

ONE-HOUR Western™ Kit

技术手册 No. 0352

版本 201807

I	产品描述.....	1
II	ONE-HOUR Western™ Kit 选购指南.....	2
III	试剂盒组分	3
IV	相关产品	3
V	主要特色	4
VI	储存条件	4
VII	实验步骤	4
VIII	实验案例	6
IX	常见问题及解决办法.....	7

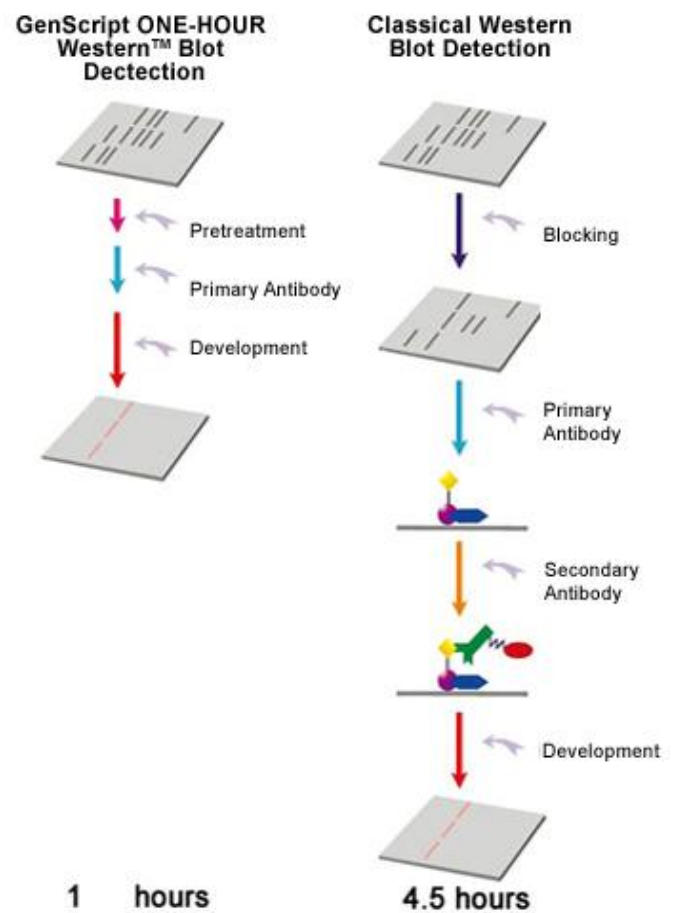
I. 产品描述

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 blot 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 预处理，在 WB-2 solution 中加入 Mixture 1（一抗与 WB-1 的预混液），将预处理后的膜放入孵育 40 min，洗膜三次，每次 5~10 min，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。

