



中科瑞泰（北京）生物科技有限公司

Tel: 400-699-0631

http:// www.real-tims.com.cn

E-mail: real-times@vip.163.com

Western 一抗二抗去除液（强碱，剧烈型）

货号	名称	规格
WS1100-100ml	Western 一抗二抗去除液（强碱，剧烈型）	100 ml
WS1100-500ml	Western 一抗二抗去除液（强碱，剧烈型）	500 ml

● 产品简介：

Western 一抗二抗去除液（强碱，剧烈型）(Western Antibody Stripping Buffer, basic, harsh type) 可以高效去除印迹膜上的一抗和二抗，而吸附在膜上的抗原基本不受影响，用于 Western 中转移了蛋白膜的重复利用，可以转一次膜，做多次 Western 印迹实验，通常可以重复利用膜 3-5（PVDF 膜）。使用本试剂只需大约 5-10 分钟（NC 膜）或 15-20 分钟（PVDF 膜）即可实现蛋白膜的重复使用，然后可以进行 Western 的后续操作。

该产品具有以下几个优点：

1. 可用于昂贵或珍稀样本的多次杂交；
2. 有利于用不同抗体分析单次印迹上的不同蛋白，比如不同亚型的抗体；
3. 有利于对异常结果进行重新分析或确认；
4. 有利于纠正孵错的抗体；
5. 节约试剂成本，并节约时间。

● 贮存：

常温贮存，有效期一年；常温运输。

● 用前必读：

1. 理想的抗体去除液应该是洗脱抗体的同时，不洗脱膜上结合的蛋白或者不改变抗原的结合性质，但是目前没有一种去除液可以做到只洗脱抗体，而完全不洗脱膜上结合的抗原；也没有一种去除液可以适用于所有不同亲和度的抗原抗体复合物。去除液洗脱能力太强，抗原也容易被洗脱；太弱，则抗体残留太高。因此，从免疫印迹膜上去除抗体的方案仅能用于定性用途，因为在每个抗体清除循环中，或多或少都将洗去少量膜上的蛋白。
2. PVDF 膜比硝酸纤维素膜（NC 膜）更坚韧，因此优先推荐使用 PVDF 膜用于涉及抗体剥离的实验。
3. 从 SDS-PAGE 凝胶转印完成后立即干燥 PVDF 膜或 NC 膜，可改善蛋白质与膜的结合，特别推荐用于涉及多次抗体剥离的实验。在第一轮抗体检测之前，必须使用甲醇将干燥的 PVDF 膜润湿或用 1×TBST 将干燥的 NC 膜润湿。**已经结合有抗体的膜，决不能使得膜干燥，否则抗体分子将与膜结合紧密，很难剥离。**因此，在做完一轮 ECL 发光检测实验后，需要用清除液清除掉膜上的抗体，推荐将膜浸泡于 1×TBS（非 1×TBST）中 4 度保存。
4. 检测时，优先检测低丰度抗原：先孵育条带较弱（表达较低）的蛋白，再孵育条带明显（表达较高）的蛋白，最后再孵育内参。

5. 如条件允许，下一轮的抗体杂交实验选择种属来源不同的一抗（对应不同种属的二抗），减少检测的交叉反应。
6. 该清除液适用于 ECL 发光检测的膜上抗体清除，不适合于膜上直接显色（DAB, BCIP/NBT 等），不适合荧光检测。

