

## BeyoWB™ 80分钟电泳转膜与Western检测试剂盒

产品编号	产品名称	包装
P0002S	BeyoWB™ 80分钟电泳转膜与Western检测试剂盒	6-15次
P0002M	BeyoWB™ 80分钟电泳转膜与Western检测试剂盒	30-75次

### 产品简介:

- 碧云天研发生产的BeyoWB™ 80分钟电泳转膜与Western检测试剂盒(BeyoWB™ 80 min Electrophoresis, Transfer and Western Blot Kit), 也称超快速电泳转膜与Western检测试剂盒(Superquick Electrophoresis, Transfer and Western Blot Kit), 是一种通常电泳仅需25分钟、转膜仅需10分钟、从完成转印的膜到获得目的蛋白条带仅需30分钟, 总计通常不超过80分钟就能实现从蛋白样品到目的条带的超快速电泳转膜与Western检测试剂盒。
- 本试剂盒组分齐全, 仅需自备一抗、二抗、水、无水乙醇及电泳、转印和成像设备。本试剂盒包含BeyoWB™ SDS-PAGE上样缓冲液(5X)、兼容不同分子量大小目的蛋白的BeyoGel™ Elite PAGE预制胶(Tris-Gly, 4-20%, 15孔)、BeyoWB™电泳液、BeyoWB™转膜液、BeyoWB™ PVDF膜 (6.6×8.5cm, 0.45μm)、BeyoWB™转膜海绵垫(免滤纸)、BeyoWB™封闭液、BeyoWB™抗体稀释液、BeyoWB™ Western洗涤液、BeyoWB™ BeyoECL A液和B液。本试剂盒使用便捷, 能够显著缩短电泳、转膜、封闭、一抗和二抗孵育等的时间, 试剂盒中包含从蛋白样品到化学发光所需的绝大部分溶液和耗材, 用户仅需自备一抗、二抗、水、无水乙醇及电泳、转印和成像设备, 从蛋白样品到获得目的条带通常仅需80分钟, 可以极大加快电泳、转膜和Western的检测速度。
- 本试剂盒特别适用于有使用相应一抗和二抗进行Western检测经验的情况, 此时使用原有的一抗和二抗配合本试剂盒通常就能在80分钟内实现从蛋白样品到获得预期的目的蛋白条带。经实测, 大多数情况下使用本试剂盒的效果优于原常规检测方法。使用本试剂盒的实际检测效果, 请参考图1。图中仅展示了部分检测结果, 实测对于更多的一抗和二抗, 本试剂盒在绝大多数情况下都具有相近或更优的检测效果。

