



巴傲得磷酸化 WB 基础辅助试剂套装

磷酸化 WB 轻松入门套装

套装货号：BD-WBKIT01-P

精选 11 款常用辅助试剂，覆盖裂解、电泳、转膜、专用孵育与显影

针对磷酸化蛋白检测优化的 Western Blot 基础辅助试剂组合

产品使用说明书

适用于 Western Blot 实验的样本处理、电泳、转膜、封闭、抗体孵育、洗膜与化学发光检测



1. 套装组成

收到产品后请按下表核对套装配置；若发现包装异常、漏液或数量不符，请及时联系巴傲得生物。

功能模块	产品编号	产品名称	规格
样本处理	BD0031	RIPA 裂解液	50T
蛋白保护	BD0033	PMSF 蛋白酶抑制剂	500 μ L
磷酸化保护	BD0075	Cocktail 磷酸酶抑制剂 (100 $\times$)	500 μ L
上样处理	BD0034-3	SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 5 $\times$ (原)	5 mL
电泳体系	BD0061	10 $\times$ 电泳缓冲液	500 mL
转膜体系	BD0070	10 $\times$ 转膜缓冲溶液	500 mL
洗膜体系	BD0066	25 $\times$ TBS 漂洗缓冲液	500 mL
洗膜体系	BD0056	吐温 20	10 mL
专用封闭	WBA2400-R2	WB 封闭液 (磷酸化抗体)	50 mL
专用孵育	WBA2400-R4	一抗稀液 (酸化抗)	50 mL
信号检测	BLH02SCM	超敏型 ECL 发光液	20 mL

到货检查

- 核对货号、品名、规格与数量。
- 确认包装完好，无明显漏液或破损。
- 按标签要求及时分类保存。

使用提醒

- 本说明书提供推荐使用条件，实际可按样本与抗体特性优化。
- 实验过程中请全程佩戴实验防护用品。
- 仅限科研使用，不用于临床诊断。

快速选择与推荐参数

实验环节	推荐条件	优化提示
磷酸化保护	抑制剂按 1:100 加入	裂解后全程低温并快速操作
封闭	室温 30-60 min	高背景可延长封闭；弱信号避免过度封闭
一抗	4 $^{\circ}$ C过夜	抗体效价高时可提高稀释倍数
洗膜	TBST 3 次，每次 5-10 min	背景高可增至 4-5 次
二抗	室温 45-60 min	避免浓度过高造成非特异背景
ECL	反应 1-3 min 后成像	先短曝光，再逐级延长



2. 使用前准备与样本处理

实验前确认

- 凝胶浓度、膜材及转膜方式与目标蛋白分子量匹配。
- 裂解、离心及定量尽量在低温条件下完成。
- PMSF 现用现加；磷酸化检测同步加入磷酸酶抑制剂。

配制重点

- 10×电泳液按 1:10 稀释；25×TBS 按 1:25 稀释。
- TBST 推荐吐温 20 终浓度 0.05%-0.1%。
- 5×上样液与样本按 1:4 混合至终浓度 1×。
- 100×磷酸酶抑制剂按 1:100 加入裂解液。

常用工作液配制

工作液	配制方法
1×电泳液	10×母液按 1:10 用纯水稀释。
1×转膜液	10×母液按 1:10 稀释，并按实验方案加入甲醇。
1×TBS/TBST	25×TBS 按 1:25 稀释；再加入吐温 20 至 0.05%-0.1%。
1×上样液	5×上样缓冲液与样本按 1:4 混合。
PMSF	加入裂解液后尽快使用，常用终浓度 1 mM。
磷酸酶抑制剂	100×母液按 1:100 加入，配制为 1×。

3. 推荐实验流程：样本裂解与上样

01 样本裂解

- 样本预冷后加入适量 RIPA 裂解液。
- 加入 PMSF；磷酸化检测时同步加入 1×磷酸酶抑制剂。
- 冰上裂解 20-30 分钟，4℃高速离心取上清并定量。