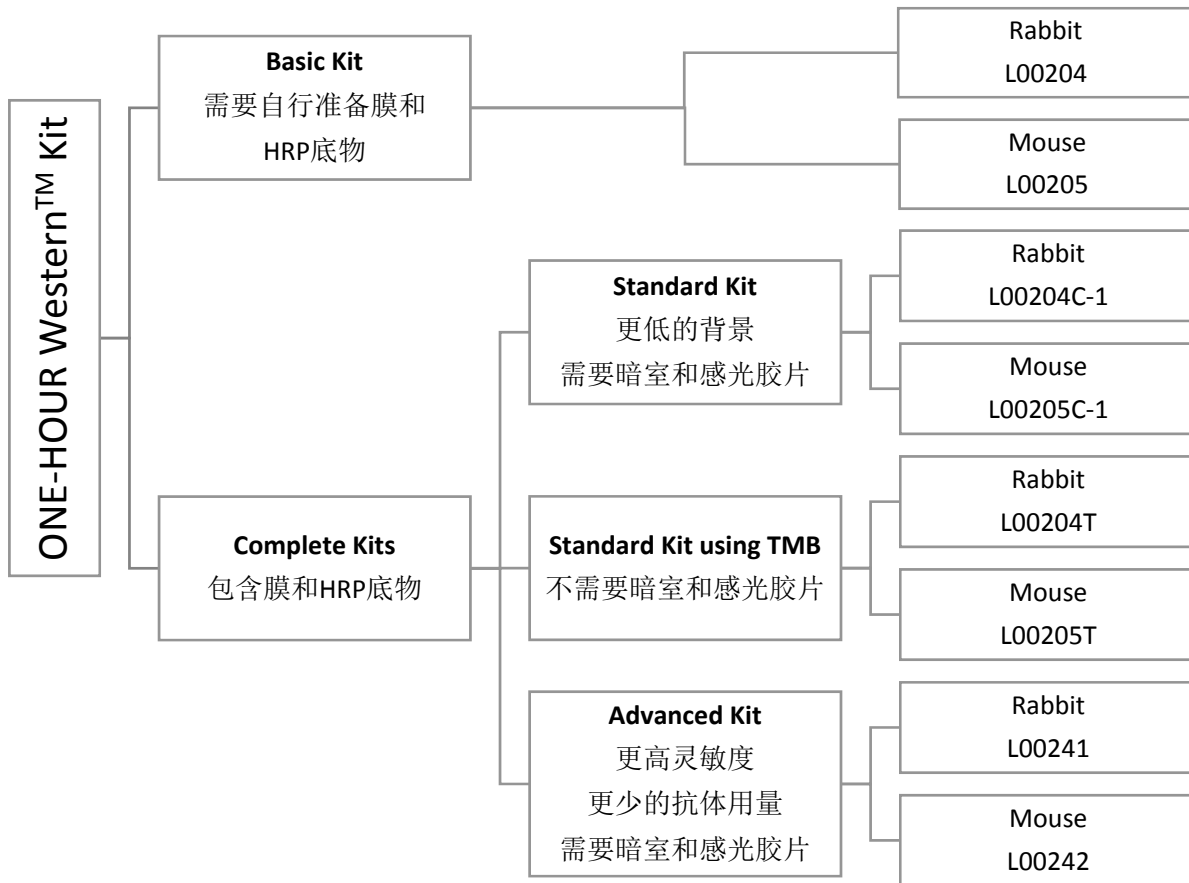
ONE-HOUR Western™ 试剂盒的高信号低背景的设计方案，可以对蛋白进行高效、清晰的 Western blot 分析。

除 Basic 试剂盒外，Standard 试剂盒和 Advanced 试剂盒都包含了必需试剂、缓冲液和实验材料，如膜，HRP 底物等，客户只需准备一抗。

ONE-HOUR Western™ 试剂盒能够有效节约您宝贵的实验时间。为了提高效率，我们推荐 Standard 试剂盒和 Advanced 试剂盒。



II. ONE-HOUR WESTERN™ KIT 选购指南



	Standard 试剂盒	Advanced 试剂盒
灵敏度	高	很高
一抗用量	2-10 μ g	0.5-2.5 μ g
实验用时	1.25 小时	1.25 小时

III. 试剂盒组分

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

Components	Complete Kits			Basic Kits
	Advanced Kit	Standard Kit using TMB	Standard Kit	
Pretreat A Solution	50 ml	50ml	50 ml	50 ml
Pretreat B Solution	50 ml	50 ml	50 ml	50 ml
WB-1	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)	5 sheets	5 sheets	5 sheets	
ChromoSensor™ One-Solution TMB Substrate		15 ml		
LumiSensor™ Chemiluminescent HRP Substrate			2 x 7.5ml	
LumiSensor™ Super Chemiluminescent HRP Substrate	2 x 7.5 ml			
User Manual	1	1	1	1

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

IV. 相关产品

Product	Cat. No.
Western Quick Block Kit	L00276
LumiSensor™ Chemiluminescent HRP Substrate Kit	L00221V60
LumiSensor™ Chemiluminescent HRP Substrate Kit	L00221V300
LumiSensor™ Chemiluminescent HRP Substrate Kit	L00221V500
WestClear™ Nitrocellulose Membrane	L00224A60
ChromoSensor™ One-Solution TMB Substrate	L00222V125
ChromoSensor™ One-Solution TMB Substrate	L00222V250
ChromoSensor™ One-Solution TMB Substrate	L00222V500
5X Wash Solution For One-Step Western Kits	MB01011
Pretreat A(50 ml) & B(50 ml) Solution	M01013
Western Membrane Forceps	M00099
Western Wash Box (Blue)	M00101
Western Wash Box (Black)	M00103

