

ONE-HOUR Western™ Kit

Technical Manual No. 0352

Update date 05012010

I	产品描述.....	1
II	ONE-HOUR Western™ Kit 选购指南.....	2
III	试剂盒包含的试剂.....	3
IV	相关产品	3
V	主要特色.....	3
VI	储存条件.....	3
VII	实验步骤.....	4
VIII	实验案例.....	5
IX	常见问题及解决办法.....	7

I. 产品描述

金斯瑞 ONE-HOUR Western™ 试剂盒应用了突破性的免疫学技术（专利申请中），能够在 1 小时左右得到高质量的 western 或者 Dot blot 结果，而传统三步 western blot 检测方法需要大概 5 个小时。蛋白转印到膜上后，用 Pretreat solution 孵育 5 min。一抗、WB-1 solution 和 WB-2 solution 混合后与处理后的膜孵育 40 min，洗膜三次，每次 5-10 min。再用 HRP 底物进行显影。ONE-HOUR Western™ 试剂盒与经典三步 western blot 实验步骤比较如右图所示。

ONE-HOUR Western™ 试剂盒的高信号低背景的设计方案，可以很好地对蛋白进行快速、清晰的 western blot 分析。

除了 Basic kit 以外，其它试剂盒都包含了必需试剂、缓冲液和实验材料等，如膜、HRP 底物等，客户不需要额外的二抗。ONE-HOUR Western™ 试剂盒能够有效节约您宝贵的研发时间，为了增加效率，我们推荐购买 Complete kit。