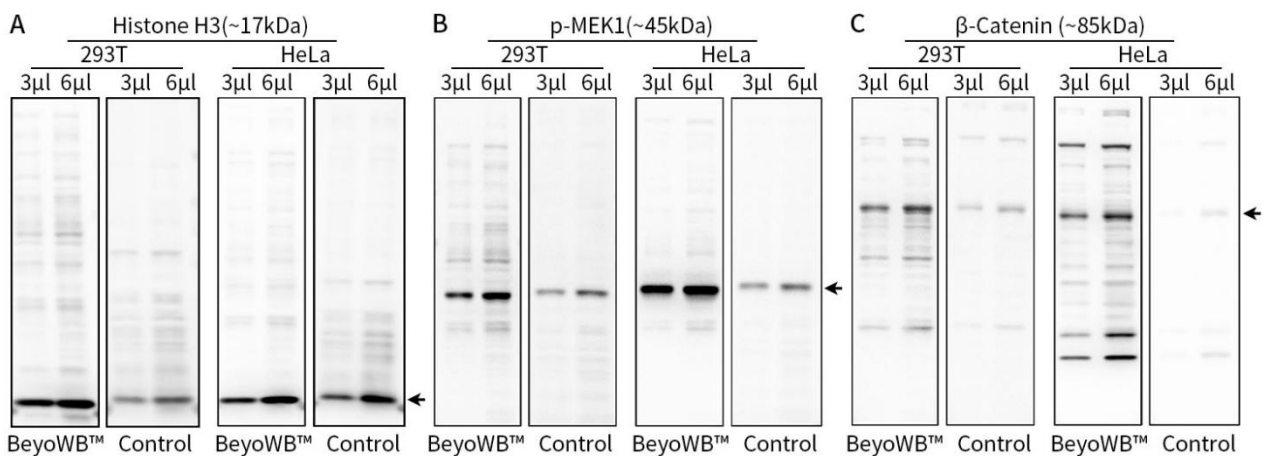


图1. 碧云天BeyoWB™ 80分钟电泳转膜与Western检测试剂盒(P0002)与常规Western检测效果的比较图。图中BeyoWB™为使用本试剂盒的检测效果, 实验条件为: BeyoWB™封闭液封闭5分钟; BeyoWB™抗体稀释液稀释一抗(1:1000), 室温孵育15分钟, BeyoWB™洗涤液洗涤30秒3次; BeyoWB™抗体稀释液稀释二抗(1:500), 室温孵育5分钟, BeyoWB™洗涤液洗涤30秒3次; 发光检测使用BeyoWB™ BeyoECL。Control为常规Western的检测效果, 实验条件为: QuickBlock™ Western封闭液(P0252)封闭10分钟; QuickBlock™ Western一抗稀释液(P0256)稀释一抗(1:1000), 室温孵育1小时, Western洗涤液洗涤5分钟3次; QuickBlock™ Western二抗稀释液(P0258)稀释二抗(1:1000), 室温孵育1小时, Western洗涤液洗涤5分钟3次; 发光检测使用BeyoECL Star (特超敏ECL化学发光试剂盒) (P0018A)。293T和HeLa细胞裂解液的蛋白浓度均为2mg/ml。所用一抗分别为: Histone H3 Rabbit Polyclonal Antibody (AF7104)、Phospho-MEK1 (Ser218/222) Rabbit Monoclonal Antibody (AF1786) 和β-Catenin Mouse Monoclonal Antibody (AF0069); 对应的二抗分别为: BeyoWB™ HRP标记山羊抗小鼠IgG(H+L) (P0946) 和BeyoWB™ HRP标记山羊抗兔IgG(H+L) (P0948)。Western印迹成像由BeyoImager™ 600化学发光成像系统(EI600)完成, 同组比较时的曝光时间相同, 箭头所示为目的蛋白。如图所示, 本试剂盒检测效果与常规Western相近甚至更优。对于本试剂盒和常规Western方法检测的上述印迹膜分别进行自动曝光时, 本试剂盒的效果也显著优于常规Western检测方法。实际实验结果会因样品、抗体、实验条件等的不同而存在差异, 图中数据仅供参考。

- Western, 也称Western blot, Western blotting, Western印迹, 常简称为WB, 是用抗体检测蛋白水平的重要方法之一[1]。常规Western检测从转膜后到获得蛋白条带通常需要3小时以上甚至过夜, 影响实验效率。通常电泳需要60-90分钟, 转膜需要30-60

分钟, 也比较耗时。而碧云天的BeyoWB™ 80分钟电泳转膜与Western检测试剂盒, 通常电泳仅需25分钟, 转膜仅需10分钟, 转膜后通常30分钟内就可获得目的蛋白条带, 大大节约了实验时间。