V. 主要特色

操作方便：只需一步即可完成 Western blot 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 2 年。

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℃。

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℃）温育至沉淀全部溶解。

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混匀，室温下孵育至少 40 min。

Mixture 1 制备比例与试剂盒对照表

Mixture 1	L00204, L00205	L00204T, L00205T	L00204C-1, L00205C-1	L00241, L00242
WB-1	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: 一抗比例	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

* 请根据抗体提供者的建议使用适量的抗体。如果使用 Advanced 试剂盒，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 Western blot 盒混合 10 ml pretreat A solution 和 10 ml pretreat B solution，制备成 pretreat solution（现配现用）。

将膜放入 pretreat solution，置于摇床在室温条件下孵育 5 min。
 孵育后，用 1X wash solution 将膜冲洗两次，每次 15 ml。

3. 膜的孵育

- 在 Western blot 盒中加入 10 ml WB-2 solution 和全部 mixture 1，混匀，使膜充分浸泡在混合液中，置于摇床在室温条件下孵育 40 min。
 Mixture 1 和 WB-2 solution 的混合液在 4℃ 条件下保存，可以重复使用三次，但可能出现抗体浓度改变或者背景增高等不利变化，影响实验结果。
- 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 5~10min（如果是使用 TMB 底物进行显色，每次只需要洗膜 5 min）。每次洗膜都需使用清洁的容器，避免污染，从而降低背景。

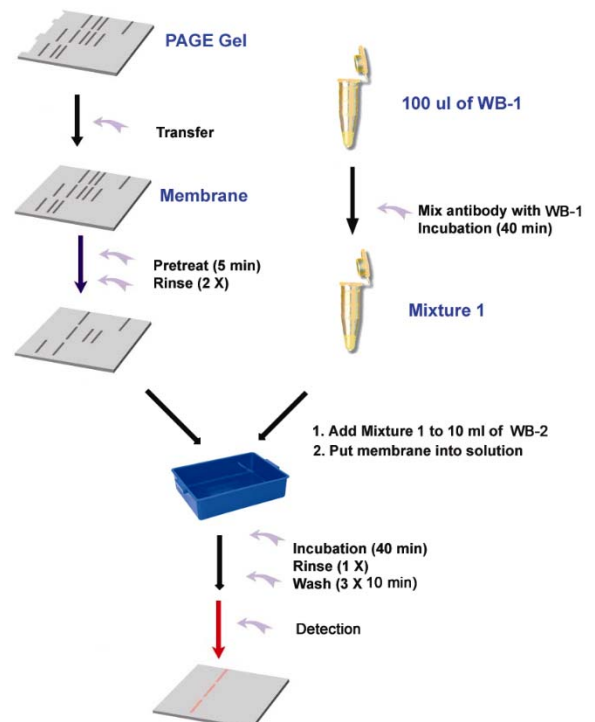
4-1. Chemiluminescent HRP 底物显影

- 如果使用 LumiSensor™ Chemiluminescent HRP Substrate，将 reagent A 和 reagent B 混匀，制备成工作液。
 混合好的工作液能够在室温避光条件下保存数小时。

工作液制备比例与试剂盒对照表（每 cm²膜需要 0.05ml 工作液）

Working Solution Preparation	L00204C-1, L00205C-1	L00241, L00242
Reagent A	1.5 ml	1.5 ml
Reagent B	1.5 ml	1.5 ml
Total Volume	3.0 ml	3.0 ml

- 用镊子夹起膜，使膜竖起，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，用工作液覆盖膜。
- 室温条件下孵育膜 3 min。
 把膜置于柔软、清洁吸水纸上，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。
 也可用化学发光成像系统直接获取孵育结果。