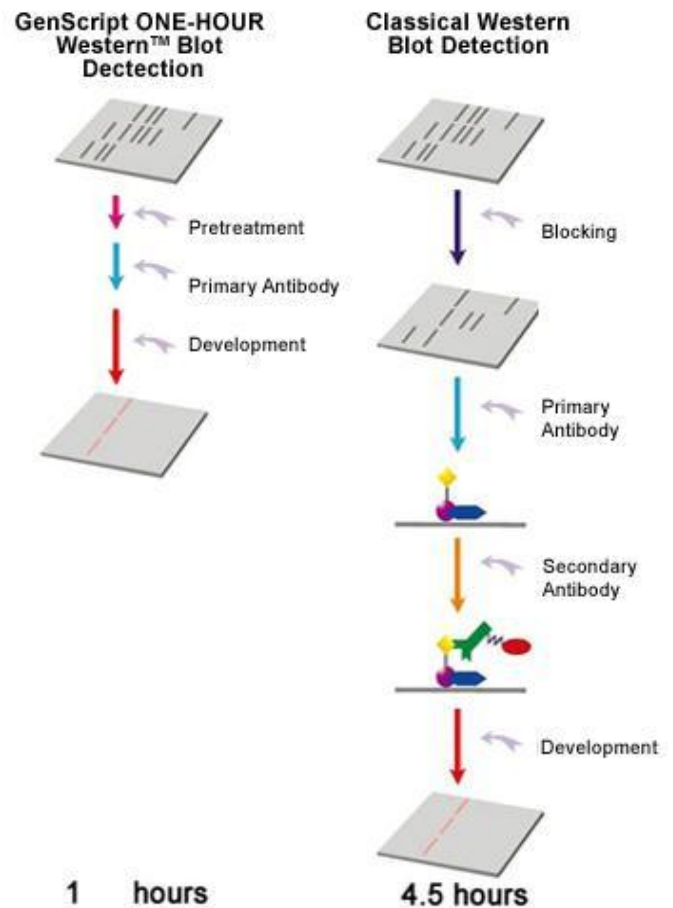
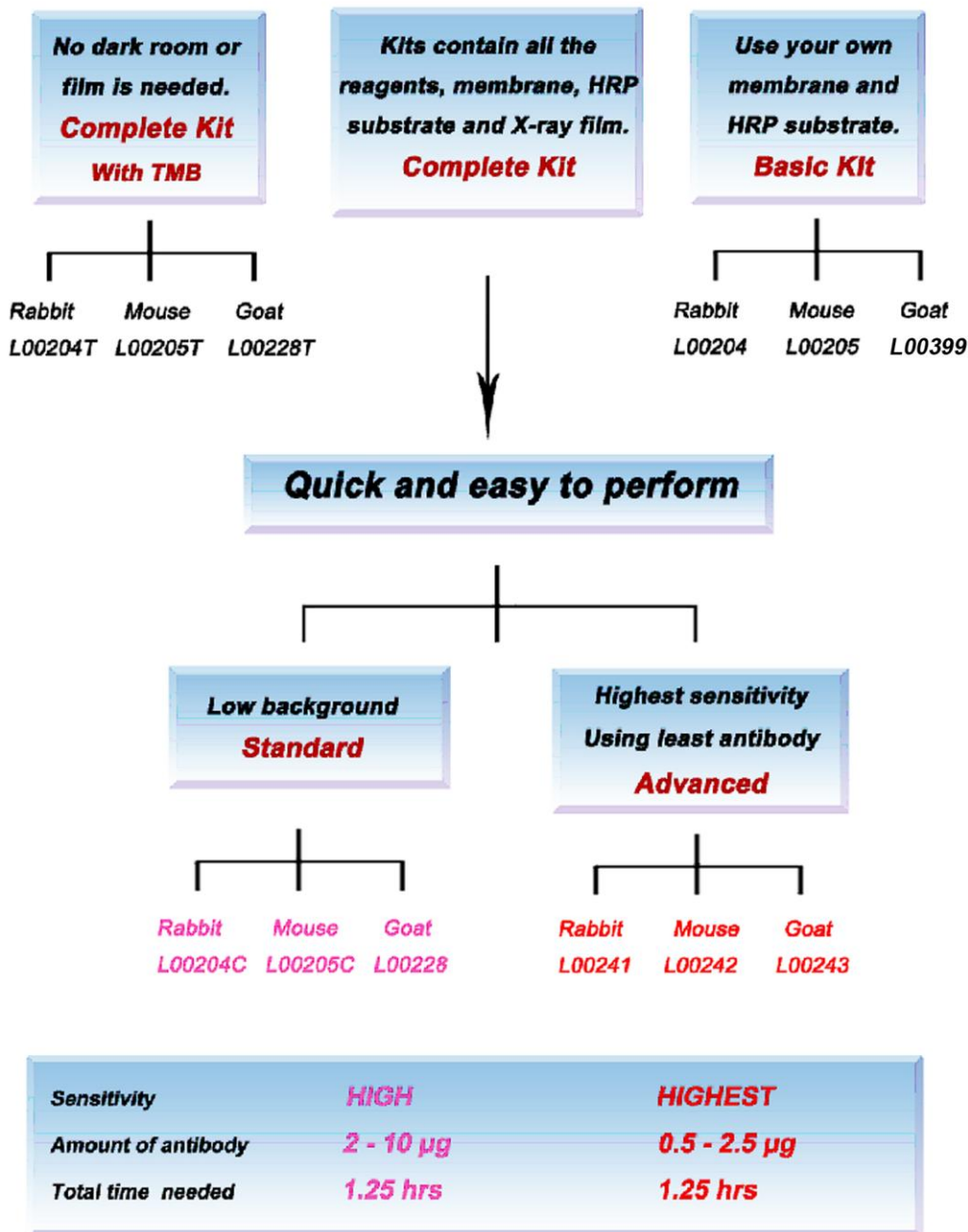


Figure 1. Overview of Western Procedures

II. ONE-HOUR WESTERN™ KIT 选购指南

No Secondary Antibody Is Needed for Any of These Kits



III. 试剂盒包含的试剂

每个试剂盒（5 Assays）中包含 5 张 minigel (7.5 x 8 cm) 及 5 次 Western blot 实验所需的试剂。

Kit Components	Basic Kits	Complete Kits with TMB	Complete Kits	
			Standard	Advanced
Pretreat Solution A	50 ml	50 ml	50 ml	50 ml
Pretreat Solution B	50 ml	50 ml	50 ml	50 ml
WB-1 Solution	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
WB-2 Solution	50 ml	50 ml	50 ml	50 ml
5X Wash Solution	125 ml	125 ml	125 ml	125 ml
WestClear™ Nitrocellulose Membrane (0.2 μm, 7.5 x 8 cm)	X	5 sheets	5 sheets	5 sheets
ChromoSensor™ One Solution TMB Substrate	X	15 ml	X	X
LumiSensor™ Chemiluminescent HRP Substrate*	X	X	2 x 7.5 ml	5 + 10 ml
Protocol	1	1	1	1

