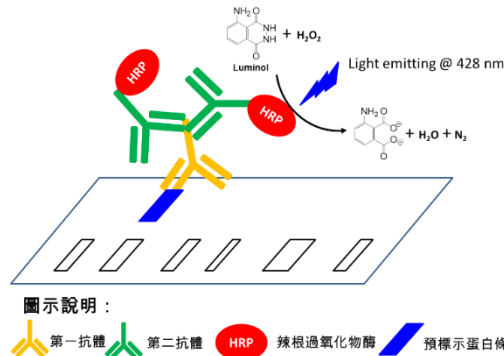


WestShow®

ECL 西方轉漬法冷光基質使用說明

ECL Western Blotting Substrate Instructions

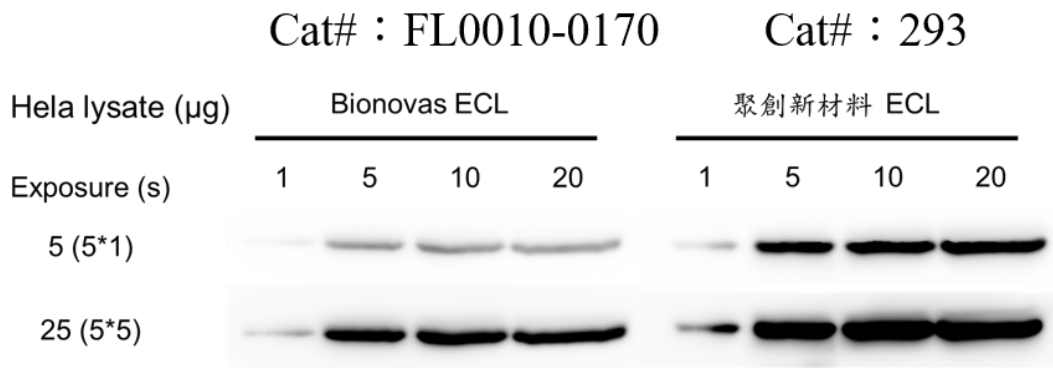
產品介紹



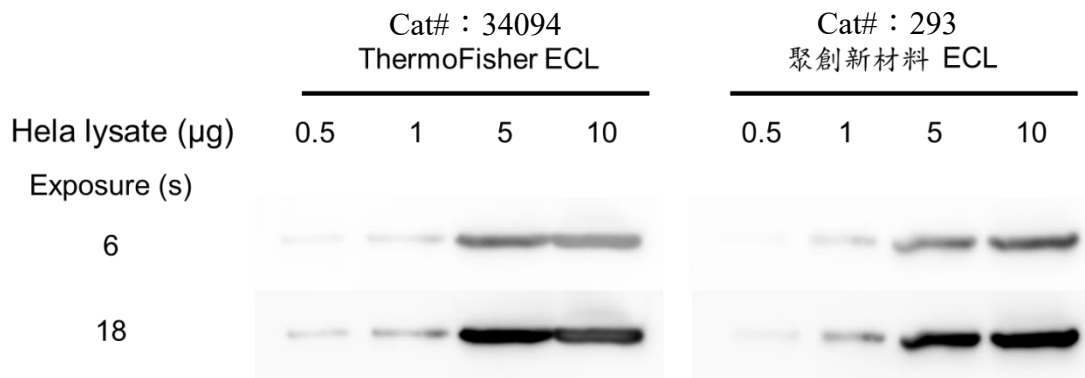
圖一 西方轉漬法冷光放光原理說明圖

如圖一，蛋白混合物以電泳分開後，將欲標示蛋白以專一性一級抗體結合，再摻入以辣根過氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)修飾之二級抗體，並與一級抗體結合。HRP 在雙氧水的存在下，催化魯米諾(Luminol)，產生藍色(428 nm)波長光線，利用數位相機觀測，或 X-光底片曝光，即可觀測到標示蛋白質條帶。

本產品由我們自行研製，完全在台灣生產製造，產品效能與試劑靈敏度媲美國外大廠(圖二與圖三)，更重要的是，我們價格優惠，是您在研究上最好的選擇。



圖二 本產品與國外大廠效能比較結果



圖三 本產品與國外大廠效能比較結果

套組運送與保存資訊

產品名稱	運送資訊	包裝開封前保存資訊
------	------	-----------

WestShow (貨號：293)	室溫運送	4 °C 冷藏保存。正確保存狀況下，可存放半年。
----------------------	------	--------------------------

注意：產品可能因為運送或存放溫度過低，而使溶液中緩衝鹽類析出，可在室溫下放置一段時間後，稍微搖晃，即可恢復。此現象並不會影響產品效能。

使用者須自行準備材料

1. 蛋白質轉漬之 PVDF 或是硝化纖維素薄膜 (NC membrane)。
2. TBS 阻斷液或是 PBS 阻斷液 (詳細配置說明請參考下述使用步驟)。
3. TBST 沖洗液 (詳細配置說明請參考下述使用步驟)。
4. 一級抗體稀釋液：將一級抗體以所使用之阻斷液稀釋。
5. 二級抗體 (與 HRP 結合) 稀釋液：將二級抗體以所使用之 TBST 沖洗液稀釋。