4-2. TMB 底物显色

- ChromoSensor™ One-Solution TMB Substrate 是即用型工作液（每 cm²膜需要 0.05ml 工作液）。
 用镊子夹起膜，使膜竖起，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。
- 室温条件下孵育膜 5~10 min，直到出现适当的颜色。把膜置于 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，把膜放到干净的纸巾上，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 Kits 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-1) 和 Advanced (L00242)。使用 10 μ g 和 2.5 μ g THE™ Anti-GST 鼠单克隆抗体 (Genscript, A00865)，分别用两种试剂盒检测 GST 蛋白。

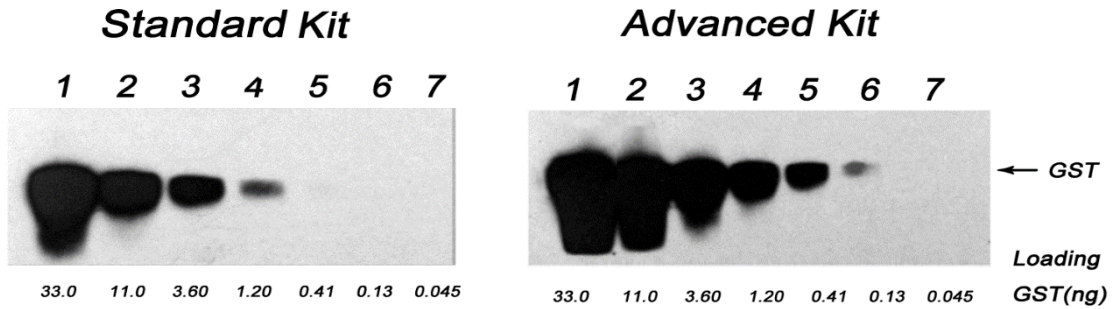


Figure 1. 分别用 ONE-HOUR Western™ Kits: Standard (L00205C-1) 和 Advanced (L00242) 检测 GST 蛋白。泳道 1 至泳道 7，GST 蛋白的上样量依次为 33.0ng, 11.0ng, 3.60ng, 1.20ng, 0.41ng, 0.13ng, 0.045ng。

使用多克隆抗体检测的情况下，两种 ONE-HOUR Western™ blot kits 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-1) 和 Advanced (L00241)。使用 10 μ g 和 2.5 μ g Anti-GST 兔多克隆抗体 (Genscript, A00097)，分别用两种试剂盒检测 GST 蛋白。

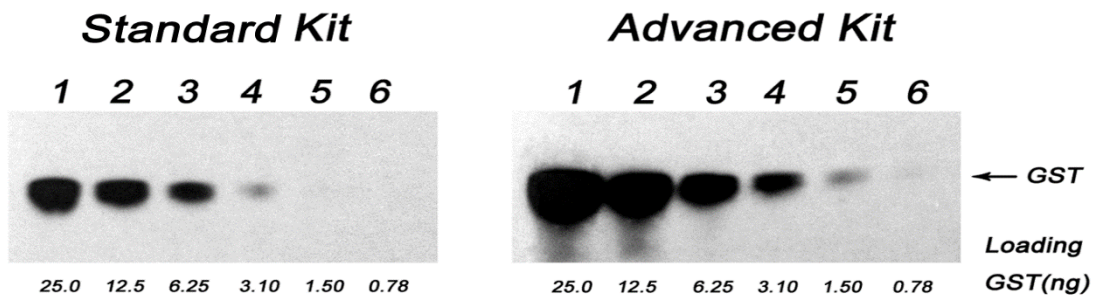


Figure 2. 分别用 ONE-HOUR Western™ Kits: Standard (L00204C-1) 和 Advanced (L00241) 检测 GST 蛋白。从泳道 1 至泳道 6，GST 蛋白的上样量依次为 25.0ng, 12.5ng, 6.25ng, 3.10ng, 1.50ng, 0.78ng。

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 solution）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	客户可以使用 Western Quick Block 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。

For Research Use Only.

南京金斯瑞生物科技有限公司
 江苏省南京市江宁科学园雍熙路 28 号，邮编 211100
 客服热线：025-58897288-5810
 订购邮箱：product@genscript.com.cn
 公司主页：<http://www.genscript.com.cn>