* Standard Complete Kits 和 Advanced Complete Kits 分别包含 LumiSensor™、LumiSensor™ Super Chemiluminescent HRP Substrate。

IV. 相关产品

- WestClear™ Nitrocellulose Membrane (0.2 μm) L00224A60
- ChromoSensor™ One Solution TMB Substrate L00222V60
- LumiSensor™ Chemiluminescent HRP Substrate Kit L00221V60
- 5X Wash Solution MB01011
- Pretreat Solutions (A and B, 50 ml each) M01013
- GenScript Dot Blot Box M00108
- Western Quick Block Optimization Kit L00278
- Western Blot Box M00100, M00101, M00102 and M00103

V. 主要特色

- **操作方便:** 只需一步就可完成 Western 或 Dot blot 检测实验，操作简便。
- **低背景:** 试剂盒中各种试剂及耗材经过优化，能有效降低背景。
- **重复性:** 实验结果可重复性强。
- **无需二抗:** 试剂中已包含二抗，不需再加入二抗。

VI. 储存条件

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

VII. ONE-HOUR WESTERN™ 实验步骤

本操作步骤按照 7.5 x 8 cm 的膜进行，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。

未提供的试剂：

纯化的一抗：推荐使用亲和纯化的一抗。如果使用抗血清，需要更多的优化实验。

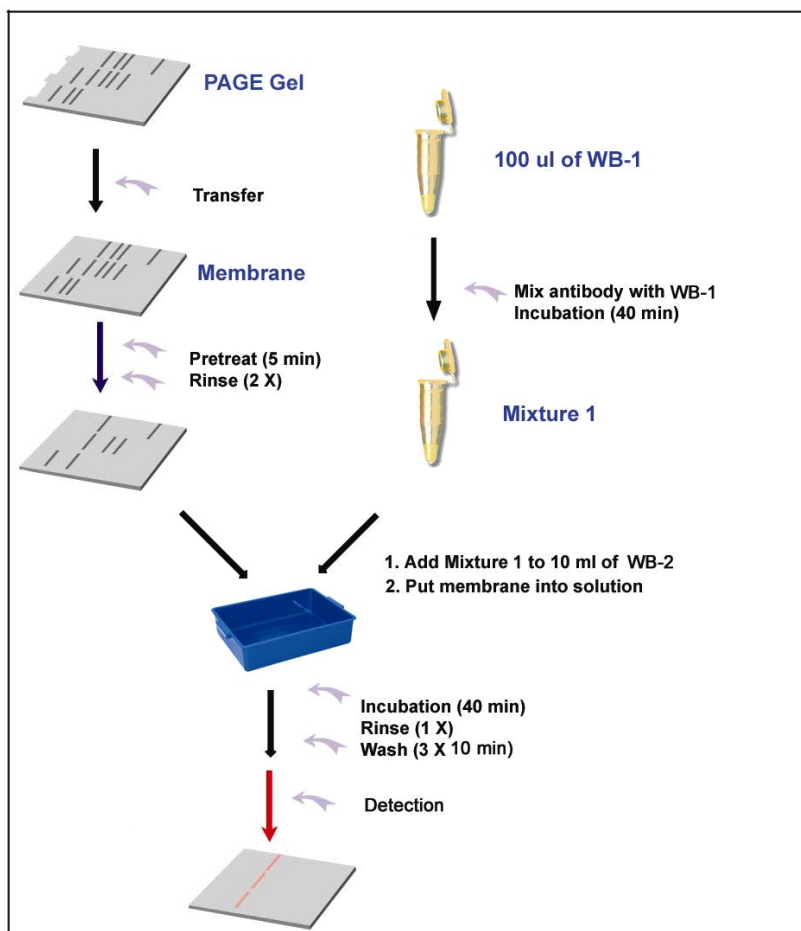
使用前请按照以下要求进行准备所需材料：

用 100 ml 去离子水稀释 25 ml 5X wash solution，制成 125 ml 1X wash solution 供冲洗和洗膜使用，稀释好的 1X wash solution 储存于 4°C。使用量分别为：冲洗 15 ml/次；洗膜 20ml/次。如果 5X wash solution 在储存过程中有沉淀产生，请用水浴（50°C）温育到沉淀全部溶解。