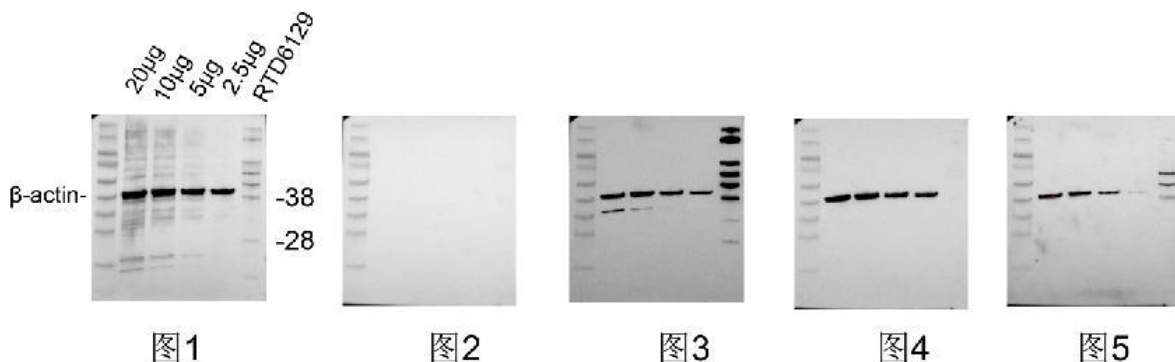
● 使用说明：

1. 在完成 Western 化学发光检测后，NC 膜或 PVDF 膜用适量蒸馏水中震荡漂洗 5 分钟；重复漂洗 2 次。
2. 弃蒸馏水，加入适量的 Western 一抗二抗去除液，在摇床上震荡漂洗清除抗体。
孵育温度和时间会明显影响抗体去除效果，参照下表调整。

膜类型	操作温度	震荡清除时间	备注
NC 膜	18℃	15 分钟以上	冬天实验室气温低时
	25℃	5-10 分钟	常规样品操作
PVDF 膜	18℃	25 分钟以上	冬天实验室气温低时
	25℃	15-20 分钟	常规样品操作

3. 弃去除液，加入足量蒸馏水，在摇床上漂洗 2 次，每次 5 分钟，把去除液彻底漂洗干净。
注：残余的去除液会影响后续抗原抗体的结合。
4. 可选步骤：漂洗后的转印膜孵育 ECL 发光液，检测二抗的清除效率。曝光 5 分钟，膜上看不到发光条带表明二抗清除得比较干净。如果膜上能看到条带，重复步骤 2-3。
5. 继续进行 Western 的后续操作（封闭-抗体孵育-发光检测）。
注：建议每次膜剥离后都要进行重新封闭，以降低背景。优先选用 5% 脱脂奶粉（货号：WN1070）封闭，推荐常温封闭 1 小时；使用 Western 无蛋白快速封闭液（货号：PF1070）时，NC 膜需要封闭 60 分钟；PVDF 膜可以封闭 10 分钟。

● 实验示例：



Western 一抗二抗去除液（碱性，剧烈型）检测效果图

Western 一抗二抗清除液（碱性，剧烈型）检测效果图

样品：K562 细胞，SDS 裂解液（货号：RL1060）提取总蛋白；

电泳：4-20% RealPAGE 预制胶（货号：RTD6117-0420），200 V 1×TGS 56 min

转膜：NC 膜，1×RealBlot 快速转膜液（货号：RT5020）400 mA 40 min

图 1：5% 脱脂奶粉封闭液（货号：WN1070）RT 60 min；一抗：Santa β-Actin 鼠单抗（SC-47778）

1:2000 RT 60min; 二抗: 羊抗鼠 IgG-HRP 1:5000 (货号: HGM1060) RT 60min; ECL 自动曝光 3 秒

图 2: 膜加入 Western 一抗二抗清除液 (碱性, 剧烈型), 第 1 次清除, 常温 25 度, 摇床 5 min, ECL 自动曝光 5 分钟, 膜上二抗条带去除干净。

图 3: 5%脱脂奶粉封闭液 (货号: WN1070), 常温摇床 60 分钟, PCNA 1:5000 (货号: APM5012) RT 60min, 羊抗鼠 IgG-HRP 1:5000 (货号: HGM1060) RT 60min, 自动曝光 11 秒, β -actin 和 PCNA 同时有条带, 说明图二中 actin 一抗没有完全去除干净。

图 4: 膜加入 Western 一抗二抗清除液 (碱性, 剧烈型), 常温 24 度 5 min 第 2 次清除抗体, Western 无蛋白快速封闭液 (货号: PF1070) RT 60 分钟, 一抗: Santa β -Actin 鼠单抗 (SC-47778) 1:4000 RT 60min, 羊抗鼠 IgG-HRP 1:5000 (货号: HGM1060) RT 60min; ECL 自动曝光 6 秒。

图 5: 膜加入 Western 一抗二抗清除液 (碱性, 剧烈型) 第 3 次清除 26 度 5min,

一抗: Santa β -Actin 鼠单抗 (SC-47778) 1:4000 RT 60min;

二抗: 羊抗鼠 IgG-HRP 1:5000 (货号: HGM1060) RT 60min; ECL 自动曝光 3 分钟。