- 本试剂盒中的BeyoWB™ SDS-PAGE电泳液(Tris-Gly)和传统的SDS-PAGE电泳液相比, 可以大幅加快电泳速度, 缩短电泳时间。推荐150V-200V恒压电泳, 通常20-35分钟就能完成电泳, 对于4-20%的预制胶仅需180V电泳25分钟。本电泳液含有SDS, 适用于变性胶蛋白电泳。
- 本试剂盒中的BeyoWB™转膜液使用方便、产热量少、无需冰浴。使用BeyoWB™转膜液进行转膜时, 无需任何冰浴措施, 包括转膜液预冷、内置冰盒及外置冰浴处理等, 室温下即可将蛋白高效转移到印迹膜上, 不影响转膜效果。在环境温度为25°C或以下时, 转膜15分钟后转膜液的温度通常仅升高5-10°C, 产热量少。
- 本试剂盒中的BeyoWB™封闭液封闭时间仅需5分钟, 总体效果显著优于传统的基于BSA (牛血清白蛋白)、脱脂奶粉、酪蛋白(Casein)等的封闭液。
- 本试剂盒中的BeyoWB™抗体稀释液针对Western进行了深度优化, 可同时用于一抗和二抗的稀释, 用其配制的一抗工作液孵育时间仅需15分钟, 二抗工作液孵育时间仅需5分钟。本产品稀释和配制的抗体工作液, 可以在4°C保存和使用不少于1个月, 并且可以重复使用。
- 本试剂盒中的BeyoWB™ Western洗涤液用于Western时一抗或二抗孵育后的洗涤, 每次洗涤时间仅需30秒即可达到理想效果, 降低背景, 增强信噪比。
- 本试剂盒中的BeyoWB™ BeyoECL化学发光试剂, 灵敏度极高、背景低、发光时间长, 成像效果极优。
- 本试剂盒提供了从蛋白样品准备到化学发光所需的几乎所有的通用试剂和耗材(包括预制胶、PVDF膜和转膜海绵垫), 用户仅需自备在常规Western中使用的一抗、二抗、水、无水乙醇及电泳、转膜和成像设备, 即可在80分钟内获得与常规Western检测相似或更优的目的条带。
- 按照试剂盒提供的预制胶和预裁切的PVDF膜, 按照每次电泳需要BeyoWB™ SDS-PAGE电泳液500ml (每次两块胶同时电泳), 转膜需要BeyoWB™转膜液1000ml (每次两块胶同时转膜), 封闭需要BeyoWB™封闭液5ml、稀释一抗和二抗的BeyoWB™抗体稀释液各5ml, 稀释后的一、二抗重复使用3次, 洗涤液每次使用10ml, BeyoWB™ BeyoECL工作液每次需要1ml计算, 本试剂盒小包装和中包装分别可以进行6次和30次的Western快速检测。如果检测的是更常见的裁切后的约2×8.5cm印迹膜, 按照封闭以及一、二抗孵育液体用量为每次2ml, 洗涤液用量每次4ml, 发光试剂工作液用量每次0.4ml计算, 小包装和中包装分别可以检测15次和75次。

#### 包装清单:

产品编号	产品名称	包装
P0002S-1	BeyoGel™ Elite PAGE预制胶(Tris-Gly, 4-20%, 15孔)	6块
P0002S-2	BeyoWB™ PVDF膜(6.6×8.5cm, 0.45μm)	6张
P0002S-3	BeyoWB™转膜海绵垫(免滤纸)	12片
P0002S-4	BeyoWB™ SDS-PAGE上样缓冲液(5X, 无气味)	2ml
P0002S-5	BeyoWB™ SDS-PAGE电泳液(Tris-Gly, 20X)	100ml
P0002S-6	BeyoWB™转膜液(10X)	300ml
P0002S-7	BeyoWB™封闭液	30ml
P0002S-8	BeyoWB™抗体稀释液	20ml
P0002S-9	BeyoWB™ Western洗涤液	400ml
P0002S-10	BeyoWB™ BeyoECL A液	3ml
P0002S-11	BeyoWB™ BeyoECL B液	3ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
P0002M-1	BeyoGel™ Elite PAGE预制胶(Tris-Gly, 4-20%, 15孔)	30块
P0002M-2	BeyoWB™ PVDF膜(6.6×8.5cm, 0.45μm)	30张
P0002M-3	BeyoWB™转膜海绵垫(免滤纸)	60片
P0002M-4	BeyoWB™ SDS-PAGE上样缓冲液(5X, 无气味)	10ml
P0002M-5	BeyoWB™ SDS-PAGE电泳液(Tris-Gly, 20X)	500ml
P0002M-6	BeyoWB™转膜液(10X)	3×500ml
P0002M-7	BeyoWB™封闭液	150ml
P0002M-8	BeyoWB™抗体稀释液	100ml
P0002M-9	BeyoWB™ Western洗涤液(10X)	200ml
P0002M-10	BeyoWB™ BeyoECL A液	15ml
P0002M-11	BeyoWB™ BeyoECL B液	15ml
—	说明书	1份

