

产品名称: 2h 极速 WB 即用型全流程试剂盒

产品货号: RA10020

产品概述

Western Blot (WB) 作为免疫学核心实验, 常因流程复杂、耗时漫长 (通常需 1-2 天) 成为科研人员的痛点。EnkiLife 在快速 WB 试剂盒 (RA10021) 基础上进一步优化, 推出 2h 极速 WB 即用型全流程试剂盒。本试剂盒包含完整实验所需绝大部分试剂与耗材, 用户仅需自备水、乙醇/甲醇、常用抗体及相关设备。通过深度优化的试剂与流程, 我们将实验时间大幅缩短至最快仅需 110 分钟, 显著提升效率。即用型设计, 尤其为实验新手和时间紧迫的研究者带来突破性的便捷选择。

产品组分

试剂盒组分	保存条件	90T	30T	15T
蛋白上样缓冲液(5X)	-20℃	0.5ml	0.2ml	0.1ml
预染 Marker (8-180kDa)	-20℃	60ul	20ul	10ul
预制胶(Bis-Tris, 4-20%,15 孔)	4℃	6 块	2 块	1 块
电泳缓冲液颗粒	RT	6 袋(500ml/袋)	2 袋(500ml/袋)	1 袋(500ml/袋)
PVDF 膜 (0.45um)	RT	6 片	2 片	1 片
免滤纸转膜海绵垫	RT	12 片 (2 包)	4 片	2 片
快速转膜液颗粒	RT	6 袋(1L/袋)	2 袋(1L/袋)	1 袋(1L/袋)
无蛋白快速封闭液	4℃	60ml	20ml	10ml
快速抗体稀释液	4℃	40ml	16ml	8ml
快速洗涤液 (10X)	4℃	40ml	14ml	7ml
ECL 发光液 A	4℃	3.5ml	1.2ml	0.6ml
ECL 发光液 B	4℃	3.5ml	1.2ml	0.6ml
说明书	-	1pcs	1pcs	1pcs

有效期说明:

蛋白上样缓冲液及预染 Marker 在-20℃保存、其他试剂 4℃保存, 有效期 1 年;

全套试剂若均在 4℃保存, 有效期至少 3 个月。

(预制胶需 4℃ 保存, 切勿置于 0℃ 以下)

操作流程

(实验前需自备试剂: 纯水 1.8L, 无水甲醇 20ml, 无水乙醇 100ml, 样本, 一抗, 二抗)