使用步驟

1. 蛋白質轉漬後，從轉移裝置上取下薄膜，並用阻斷液，阻斷非特異性位點：將薄膜浸泡在阻斷液中，在室溫下振盪孵育 1 小時，或在 4°C、靜置過夜。
注意：阻斷液可選用 TBS 阻斷液：TBS 緩衝液、0.05-0.1% Tween 20 水溶液和 2-5% 牛血清白蛋白 (BSA) 水溶液；或是，PBS 阻斷液：PBS 緩衝液、0.05-0.1% Tween 20 水溶液和 2~5% BSA 水溶液。
注意：根據所使用的一級抗體，可將阻斷液中的 BSA 水溶液置換成 5% 的脫脂奶粉水溶液。
2. 移除阻斷溶液，並添加稀釋的一級抗體稀釋液。在室溫下振盪孵育 1 小時。
3. 使用 TBS 緩衝液和 0.05~0.1% Tween 20 水溶液之混合沖洗液 (TBST 液) 洗滌 3 次，每次洗滌 5 分鐘。
4. 將薄膜與稀釋的二級抗體 (與 HRP 結合) 稀釋液在室溫下溫和振盪 1 小時。
5. 用 TBST 液洗滌 3 次，每次洗滌 5 分鐘。增加清洗次數，可能有助於降低背景。
6. 配置工作液：混合**等體積**的魯米諾水溶液(藥劑 A，黑色罐身)和過氧化氫水溶液(藥劑 B，白色罐身)來製備工作溶液。視盛裝薄膜的容器大小，混合恰好足以覆蓋膜的工作液，例如，每 7 cm × 8.5 cm 薄膜約需 7 ml 的工作液；8.5 cm x 13.5 cm 薄膜約需 12 ml 的工作液)。
注意：雖然工作液在室溫下約可保持 1 小時的穩定性，但為了獲得最佳實驗結果，混合後應立即使用工作溶液。
7. 將工作液倒入盛裝薄膜的容器中，工作液須覆蓋過薄膜，在室溫、靜置下將薄膜孵育 1 - 5 分鐘。
8. 從工作溶液中以鑷子取出薄膜，用吸水紙巾將多餘的工作液吸乾，然後以透明塑料保護膜包覆。
9. 在具有安全光線的暗房中，將覆蓋的薄膜放在底片盒中，轉印蛋白面朝上。將 X 射線底片放在薄膜的上方，曝光 1 分鐘。可以增加或減少曝光時間以獲得最佳結果；或是直接以數位照相設備觀測條帶。冷光在反應後立即發出冷光，並隨時間增加逐漸減少。

困難排除

問題點	可能原因	解決方式
高背景	阻斷不完全	提高阻斷液中 BSA 或脫脂奶粉的濃度；或是延長阻斷時間。
	洗滌不完全	增加洗滌次數，洗滌時間。

	一級或是二級抗體濃度太高	<ol style="list-style-type: none"> 1. 降低一級或是二級抗體濃度。 2. 可另外使用單點轉漬方式，測試最佳的一級與二級抗體濃度。
出現中空的條帶(甜甜圈狀條帶)	欲標示之蛋白區域，冷光基質消耗殆盡	<ol style="list-style-type: none"> 1. 欲標示之蛋白濃度太高，使連結的 HRP 濃度太高，冷光基質消耗殆盡。可以降低一級抗體，或是二級抗體濃度。 2. 將低蛋白樣品的濃度。
沒有訊號，或是訊號微弱	清洗過程中，蛋白從薄膜上被清洗下來	降低洗滌次數，洗滌時間。
	蛋白與薄膜間吸附力不佳	<ol style="list-style-type: none"> 1. 降低一級與二級抗體的濃度。 2. 在轉漬後，將凝膠染色，測試殘存蛋白的量，以確認轉漬的效果。 3. 一些全蛋白染劑，像是氨基黑(amido black)，奈米金(Colloidal gold)，可能會影響一級抗體與蛋白的結合，須謹慎使用。 4. 調整阻斷液。脫脂奶粉水溶液可能會造成靈敏度下降；BSA 水溶液或許可以提高靈敏度，但也有可能造成背景值太高，或是抗體與蛋白的非特異性結合。
	蛋白與第一抗體結合不佳	<ol style="list-style-type: none"> 1. 介面活性劑(Tween 20)可能造成蛋白與第一抗體的結合性不佳。可降低濃度，或是完全移除介面活性劑來進行測試。 2. 增加一級抗體的孵育時間。
	不合適的試劑添加量	改變阻斷液、抗體稀釋液或是沖洗液體積。
	HRP 失效	<ol style="list-style-type: none"> 1. 測試 HRP 的活性。 2. HRP 在固定的 pH 下，反應性相當強。在加入工作液前，請確定過量的沖洗液已經移除。 3. 疊氮化鈉(NaN_3)可能會抑制 HRP 的活性。須注意抗體保存液中，是否含疊氮化鈉。
應該出現訊號處卻呈現空白	操作過程中，薄膜可能有乾掉的情況	轉漬過程中，或是冷光基質呈色過程中，避免操作不當，使氣泡貼附在薄膜上，造成呈色不均。

- *感謝國立清華大學生命科學系選用本產品。
- *感謝國立成功大學醫學院生化所選用本產品。
- *感謝長庚醫院選用本產品。

聚創新材料股份有限公司

IMT Formosa New Materials Co., Ltd.

電話 Phone: 0926-159317

電郵 Email: polycreatives@outlook.com

聯絡人 Contact: Peter Hsu