## 保存条件：

预制胶4°C保存，一年有效，切勿置于0°C以下冷冻。其余均可-20°C保存，一年有效。整个试剂盒4°C保存，至少3个月有效；室温保存3天，不显著影响使用效果。BeyoWB™ BeyoECL A液和B液须避光保存。PVDF膜和海绵垫，可以室温或4°C保存，至少一年有效。

## 注意事项：

- 请注意回收使用过的一抗工作液和二抗工作液。回收的一、二抗工作液可以再重复使用2次。稀释后的一、二抗工作液，包括使用过的一、二抗工作液，请4°C保存。
- 回收后重复使用的一、二抗工作液，使用方法同新鲜稀释的一、二抗工作液。如果在重复使用过程中发现一、二抗工作液出现轻微混浊现象，可以10,000×g离心1-3分钟，取上清用于后续检测。如果回收的一、二抗工作液出现明显的絮状物或长霉长菌等情况，则可以考虑废弃该抗体。
- 使用本产品，通常80分钟可得到高质量的目的蛋白Western结果，即蛋白样品变性3-5分钟、电泳25分钟、设置转印三明治3-5分钟、转膜10分钟、封闭5分钟、一抗孵育15分钟、洗涤30秒3次、二抗孵育5分钟、洗涤30秒3次、BeyoWB™ BeyoECL试剂孵育30秒、成像通常0.5分钟之内。
- 对于6.6×8.5cm的印迹膜，推荐使用碧云天的Western洗膜盒(9.0×6.0×3.3cm) (FFX050)进行洗涤和孵育；对于裁切后的条形印迹膜，推荐使用碧云天的Western洗膜盒(5格, 14.5×9.8×3.5cm) (FFX055)进行洗涤和孵育。
- 如果需要，推荐配套使用的BeyoWB™ HRP标记山羊抗小鼠IgG(H+L) (P0946)、BeyoWB™ HRP标记山羊抗兔IgG(H+L) (P0948)以及更多的BeyoGel™ Elite PAGE预制胶(Tris-Gly, 4-20%, 15孔) (P0822)、BeyoWB™ SDS-PAGE上样缓冲液(5X, 无气味) (P0963)、BeyoWB™ PVDF膜(6.6×8.5cm, 0.45μm) (P0965)、BeyoWB™转膜海绵垫(免滤纸) (P0966)、BeyoWB™ SDS-PAGE电泳液(Tris-Gly, 20X) (P0967)、BeyoWB™转膜液(10X) (P0968)、BeyoWB™封闭液(P0950)、BeyoWB™抗体稀释液(P0951)、BeyoWB™洗涤液(P0952/P0953)和BeyoWB™ BeyoECL (P0955)，可以单独向碧云天订购。
- 个别情况，如果希望获得更好的Western结果，可适当增加封闭、一抗、二抗孵育及洗涤的时间，并适当优化成像的曝光时间。
- BeyoWB™ BeyoECL A液和B液对人体有害，操作时请小心，并注意有效防护以避免直接接触人体或吸入体内。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

## 使用说明：

### 1. 蛋白样品的准备。

- 蛋白样品的收集。**根据实验需要，使用适当的裂解液，例如碧云天的Western及IP细胞裂解液(P0013/P0013J)、RIPA裂解液(P0013B/P0013C/P0013D/P0013K)、NP-40裂解液(P0013F)或SDS裂解液(P0013G)等，裂解贴壁细胞、悬浮细胞或组织样品；为了防止蛋白的降解，或保证磷酸化或乙酰化蛋白的稳定，也可额外添加蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂或去乙酰化酶抑制剂混合物(P1005/P1006/P1045/P1046/P1112/P1113)。也可以直接使用BeyoWB™ SDS-PAGE上样缓冲液(5X, 无气味)直接进行细胞或组织样品的裂解，但此时不太方便进行蛋白定量。
- 蛋白样品的定量(选做)。**为确保每个蛋白样品的上样量一致，需要测定每个蛋白样品的蛋白浓度。根据所使用的裂解液的不同，需选择适当的蛋白浓度测定方法。如果使用碧云天生产的Western及IP细胞裂解液(P0013)、RIPA裂解液，可以使用碧云天的BeyoBCA蛋白浓度快速测定试剂盒(P0398)、BeyoBCA蛋白浓度测定试剂盒(高灵敏度) (P0399)、BCA蛋白浓度测定试剂盒(P0009/P0010/P0010S/P0011/P0012/P0012S)、Bradford蛋白浓度测定试剂盒(去垢剂兼容型) (P0006C)等产品。
- 蛋白样品的处理。**取出试剂盒中的BeyoWB™ SDS-PAGE上样缓冲液(5X, 无气味)，在室温或不超过50°C的水浴中溶解。溶解后，按照每4μl蛋白样品加入1μl BeyoWB™ SDS-PAGE上样缓冲液(5X, 无气味)的比例，混合蛋白样品和BeyoWB™ SDS-PAGE上样缓冲液(5X, 无气味)。混合后的样品使用95°C水浴加热5分钟，以充分变性蛋白。加热结束后，冷却到室温，即可用于后续电泳上样(步骤2d)。

