

产品名称：畅享版 WB 全流程试剂盒

产品货号：RA10042

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 推出的畅享版 WB 全流程试剂盒，包含完整实验所需绝大部分试剂与耗材，用户仅需自备纯水、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，降低实验背景的同时，可将实验时间压缩至 5 小时。

产品组分

试剂盒组分	保存条件	10 块	50 块
5×SDS 上样缓冲液	-20℃	1mL	1mL*5
校准级彩色预染蛋白 Marker (8-180kDa)	-20℃	100μL	250μL*2
促凝剂（即凝广谱梯度制胶试剂盒）	-20℃	1mL	5mL
下层胶 1（即凝广谱梯度制胶试剂盒）	2-8℃	25mL	125mL
下层胶 2（即凝广谱梯度制胶试剂盒）	2-8℃	25mL	125mL
上层胶 3（即凝广谱梯度制胶试剂盒）	2-8℃	10mL	50mL
上层胶 4（即凝广谱梯度制胶试剂盒）	2-8℃	10mL	50mL
20×通用型快速电泳液	2-8℃	100mL	500mL
PVDF 膜 (0.45μm)	RT	10 片	50 片
免滤纸转印海绵	RT	6 片	12 片
20×免冰浴快速转膜液	RT	150mL	750mL
5×无蛋白封闭稀释液	2-8℃	60mL	300mL
10×洗涤液	RT	100mL	500mL
ECL 发光液 A	2-8℃	10mL	50mL
ECL 发光液 B	2-8℃	10mL	50mL
说明书	-	1pcs	1pcs
HRP 标记内参抗体（赠品）	-20℃	10μL	10μL
抗体剥离液（赠品）	2-8℃	20mL	100mL

说明：

- 1、按试剂要求存放，有效期 1 年；
- 2、4℃保存，有效期 3 个月；
- 3、本品不可直接冻存，需-20℃保存的试剂已放置在同一自封袋中；

4、红色组分可定制。

产品名称：畅享版 WB 全流程试剂盒

产品货号：RA10042

工作液准备

准备阶段	工作液类型	配制方法
制胶等待阶段	电泳液 (1L)	20×通用型快速电泳液: 50mL ddH ₂ O: 950mL
电泳等待阶段	转膜液 (1L)	20×免冰浴快速转膜液: 50mL ddH ₂ O: 850mL 无水乙醇: 100mL
	无蛋白封闭稀释液 (100mL)	5×无蛋白封闭稀释液: 20mL ddH ₂ O: 80mL
	洗涤液 (100mL)	10×洗涤液: 10mL ddH ₂ O: 90mL

操作流程

1. 样本处理

在裂解好的样本中加入 1/4 体积的 5×SDS 上样缓冲液并混匀，沸水浴加热 **5-10min**。

△ 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。

2. 电泳

2.1 配制凝胶 (以一块 1.0mm 的 mini 胶为例)

2.1.1 各取 2.5mL 的下层胶 1 和下层胶 2 混匀；

2.1.2 在上述混合液中加入 50μL 促凝剂并轻轻混匀，注入制胶板中，使液面距离短胶板上沿约 1.5cm 即可；

△ 此溶液为过量，请勿全部注入；加入促凝剂后需轻轻混匀，避免过多空气进入影响凝固。

2.1.3 各取 1.0mL 的上层胶 3 和上层胶 4 (取用前需摇匀) 混匀；

2.1.4 在上述混合液中加入 20μL 促凝剂并轻轻混匀，注入制胶板中，并插入梳齿；

2.1.5 等待约 **20min** 以使胶凝固后，缓慢拔出梳齿备用。

△ 不同厚度的凝胶配制方法如下：

下层胶配方			
凝胶厚度	下层胶 1	下层胶 2	促凝剂
0.75mm	2.0mL	2.0mL	40μL
1.0mm	2.5mL	2.5mL	50μL
1.5mm	3.8mL	3.8mL	76μL

上层胶配方			
凝胶厚度	上层胶 3	上层胶 4	促凝剂
0.75mm	0.8mL	0.8mL	16μL
1.0mm	1.0mL	1.0mL	20μL
1.5mm	1.5mL	1.5mL	30μL