Western blot 操作步骤：

1. 准备 Mixture 1

请在转膜之前或者期间准备 Mixture 1。把一抗和 WB-1 在微量离心管内离心数秒，室温下孵育 Mixture 1 至少 40 min。



Mixture 1	L00204, L00205, and L00399	L00204T, L00205T, and L00228T	L00204C, L00205C, and L00228	L00241, L00242, and L00243
WB-1 Solution	20 - 100 μ l	50 - 100 μ l	20 - 100 μ l	5 - 25 μ l
一抗*	2 - 10 μ g	5 - 10 μ g	2 - 10 μ g	0.5 - 2.5 μ g
WB-1: Antibody 比例	10 μ l : 1 μ g	10 μ l : 1 μ g	10 μ l : 1 μ g	10 μ l : 1 μ g
未知效价抗体	Mix 5 μ g of Ab with 50 μ l WB-1	Mix 5 μ g of Ab with 50 μ l WB-1	Mix 5 μ g of Ab with 50 μ l WB-1	Mix 1 μ g of Ab with 10 μ l WB-1

* 请根据抗体生产商的建议使用适量的抗体。如果使用 ONE-HOUR Advanced Western Kits，只需要使用抗体推荐量的 1/4 到 1/2。

2. 膜的预处理

在蛋白转到膜上之后进行以下操作：用塑料容器混合 10 ml pretreat A solution 和 10 ml pretreat B solution 制备成 pretreat solution。使用时，请配制新鲜的 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。

3. 膜的孵育

- 分别向 Western blot 盒中加入制备好的全部的 mixture 1 和 10 ml WB-2，混匀。将膜在混合液中用摇床在室温下孵育 40 min。如果含有 mixture 1 的 WB-2 溶液在 4°C 条件下保存，可以重复使用三次。但可能会出现抗体浓度的改变或者背景增高等不利变化。
- 用 15 ml 1X wash solution 冲洗膜一次，在摇床上用 20 ml 1X wash solution 洗膜三次，每次 10min。（如果是使用 TMB 底物进行显色，每次只需要洗膜 5 min 就可以了。）每次洗膜都需使用清洁的容器，以避免污染，从而降低背景。

4-1. Chemiluminescent HRP 底物显影

- 如果使用 LumiSensor™ HRP Substrate，分别将 1.5 ml reagent A 和 1.5 ml reagent B 离心数秒后，混匀，制备成工作液。0.05 ml 工作液足够覆盖 1 cm² 膜。混合好的工作液能够在室温下避光保存数小时。

工作液准备概况：每 cm² 膜需要 0.05 ml

Working Solution Preparation	L00204C, L00205C, and L00228	L00241, L00242, and L00243
Reagent A	1.5 ml	1.0 ml
Reagent B	1.5 ml	2.0 ml
Total Volume	3.0 ml	3.0 ml

- 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。并膜放在干净、平整的表面，用工作液覆盖膜。
- 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，将膜置于曝光用暗盒。
用胶片曝光 30 秒，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。

4-2. TMB 底物显色

- ChromoSensor™ One Solution TMB Substrate 是即用型工作液，0.1 ml 工作液足够覆盖 1 cm² 膜。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。将膜放在干净、平整的表面，用 TMB 覆盖膜。
- 室温下孵育膜 5 到 10 min，直到出现适当的颜色。把膜置于去 20 ml 去离子水中浸泡三次，终止反应，每次 30 秒。
- 滤干多余的液体，把膜放到纸巾上，避光，干燥。