**注1：**如果使用水浴加热溶解BeyoWB™ SDS-PAGE上样缓冲液(5X, 无气味)，溶解后立即室温存放，避免长时间置于水浴中。使用完毕后宜尽快置于-20°C保存，如有必要，可以适当分装后使用。

**注2：**加热前如果发现蛋白样品内有粘稠的半透明状物体(通常由基因组DNA等形成)，通常在本上样缓冲液内95度水浴加热5分钟后消失。如果没有完全消失，可以延长95度水浴时间至8-10分钟，通常该粘稠的半透明状物体会完全消失，以便于后续的上样操作。适当超声或使用1ml注射器反复抽吸也可以打断基因组DNA从而使粘稠状物体消失。

**注3：**样品请务必95°C加热，温度过高(如100°C)或时间过长(如超过15分钟)，有可能会造成蛋白降解或上样缓冲液中指示剂的颜色异常。

### 2. 电泳。

- 电泳液的配制。**量取50ml本试剂盒中提供的BeyoWB™ SDS-PAGE电泳液(Tris-Gly, 20X)，倒入到洁净的量筒中，加入超纯水、去离子水或蒸馏水定容到1L，混匀后即配制成BeyoWB™ SDS-PAGE电泳液(Tris-Gly, 1X)；也可根据所需的电泳液量自行配制。没有用完的电泳液可以室温保存，通常室温可保存2-3天，4°C可保存1-2周。
- 安装预制胶。**将试剂盒中提供的BeyoGel™ Elite PAGE预制胶(Tris-Gly, 4-20%, 15孔)从包装袋中取出，撕掉底部蓝色密封胶带；将预制胶固定在电泳槽中，平稳、缓慢地拔出梳子。
- 加入电泳液。**内槽加满步骤2a中配制的电泳液，外槽则加入电泳液适当没过预制胶板即可，最高不可漫过胶板。通常，同时进行两块胶的电泳，使用500ml电泳液即可。电泳推荐使用碧云天的MiniProGel™蛋白电泳系统(2胶) (E6006)。

