

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 推出的 2h 极速 WB 即用型全流程试剂盒，包含 Western 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。

实验步骤	理论用时/min	含前处理用时/min
样本处理	5	8
上样电泳	25±5	30
转膜	25±5	30
膜封闭 (选做)	5-7	0
一抗孵育及洗涤	25±5	30
二抗孵育及洗涤	25±5	30
ECL 显色	1	2
总用时	110±15min	130min

产品组分

试剂盒组分	保存条件	90T	30T
5×上样缓冲液	-20℃	0.5mL	0.2mL
校准级彩色预染蛋白 Marker (8-180kDa)	-20℃	60μL	20μL
Bis-Tris , 4 -20%, 15 wells (预制胶)	4℃	6 块	2 块
20×通用型快速电泳液*	4℃	60mL	30mL
PVDF 膜 (0.45μm)	RT	6 片	2 片
免滤纸转膜海绵垫	RT	4 片	4 片
20×免冰浴快速转膜液*	RT	120mL	50mL
5min 无蛋白快速封闭液	4℃	30mL	10mL
免封闭快速抗体稀释液	4℃	120mL	40mL
快速洗涤液 (10×)	4℃	60mL	20mL
ECL 发光液 A	4℃	5mL	1.5mL
ECL 发光液 B	4℃	5mL	1.5mL
说明书	-	1pcs	1pcs

说明:

5×上样缓冲液及蛋白 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 3 个月；

产品名称：2h 极速 WB 即用型全流程试剂盒

产品货号：RA10020

20×通用型快速电泳液（外槽液）及 20×免冰浴快速转膜液建议使用 3 次

Marker 分子量依次为：8、16.5、25、31、41、52、72、95、130、180kDa。

【预制胶需 4°C 保存，切勿置于 0°C 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 5×上样缓冲液并混匀，沸水浴加热 **5min**。

△ 水浴后高速离心 3-5min 取上清可确保样本纯净，避免沉淀影响电泳效果。

2. 电泳

2.1 配制电泳液

500mL 配制方案：475mL 的纯水+ 25mL 的 20×通用型快速电泳液。

2.2 安装预制胶

撕掉预制胶(Bis-Tris, 4-20%,15wells) 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，以使平整面朝外。

2.3 加入电泳液

内槽：浸没点样孔；外槽：加 1/3 体积（液面高度不可超过内槽）。

2.4 点样

用移液器取出试剂盒中 Marker 和步骤 1 中样本，将吸头垂直轻轻插入上样孔，缓慢打出样本，避免戳破凝胶。

△ Marker 推荐 2-5 μL /孔；样本推荐 5-20 μL /孔，最大 25 μL /孔。

2.5 电泳

盖槽盖，接通电源，推荐恒压 160-180V ($\leq 200\text{V}$) 运行 **20-30min**。

△ 实际时间以溴酚蓝到达胶底部或 Marker 分离充分即可停止电泳，**外槽电泳液可使用 3 次**。

3. 转膜

3.1 配制转膜液

1L 配制方案：50mL 的 20×免冰浴快速转膜液+ 850mL 纯水+ 100mL 无水乙醇。

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，放在甲醇溶液中浸没活化 **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没平衡 **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**。

产品名称：2h 极速 WB 即用型全流程试剂盒

产品货号：RA10020

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；海绵垫可重复使用。

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**。

3.7 洗膜

取出转印好的 PVDF 膜，用纯水（约 50mL）润洗 1 遍，避免膜干燥，并回收转膜液（可使用 3 次）。

4. 膜封闭 (选做，一抗若初次使用时，无需进行此操作)

将润洗后的 PVDF 膜浸没在 5-10mL 无蛋白快速封闭液中，摇床室温封闭 **5-7 min** 后，弃去封闭液。

5. 一抗孵育

5.1 配制一抗工作液

按一抗说明书比例用免封闭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

加 5-10mL 一抗工作液浸没 PVDF 膜，室温摇床孵育 **20-30min**。

△ 亦可 4℃孵育 90min 或过夜，裁切膜可减少一抗工作液用量；若使用回收后的一抗孵育时，需对膜进行封闭。

6. 一抗洗涤

6.1 配制洗涤液

100mL 配制方案：10mL 快速洗涤液（10×）+ 90mL 纯水混匀。

6.2 洗涤

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

△ 一抗可回收后置于 4℃保存使用，若使用回收后的一抗孵育时，需对膜进行封闭。

7. 二抗孵育

7.1 配制二抗工作液

按二抗说明书比例用免封闭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 5-10mL 二抗工作液浸没 PVDF 膜，室温摇床孵育 **20-30min**。

△ 亦可 4℃孵育 60min 以上，裁切后的膜可以适当减少二抗工作液用量。

8. 洗涤二抗

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

△ 二抗可回收后置于 4℃保存使用。

产品名称: 2h 极速 WB 即用型全流程试剂盒

产品货号: RA10020

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。

△ 尽量现配现用, 整膜用量约 0.5-1mL, 裁切膜可适当减少 ECL 用量。

9.2 显色曝光

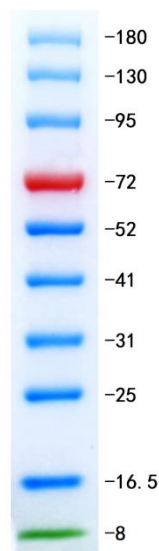
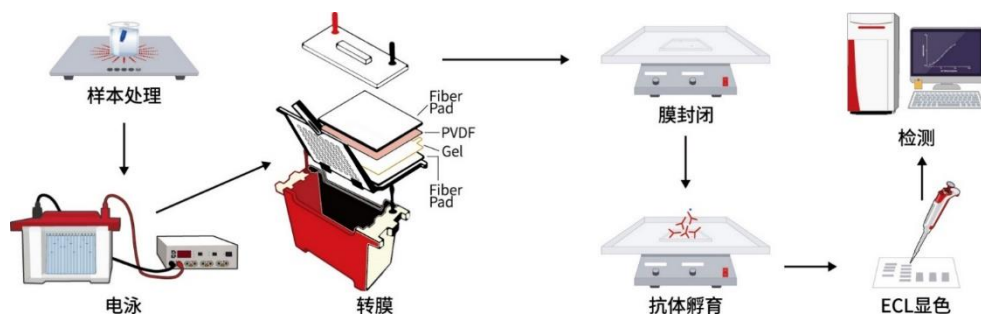
9.2.1 用干净镊子取出 PVDF 膜, 沥去多余液体 (保持湿润), 平铺于孵育盒上 (蛋白面朝上);

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

9.2.3 吸弃多余 ECL 工作液, 将 PVDF 膜放在发光板上, 进行化学发光成像仪检测。

注意事项

1. 预制胶需 4°C 保存, 切勿置于 0°C 以下;
2. 本试剂盒无需封闭, 但如果一抗未用免封闭快速抗体稀释液稀释, 或用免封闭快速抗体稀释液稀释的一抗已使用过, 则应当对膜进行封闭后再孵育一抗;
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. 电泳液和转膜液均可重复使用 3 次, 但电泳时内槽必须使用新电泳液;
5. 稀释好的电泳液、转膜液、洗涤液可保存 1 个月以上;
6. 转印好的膜进行后续操作时, 均需将蛋白面朝上 (设备有特殊要求时除外);
7. 适当延长抗体孵育和洗涤时间, 可以进一步获得清晰且干净的条带;
8. 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。



Bis-Tris, 4-20% Gel

实验方法-图解 WB

Marker 分子量