02 变性与上样

- 样本与 5×还原型上样缓冲液按 4:1 混合。
- 95℃加热 5-10 分钟，短暂离心后上样。

样本处理参考与记录

项目	推荐范围	记录/提示
裂解液用量	细胞：按培养面积或细胞量优化	保证样本完全浸润并充分裂解
蛋白上样量	常用 10-40 μg/孔	低丰度蛋白可适当增加
变性条件	95℃ 5-10 min	膜蛋白/易聚集蛋白可降低温度
离心条件	4℃高速离心 10-15 min	取澄上，避免吸入淀



4. 推荐实验流程：电泳至显影

03 SDS-PAGE 电泳	- 加入 1×电泳液，先低压通过浓缩胶，再提高电压完成分离。 - 当溴酚蓝前沿接近胶底时停止电泳，避免过度跑胶。
04 转膜	- PVDF 膜先甲醇活化；NC 膜可直接平衡。 - 按海绵-滤纸-胶-膜-滤纸-海绵顺序组装并排尽气泡。 - 根据分子量优化转膜条件并注意降温。
05 封闭	- 使用 WBA2400-R2 磷酸化抗体专用封闭液。 - 室温轻摇 30-60 分钟，全程避免膜面干燥。
06 一抗孵育	- 使用 WBA2400-R4 磷酸化抗体一抗稀释液。 - 按抗体说明书推荐比例稀释，4°C轻摇孵育过夜。
07 洗膜二抗	1×TBST 洗膜 3 次，每次 5-10 分钟。 - 二抗按说明书推荐比例稀释，室温孵育 45-60 分钟。 - 孵育后再洗膜 3-5 次。
08 ECL 显影	- 按标签说明混合 ECL 工作液，覆盖膜面反应 1-3 分钟。 - 先短曝光，再逐步延长，避免信号饱和。

快速选择与推荐参数

实验环节	推荐条件	优化提示
封闭	室温 30-60 min	高背景可延长封闭；弱信号避免过度封闭
一抗	4°C过夜	抗体效价高时可提高稀释倍数
洗膜	TBST 3 次，每次 5-10 min	背景高可增至 4-5 次
二抗	室温 45-60 min	避免浓度过高造成非特异背景
ECL	反应 1-3 min 后成像	先短曝光，再逐级延长

转膜条件优化参考

目标蛋白	优化方向	注意事项
低分子蛋白	缩短转膜时间或提高甲醇比例	防止蛋白穿膜，可优先选择 0.2 μm 膜
中等分子蛋白	采用实验室常规转膜条件	重点排除气泡并保持均匀接触
高分子蛋白	延长转膜、降低甲醇或加入少量 SDS	控制温度，避免电流过高导致发热



5. 注意事项 / 常见问题 / 保存说明

关键注意事项

- 裂解、离心及蛋白定量尽量在低温环境下进行。
- 封闭液与一抗稀释液需与抗体类型匹配；磷酸化检测优先使用专用体系。
- 洗膜不足会导致高背景，洗膜过度可能削弱弱信号，应根据实际结果优化。
- ECL 工作液建议现配现用，发光后应尽快完成成像。

保存与运输

- 各单品的保存温度、避光要求及有效期以瓶身标签为准。
- 需低温保存的试剂使用后应及时放回规定温度，避免长时间室温暴露。
- 工作液原则上现配现用；如需暂存，建议先进行小规模稳定性验证。
- 仅限科研使用，不用于临床诊断或治疗。

常见问题与处理

现象	建议处理
无条带或信号弱	检查转膜方向与转膜效率；确认一抗/二抗种属是否匹配；可适当提高上样量或延长曝光。
背景过高	降低抗体浓度；延长洗膜时间或增加洗膜次数；检查封闭体系是否匹配。
条带拖尾或弥散	减少上样量；充分裂解并去除不溶物；确认样本已充分变性。
出现多条杂带	提高一抗稀释倍数或缩短孵育时间；优化封闭条件；选择更高特异性抗体。
局部无信号	排查转膜气泡、膜面干燥、ECL 覆盖不均或成像时膜面褶皱。

结果判读与质量控制检查

内参稳定	条带在线性范围	阴性/阳性对照合理
同批本强度不明常；常时需复核上样量与转膜。	避免曝光饱和；定量分析应使用未饱和图像并保持相同曝光参数。	建置已知性本和必要性照，便于判断抗体特异性。