**注：**由于预制胶孔中可能有残留的储存缓冲液，所以建议用200μl或1ml移液器吸取电泳液轻轻吹打加样孔，将加样孔冲洗干

净，去除气泡和残留的储存缓冲液，这样电泳的效果更佳。

- d. **上样。**使用常规吸头或BeyoGold™凝胶电泳上样吸头(1-200µl) (FTIP205/FTIP206/FTIP208/FTIP209)吸取适当体积步骤1c中准备的蛋白样品，将吸头的尖端垂直方向轻轻插入到上样孔中即可上样，吸头避免戳破凝胶，更不能使胶板变形导致样品泄漏。最佳上样量可通过实验来确定，样品过量较易导致条带拖尾和信号过强。本试剂盒中提供的预制胶，每孔最大上样体积为30µl，常用的上样量为5-20µl。
  - e. **电泳。**将电泳槽盖子盖好，并将电源线插头插入电泳仪对应电源插孔。电泳电压建议为180V，电泳时间建议为25分钟。但不同电泳槽、不同气温等会影响电泳时间，实际通常电泳至溴酚蓝到达胶的底端处附近即可停止电泳，或者可以根据预染蛋白质分子量标准的电泳情况，预计目的蛋白已经被适当分离后即可停止电泳。电源推荐碧云天的BeyoPower™中电流电源(300V/600mA/100W) (E6080)或BeyoPower™高电流电源(300V/2000mA/200W) (E6085)。电泳结束后，取出胶板，用小螺丝刀、小撬板、BeyoGel™预制胶开胶器(FGO021)等沿两板间的缝隙将两板别开，掰开两个板，用刮板将凝胶轻轻取出，参考步骤3进行转膜。
3. **转膜。**在电泳时，宜做好转膜的准备工作，包括进行转膜液的配制、PVDF膜的活化等。
- a. **转膜液的配制。**量取100ml本试剂盒中提供的BeyoWB™转膜液(10X)，倒入洁净量筒中，加入超纯水、去离子水或蒸馏水至总体积约700ml。加入200ml无水乙醇或210ml 95%乙醇，充分混匀。在量筒中用超纯水、去离子水或蒸馏水定容到1L，混匀后即成为BeyoWB™转膜液(1X)，可用于转膜。  
注1：配制好的BeyoWB™转膜液(1X)无需提前冷藏降温，配制好后即可使用。  
注2：没有用完的BeyoWB™转膜液(1X)可在常温或4°C保存，通常两周内可以正常使用。当转膜液颜色变为浅棕色或黄褐色时，应该丢弃。
  - b. **PVDF膜的活化。**使用Western专用的平头镊夹(FS035)或适当工具夹取本试剂盒中提供的BeyoWB™ PVDF膜(6.6×8.5cm, 0.45µm)边缘部分，小心取出。由于PVDF膜的高疏水性，膜需在乙醇、甲醇或其它适当的溶液中浸润活化后使用，推荐使用碧云天的安全无毒的PVDF膜浸润活化液(P0021S)。
  - c. **PVDF膜和BeyoWB™转膜海绵垫使用转膜液浸泡。**使用乙醇等浸润活化后的膜，需要使用适量的BeyoWB™转膜液(1X)进行浸泡和平衡，通常室温摇床摇动3-5分钟即可。海绵垫浸泡后可用赶气泡滚子(E6071)或移液管轻轻滚动将气泡赶出。
  - d. **准备转移三明治。**将转移三明治夹的黑色面向下，放置在洁净的器皿中(例如直径约15-20cm的圆皿)。在浸泡过的一片海绵垫上放置凝胶，注意排出凝胶与海绵垫之间的气泡。将用转膜液充分浸泡并完全湿润的印迹膜放在凝胶上，注意排出凝胶与印迹膜之间的气泡。将一片海绵垫放置在印迹膜上并排出所有气泡。上下适当用力夹紧转移三明治夹，用白色滑块锁住夹套，注意不要移动夹套中的三明治。转移三明治夹的黑色面对着转移电泳芯组件的黑色面，将转移三明治夹套插入转移电泳芯组件中。如果有两块凝胶，重复上述步骤制备另一个转移三明治夹。转膜推荐碧云天的MiniBlot™蛋白转膜系统系列产品(E6050/E6053)或MiniProGel™蛋白制胶、电泳与转膜系统系列产品(E6150/E6155/E6159)。  
