 μg 一抗。 |
| | 洗膜时间太短 | 洗膜时间从每次 5 min 到增加 10 min 。 WB 检测时一抗孵育完以后, 增加洗涤次数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, 曝光时等待较少的时间。 |
| | 仪器或者试剂被污染 | 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。 |

IX. 订购信息

ONE-HOUR Complete IP-Western Kit:

产品编号 L00231 使用 rabbit 一抗

产品编号 L00232 使用 mouse 一抗

产品编号 L00233 使用 goat 一抗

专利申请中。

仅供科学研究使用。

有限使用授权：本产品可能使用了南京金斯瑞生物科技有限公司的一项或者多项专利。购买者（包括学术机构或者营利性组织）在购买本产品的同时，获得了在科学研究中使用本产品和本产品任何一部分的不可转让的权利。购买者不得通过销售或其它方式向第三方转让(a)本产品，(b)本产品任何一部分，或者(c)用本产品或产品任何一部分所制作的材料；购买者也不得将(a)本产品，(b)本产品的任何一部分，或者(c)用本产品或产品的任何一部分所制作的材料用于商业目的。如果需要用于商业用途，请通过order@genscript.com.cn联系金斯瑞。

南京金斯瑞生物科技有限公司
地址：江苏省南京市孝陵卫双拜巷 78 号
邮编：210014
电话：025-84347333 84347338
传真：025-84347334 84347319
Email: order@genscript.com.cn
Web: www.genscript.com.cn