VIII. 实验案例

使用单克隆抗体检测的情况下，两种 ONE-HOUR Western™ blot Kit 不同灵敏度的比较：

两张相同的 blots 用同样的方法操作，分别使用不同的 ONE-HOUR Western™ Kits: Standard (L00205C) 和 Advanced (L00242)。使用 10 μg 和 2.5 μg THE™ Anti-GST 鼠单克隆抗体 (Genscript, A00865)，分别用两种试剂盒检测 GST 蛋白。

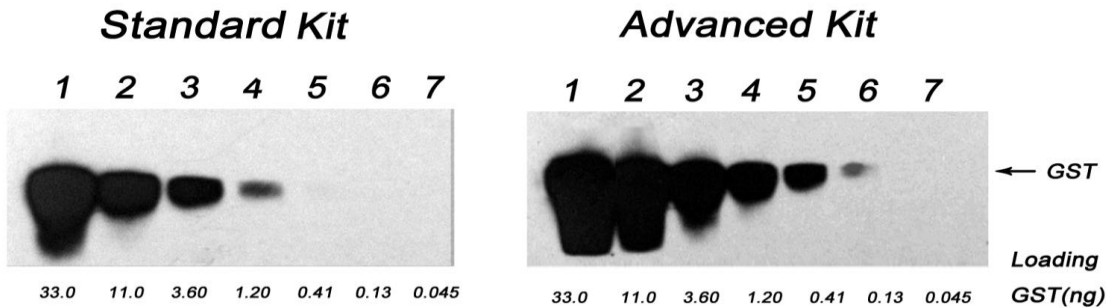


Figure 1. Western blots for the detection of GST protein by ONE-HOUR Western™ using different ONE-HOUR Western™ Kits: Standard (L00205C) and Advanced (L00242). 33.0, 11.0, 3.60, 1.20, 0.41, 0.13 and 0.045 ng of GST protein were loaded into Lanes 1, 2, 3, 4, 5, 6, and 7 respectively.

使用多克隆抗体检测的情况下，两种 ONE-HOUR Western™ blot kit 不同灵敏度的比较：

两张相同的 blots 用同样的方法操作，分别使用不同试剂盒，ONE-HOUR Western™ Kits: Standard (L00204C) 和 Advanced (L00241)。使用 10 μg 和 2.5 μg Anti-GST 兔多克隆抗体 (Genscript, A00097)，分别用两种试剂盒检测 GST 蛋白。

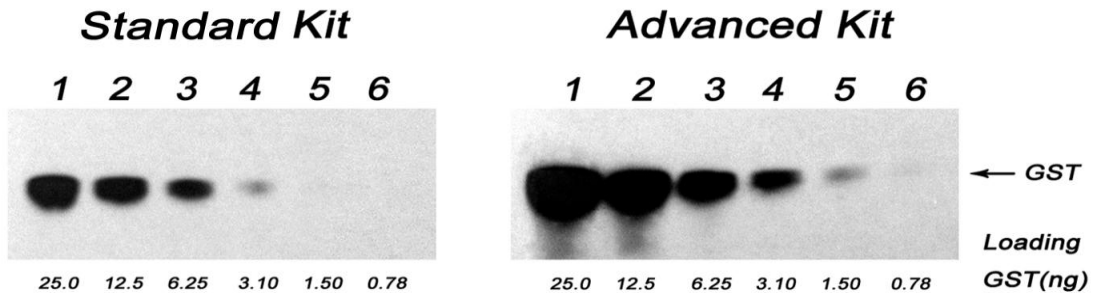


Figure 2. Western blots for the detection of GST protein by ONE-HOUR Western™ using different ONE-HOUR Western™ Kits: Standard (L00204C) and Advanced (L00241). 25.0, 12.5, 6.25, 3.10, 1.50 and 0.78 ng of GST protein were loaded into Lanes 1, 2, 3, 4, 5, and 6 respectively.

IX. 常见问题及解决办法

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（含有mixture 1的WB-2）中的孵育时间。 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，相应的减少 WB-1 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 pretreat A-b (M01052)。 客户还可以使用 Quick Block Optimization kit 来找到最佳的封闭试剂。
	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。

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 84347348
 传真：025-84347334 84347319
 Email: order@genscript.com.cn
 Web: www.genscript.com.cn