注1：将气泡完全排出是获得良好转移效果的关键，否则将严重影响最后的结果。每一步操作可使用赶气泡滚子轻轻滚动将气泡赶出。  
注2：在转膜液中操作转移三明治，对气泡的排除有一定的帮助。  
注3：三明治中无需使用转印槽中常规标配的多孔垫，无需使用转印滤纸。
  - e. **转膜。**向转印槽中倒入配制好的BeyoWB™转膜液(1X)，500mA恒流转膜10分钟，室温转膜，无需任何冰浴措施即可很好地完成转膜。如果使用非本试剂盒提供的凝胶，对于相对较小分子量蛋白或厚度为0.75mm凝胶，可以适当减少转膜时间；对于超过270kD的超大分子量蛋白或厚度为1.5mm凝胶，需要适当增加转膜时间。电源推荐使用碧云天的BeyoPower™高电流电源(300V/2000mA/200W) (E6085)或BeyoPower™中电流电源(300V/600mA/100W) (E6080)。  
注：如果环境温度较高，也可酌情采取冰浴措施。
4. **膜的封闭。**
- a. 完成转膜后，立即把印迹膜(约6.6×8.5cm)放置到预先加入5ml BeyoWB™封闭液的Western洗膜盒(9.0×6.0×3.3cm) (FFX050)中，置于翘板摇床上缓慢摇动，**室温封闭5分钟**。推荐使用BeyoShaker™数字式翘板摇床(E6673)。后续若无特殊说明，各种试剂的用量都以约6.6×8.5cm大小的印迹膜为例进行说明。  
注1：经反复测试，室温封闭5分钟即可达到理想的封闭效果，但也可以根据实际情况酌情延长封闭时间。  
注2：如果使用裁切后约2×8.5cm印迹膜，推荐使用2ml BeyoWB™封闭液，后续使用的各种试剂的体积也须相应按比例缩小。
5. **一抗孵育。**
- a. **一抗工作液的配制。**根据一抗推荐稀释比例或优化后进行常规Western检测使用的稀释比例进行一抗工作液的配制。例如一抗**推荐稀释比例为1:1000**时，则在5ml BeyoWB™抗体稀释液中加入5µl一抗并混匀，即可得到5ml一抗工作液；如果推荐稀释比例为1:500，则在5ml BeyoWB™抗体稀释液中加入10µl一抗并混匀。
  - b. 用微型台式真空泵、移液器或滴管等吸尽用于封闭的BeyoWB™封闭液。推荐使用BeyoVac™基础型台式真空吸液器(E6878)或BeyoVac™调速型台式真空吸液器(E6883)。
  - c. 加入**5ml一抗工作液**。如果是裁切后的约2×8.5cm印迹膜，推荐用量为2ml。
  - d. 置于翘板摇床上缓慢摇动，**室温孵育15分钟**。  
注1：经反复测试，室温孵育15分钟即可达到理想检测效果，但也可以根据实际情况酌情延长一抗孵育时间。  
注2：一抗孵育时，请参考步骤3a进行二抗工作液的配制。
  - e. 回收一抗工作液，留待后续重复使用。并吸净残留的一抗工作液。
  - f. 使用BeyoWB™ Western洗涤液洗涤**3次，每次的用量为10ml，每次30秒**。如果是裁切后的约2×8.5cm印迹膜，每次的推荐用量为4ml。每次推荐使用真空泵吸净残留的洗涤液。