1. 样本处理

在裂解好的样本中加入 1/4 体积的蛋白上样缓冲液(5X)并混匀, 沸水浴加热 **5min**。

⚠ 水浴后高速离心 5min 取上清可确保样本纯净, 避免沉淀影响电泳效果。

产品名称: 2h 极速 WB 即用型全流程试剂盒

产品货号: RA10020

2. 电泳

2.1 配制电泳液

取约 400ml 纯水+ 1 袋电泳缓冲液颗粒, 搅拌溶解, 加纯水定容至 500ml。

2.2 安装预制胶

撕掉预制胶(Bis-Tris, 4-20%, 15 孔) 底部密封胶带, 缓慢拔出梳子, 将预制胶短胶板朝内固定在电泳槽中。

⚠ 若您的 U 型密封条顶部有突起结构, 则需将密封条取出后反向安装, 以使平滑面朝外。

2.3 加入电泳液

内槽: 加满浸没点样孔; 外槽: 加 1/3 体积 (液面不超胶板)。双胶电泳需 500ml。

2.4 样本上样

取步骤 1 样本, 将吸头垂直插入上样孔, 缓慢打出样本, 避免戳破凝胶。

⚠ 推荐上样量为 5-20 μ l/孔, 最大 25 μ l/孔。

2.5 加 Marker

按上述步骤加入预染 Marker (8-180kDa), 推荐用量为 2-5 μ l/孔。

⚠ Marker 为即用型, 禁止煮沸, 分子量依次为 8/16.5/25/31/41/52/72/95/130/180kDa。

2.6 电泳

盖槽盖, 接通电源, 推荐电压 140-150V (≤ 180 V) 运行 **40-50 min**。

⚠ 实际电泳时间以溴酚蓝到达胶底端或预染 Marker 分离充分即可停止电泳。

3. 转膜

3.1 配制转膜液

1 袋快速转膜液颗粒+ 800ml 纯水混匀; 加 100ml 无水乙醇/甲醇混匀; 加纯水定容至 1L。

3.2 活化 PVDF 膜

揭掉膜两侧浅蓝色保护纸, 用干净镊子轻轻夹取白色 PVDF 膜边缘处, 放在甲醇溶液中浸泡活化 **1min**。

3.3 平衡膜及海绵垫

免滤纸转膜海绵垫和活化后的膜在转膜液中室温浸泡平衡 **3-5min**。

3.4 平衡凝胶

用镊具小心插入胶板之间的空隙, 直至胶板两侧完全分开, 取出凝胶在转膜液室温平衡 **3-5min**。

3.5 装配转印夹

打开转印夹, 从负极(黑面)依次铺: 海绵垫→凝胶→PVDF 膜→海绵垫, 锁紧转印夹。

⚠ 彻底赶走胶与膜之间的气泡。

3.6 转膜

转印夹插入转印槽, 加转膜液完全浸没转印槽, 400mA 恒流室温转膜 **20-30min**。

4. 膜封闭

将转印好的 PVDF 膜放入含 10ml 无蛋白快速封闭液的孵育盒, 置于摇床室温摇动封闭 **10 min**。

产品名称: 2h 极速 WB 即用型全流程试剂盒

产品货号: RA10020

5. 一抗孵育

5.1 配制一抗工作液

按一抗说明书比例用快速抗体稀释液稀释一抗。(Enkilife 可提供上万种优质一抗)

5.2 孵育一抗

吸弃步骤 4 封闭液, 加 3-5ml 一抗工作液, 室温摇床孵育 **15min**。

△ 未使用快速抗体稀释液需室温 90min 或 4℃过夜, 裁切后的膜可以适当减少一抗工作液用量。

6. 一抗洗涤

6.1 配制洗涤液

1 体积的快速洗涤液 (10X) + 9 体积纯水混匀。

6.2 洗涤

吸弃孵育盒内的一抗, 加 10ml 洗涤液摇洗 **0.5min**, 重复 3 次, 每次彻底吸弃旧液。

△ 一抗可回收使用 1-2 次, 裁切后的膜可以适当减少洗涤液用量。

7. 二抗孵育

7.1 配制二抗工作液

按二抗说明书比例用快速抗体稀释液稀释二抗。(Enkilife 可提供多个种属的优质二抗)

7.2 孵育二抗

吸弃洗涤液, 加 3-5ml 二抗工作液, 室温摇床孵育 **5min**。

△ 未使用快速抗体稀释液需室温 60min 或 4℃过夜, 裁切后的膜可以适当减少二抗工作液用量。

8. 洗涤二抗

吸弃孵育盒内的二抗, 加 10ml 洗涤液摇洗 **0.5min**, 重复 3 次, 每次彻底吸弃旧液。

△ 二抗可回收使用 1-2 次, 裁切后的膜可以适当减少洗涤液用量。

9. 显色曝光

9.1 配制 ECL 工作液

取 0.5ml ECL 发光液 A 和 0.5ml ECL 发光液 B 混匀, 配制成 1ml ECL 工作液。

△ 现配现用, 用量按 0.1ml/cm²膜使用 (整膜约 1ml)。

9.2 显色曝光

9.2.1 用干净镊子取出 PVDF 膜, 沥去多余液体 (保持湿润), 平铺于保鲜膜上 (蛋白面朝上);

9.2.2 将 ECL 工作液均匀滴加在 PVDF 膜表面反应 **1-2min**;

9.2.3 吸弃 ECL 工作液, 将 PVDF 膜放在两片保鲜膜中间;

9.2.4 进行化学发光成像仪检测或压片检测。

△ 避免 PVDF 膜与保鲜膜之间出现气泡或褶皱。

产品名称: 2h 极速 WB 即用型全流程试剂盒

产品货号: RA10020

注意事项

1. 预制胶需 4°C 保存，切勿置于 0°C 以下；
2. ECL 发光液 A 和 B 取用时一定要更换吸头，以免相互混入导致试剂失效；
3. 为节省时间，可在实验等待期间配制下一步实验所需试剂；
4. 本试剂盒中 ECL 工作液灵敏度为 fg 级。

实验方法-图解 WB

