

产品概述

DAB Peroxidase Substrate Kit 是我公司研发的 HRP-DAB 底物显色试剂盒产品。本产品含有检测辣根过氧化物酶（HRP）的所有试剂。适合于 Western Blot 杂交的 PVDF 膜、NC 膜的染色。DAB（3,3'-N-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride）是辣根过氧化物酶（HRP）的常用底物，在辣根过氧化物酶的催化下，DAB 会产生不溶于水和乙醇的棕色沉淀。经免疫反应固定的 HRP 可以催化底物 DAB 在目的蛋白所在的位置转变为棕色化合物，可根据颜色反应来确定目的蛋白的位置及表达情况。

试剂组成

Components	BR4D601-01 60 mL
20×DAB-A	3 mL
1×DAB-B	60 mL

保存条件

2-8℃避光存储。

注意事项

1. 本产品仅作科研用途，不用于临床诊断。
2. DAB 可能具致癌性，请小心操作，避免直接接触。
3. 工作液用量必需充足，保证完全覆盖印迹膜。
4. 显色后若背景太深，可以考虑延长封闭时间，避免非特异性染色，或者缩短 DAB 的显色时间。显色后若显色太弱或没有显色，可以考虑增加一抗或二抗的浓度，或者适当延长显色时间。
5. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

实验流程

1. 配制完整的 DAB 显色工作液，每毫升 1×DAB-B 中加入 50 μL 20×DAB-A，混匀；配制好的溶液应避光存放，30 min 内有效使用。
2. 混匀后加至膜上，室温避光显 1-30 min；若无背景出现则可继续显色；显色后用蒸馏水洗涤以终止反应。
3. 观察，拍照。

常见问题和解决方案

1. 背景显色太深

封闭不充分：免疫组化时，未使用合适的封闭液或封闭时间不足，会导致非特异性结合增加，背景显色加深。建议选用适当的封闭液，或延长封闭时间。

抗体非特异性吸附: 如果抗体选择不当可能会产生非特异性吸附。建议选购优质的一抗和二抗, 以减小非特异性结合。

显色时间过长或二抗浓度过高: 过长的显色时间或过高的二抗浓度会使非特异性显色增加。建议缩短显色时间, 或降低二抗浓度。

洗涤不充分: 洗涤不彻底会导致残留的抗体或杂质与 DAB 反应, 使背景显色加深。建议选择适当强度的洗涤液, 或延长洗涤时间。

2. 没有显色或显色太弱

抗体浓度过低: 一抗或二抗浓度过低, 会导致与抗原的结合量减少, 显色信号减弱。可适当提高一抗或二抗的浓度, 并检测二抗效果, 如滴一滴稀释二抗在膜上, 观察是否可以被正常显色。

检测体系不灵敏: 现有的检测体系可能不够灵敏, 无法检测到低表达的抗原。可考虑使用更加灵敏的检测体系或者加大上样量。

显色时间过短: 显色时间不足, 会导致 DAB 与辣根过氧化物酶的反应不充分, 显色信号较弱。建议适当延长显色时间。

3. 显色不均匀

试剂分布不均匀: 试剂未完全覆盖样本, 边缘的试剂容易首先变干, 浓度较中心高而致染色深, 或由于气泡导致的着色不均匀。试剂滴加后, 应检查试剂是否分布均匀, 可使用枪头将试剂引流开使之将样本全部覆盖。若滴加时易产生气泡, 则滴加试剂时手法要轻, 有气泡时用枪头捅破。

DAB 染色液未混匀: DAB 在样本上的浓度不一致, 导致染色不均匀。显色液应充分混匀, 加完显色液后建议将膜来回左右晃动, 使膜上所有区域的底物浓度一致。