注：经反复测试，洗涤3次，每次30秒，即可达到理想效果，但也可以根据实际情况每次酌情延长洗涤时间或增加洗涤次数。

## 6. 二抗孵育。

- 二抗工作液的配制。通常建议根据二抗推荐稀释比例或优化后进行常规Western检测使用的稀释比例的2倍进行二抗工作液的配制。例如二抗推荐稀释比例为1:1000时，则在本试剂盒中使用的比例为1:500，即在5ml BeyoWB™ 抗体稀释液中加入10μl 二抗并混匀，即可得到5ml二抗工作液。
- 加入5ml二抗工作液。如果是裁切后的约2×8.5cm印迹膜，推荐用量为2ml。
- 置于翘板摇床上缓慢摇动，室温孵育5分钟。  
注：经反复测试，室温孵育5分钟即可达到理想检测效果，但也可以根据实际情况酌情延长抗体孵育时间。
- 回收二抗工作液，留待后续重复使用。并吸净残留的二抗工作液。
- 使用BeyoWB™ Western洗涤液洗涤3次，每次的用量为10ml，每次30秒。如果是裁切后的约2×8.5cm印迹膜，每次的推荐用量为4ml。每次推荐使用真空泵吸净残留的洗涤液。

## 7. 蛋白检测。

- BeyoWB™ BeyoECL工作液的配制。混合0.5ml BeyoWB™ BeyoECL A液和0.5ml BeyoWB™ BeyoECL B液，配制成1ml BeyoWB™ BeyoECL工作液，室温放置备用。工作液宜在临检测前配制。如果是裁切后的约2×8.5cm印迹膜，BeyoWB™ BeyoECL工作液配制0.4ml即可。
- 用WB专用镊子(FS035)将膜取出，用吸水纸略吸去过多的液体(切勿接触膜的蛋白面)，然后置于一洁净保鲜膜上。
- 滴加1ml BeyoWB™ BeyoECL工作液到膜上，确保使工作液均匀覆盖在膜上，放置30秒。如果是裁切后的约2×8.5cm印迹膜，BeyoWB™ BeyoECL工作液的推荐用量为0.4ml。  
注：通常放置30秒就可以进行后续的成像或压片检测，但也可以根据实际情况酌情延长放置时间。
- 取膜，弃BeyoWB™ BeyoECL工作液，用吸水纸略吸去过多的液体。将膜放在两片保鲜膜中间，随后进行化学发光成像仪检测或压片检测。

## 8. (选做)一抗二抗的去除与内参蛋白的检测。

推荐使用碧云天的Western一抗二抗去除液(中性) (P0025N)去除一抗和二抗用于后续其它目的蛋白的检测。如果希望进行内参蛋白的检测，推荐使用碧云天的Actin超快速Western检测试剂盒(P0970)、GAPDH超快速Western检测试剂盒(P0971)和Tubulin超快速Western检测试剂盒(P0972)，仅需10分钟就可以实现从膜到目的条带。

注：详细的Western实验步骤可以参考碧云天的相关网页：<http://www.beyotime.com/support/western.htm>。

## 参考文献：

- Begum H, Murugesan P, Tangutur AD. Biotechniques. 2022. 73(1): 58-69.

## 相关产品：

产品编号	产品名称	包装
P0001	BeyoWB™ 30分钟Western检测试剂盒	6-15次/30-75次
P0002	BeyoWB™ 80分钟电泳转膜与Western检测试剂盒	6-15次/30-75次
P0946	BeyoWB™ HRP标记山羊抗小鼠IgG(H+L)	200μl/1ml
P0948	BeyoWB™ HRP标记山羊抗兔IgG(H+L)	200μl/1ml
P0950	BeyoWB™封闭液	100ml/500ml
P0951	BeyoWB™抗体稀释液	100ml/500ml
P0952-500ml	BeyoWB™洗涤液	500ml
P0953-100ml	BeyoWB™洗涤液(10X)	100ml
P0955	BeyoWB™ BeyoECL	100ml/500ml
P0956	BeyoWB™ 30分钟Western检测试剂盒(小鼠一抗用)	6-15次/30-75次
P0958	BeyoWB™ 30分钟Western检测试剂盒(兔一抗用)	6-15次/30-75次
P0963	BeyoWB™ SDS-PAGE上样缓冲液(5X, 无气味)	2ml/15ml
P0965	BeyoWB™ PVDF膜(6.6×8.5cm, 0.45μm)	20张/100张
P0966	BeyoWB™转膜海绵垫(免滤纸)	20片/100片
P0967	BeyoWB™ SDS-PAGE电泳液(Tris-Gly, 20X)	100ml/500ml
P0968	BeyoWB™转膜液(10X)	500ml/4×500ml
P0970	Actin超快速Western检测试剂盒	6-15次/30-75次
P0971	GAPDH超快速Western检测试剂盒	6-15次/30-75次
P0972	Tubulin超快速Western检测试剂盒	6-15次/30-75次
P0981	Flag标签蛋白超快速Western检测试剂盒	6-15次/30-75次
P0982	HA标签蛋白超快速Western检测试剂盒	6-15次/30-75次
P0983	Myc标签蛋白超快速Western检测试剂盒	6-15次/30-75次
P0984	His标签蛋白超快速Western检测试剂盒	6-15次/30-75次

P0985S	His标签蛋白(C-Terminal)超快速Western检测试剂盒	6-15次
P0986	GFP标签蛋白超快速Western检测试剂盒	6-15次/30-75次
P0987S	GST标签蛋白超快速Western检测试剂盒	6-15次
P0988S	V5标签蛋白超快速Western检测试剂盒	6-15次
P0990S	MBP标签蛋白超快速Western检测试剂盒	6-15次
P0992S	StrepII标签蛋白超快速Western检测试剂盒	6-15次
P0997S	AVI标签蛋白超快速Western检测试剂盒	6-15次
P0025N	Western一抗二抗去除液(中性)	250ml

Version 2024.12.05