产品名称：畅享版 WB 全流程试剂盒

产品货号：RA10042

2.2 上样电泳

2.2.1 将制好的凝胶短胶板朝内固定在电泳槽中；

2.2.2 将提前稀释好的电泳液加入内槽并浸没点样孔；外槽电泳液适当没过胶板底部；

⚠ 外槽电泳液可使用 3-4 次。

2.2.3 将蛋白 Marker (3-5 μ L/孔) 和处理好的样本缓慢加入点样孔中；

⚠ Marker 为即用型，禁止煮沸。

8-180kDa 分子量依次为：8/16.5/25/31/41/52/**72**/95/130/180kDa

10-250kDa 分子量依次为：10/15/20/**25**/30/40/50/**72**/100/130/250 kDa

2.2.4 盖上槽盖，接通电源，推荐恒压 160-180V (≤ 200 V) 运行 **20-30min**。

⚠ 实际电泳时间以溴酚蓝到达胶底端或 Marker 分离充分即可停止电泳。

3. 转膜

3.1 揭掉膜两侧保护纸，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**；

3.2 将凝胶、免滤纸转印海绵、活化后的膜在提前配制好的转膜液中室温平衡 **3-5min**；

3.3 打开转印夹，从负极(黑面)依次铺：免滤纸转印海绵→凝胶→PVDF 膜→免滤纸转印海绵，赶走胶与膜之间的气泡并锁紧转印夹；

3.4 将转印夹插入转印槽，加转膜液完全浸没转印槽，400mA 恒流室温转膜 **15-30min**。

⚠ 不同分子量的蛋白转膜时间如下：

1.0mm 凝胶		
电流	分子量	转膜时间
400mA	< 50kDa	10-20min
	50-150kDa	20-35min
	150-200kDa	35-45min
	> 200kDa	45-60min

转印海绵清洗后可使用 **10 次**以上；转膜液可使用 **3-4 次**，第 4 次使用需增加 10-15min 转膜时间。

4. 膜封闭

将转印好的 PVDF 膜放入 10mL 稀释好的无蛋白封闭稀释液中，置于摇床室温封闭 **5-10 min** 后，弃去封闭液。

5. 一抗孵育及洗涤

5.1 用稀释好的无蛋白封闭稀释液配制一抗工作液，加 4-8mL 一抗工作液，室温摇床孵育 **90-120min** 或 4℃过夜；

⚠ 裁切后的膜可以适当减少一抗工作液用量。

5.2 吸弃一抗工作液，加 10mL 稀释好的洗涤液摇动清洗 **3-5min**，洗涤 3 次，每次彻底吸弃旧液。

⚠ 裁切后的膜可以适当减少洗涤液用量。

产品名称：畅享版 WB 全流程试剂盒

产品货号：RA10042

6. 二抗孵育及洗涤

6.1 用稀释好的无蛋白封闭稀释液配制二抗工作液，加 4-8mL 二抗工作液，室温摇动孵育 **50-60min**；

⚠ 裁切后的膜可以适当减少二抗工作液用量。

6.2 吸弃二抗工作液，加 10mL 稀释好的洗涤液摇动清洗 **3-5min**，洗涤 3 次，每次彻底吸弃旧液。

⚠ 裁切后的膜可以适当减少洗涤液用量。

7. 显色曝光

7.1 将 ECL 发光液 A 和 ECL 发光液 B 按 1: 1 混匀，配制成 ECL 工作液；

⚠ 现配现用，整膜用量约 1mL。

7.2 用干净镊子取出 PVDF 膜，使蛋白面朝上，将 ECL 工作液均匀滴加在膜表面反应 **1-2min**；

7.3 吸弃 ECL 工作液，将膜放入成像仪检测或压片检测。

注意事项

1. ECL 发光液 A 和 B 取用时需更换吸头，以免相互混入导致试剂失效；
2. 本试剂盒中 ECL 工作液灵敏度为 fg 级；
3. 部分浓缩液在 4℃可能出现结晶，需室温溶解并混匀后使用；
4. 为节省时间，可在实验等待期间配制下一步实验所需试剂，各操作所需时间大致如下：

实验步骤	理论用时	预计用时
样本处理	5-10min	10min
凝胶制备	20min	20min
上样电泳	20-30min	30min
转膜	15-30min	30min
膜封闭	5-10min	12min
一抗孵育及洗涤	100-130min	120min
二抗孵育及洗涤	60-75min	70min
ECL 显色	2-5min	5min
总用时	230-310min	297min (5h)