NcmBlot PVDF转印膜

产品名称	NcmBlot PVDF 转印膜（聚偏氟乙烯转印膜）
产品货号	WB6509
材质	PVDF（聚偏氟乙烯），无支撑布
产品规格	卷装 27cm*4m
孔径规格	0.45 μm
适用范围	Western Blot（蛋白免疫印迹）、蛋白转印、氨基酸分析、糖蛋白显色、斑点/狭缝印迹实验

1. 产品特点

- 高蛋白结合能力：PVDF 通过疏水作用与偶极作用结合蛋白，结合牢固，可有效阻止蛋白穿透膜片，适合低丰度蛋白检测。
- 低背景、高信噪比：开放式孔结构使未结合的探针或染料易于洗脱，背景浅，条带清晰锐利。
- 机械强度高：抗撕裂、柔韧性好，转膜与后续操作中不易破损，支持多次剥离重探（Strip & Reprobe）。
- 化学兼容性广：耐受多种醇类*，兼容考马斯亮蓝、丽春红等染色方法。
- 批次一致性好：批内、批间性能稳定，适合需要重复验证的 QC 与放行检测场景。
- 耐剥离，不易破损，满足多轮不同目的蛋白检测需求。

2. 技术参数

参数项	0.45 μm
材质	PVDF
标称孔径	0.45 μm
适用目标蛋白分子量	> 20 kDa（常规蛋白）
表面性质	疏水（使用前须醇类活化）
湿润方式	100% 甲醇或乙醇
适用染色	考马斯亮蓝、丽春红

参数项	0.45 μm
适用检测	化学发光（ECL）、显色法、荧光法

3. 操作流程（Western Blot）

以下为通用参考流程，具体条件请根据目标蛋白分子量、凝胶浓度与转印设备进行优化。

3.1 裁剪

佩戴手套，用干净镊子取膜。按凝胶大小裁剪 PVDF 膜（确保大小一致或者膜比凝胶每边大 1–2 mm），使用直尺辅助以获得整齐边缘。避免手指直接接触膜表面，避免折叠、弯折膜体。

3.2 活化（关键步骤）

PVDF 膜本质疏水，无法被水相缓冲液自发浸润，使用前必须在醇溶液中活化。

转印方式	活化操作
湿转	将膜浸入甲醇或乙醇中 30-60 s，至膜整体由不透明转为半透明。
半干转	甲醇或乙醇浸泡时间可缩短至 15 s，其余步骤同湿转。

注意：活化时间不可过短（浸润不充分会导致转膜不均与花斑），也无需长时间浸泡。

3.3 水洗与平衡

将活化后的膜转入双蒸水或去离子水中浸泡约 2 min，充分洗去残留醇；随后移入预冷的转印缓冲液中平衡至少 5 min，确保缓冲液完全置换。

关键：活化后的膜一旦干燥，会重新恢复疏水状态（出现白色斑块），蛋白将无法结合且干燥区域不能再被水相润湿。若发生干燥，须重新执行 3.2–3.3 步骤。

3.4 组装转印「三明治」

从负极（黑色面）向上依次放置：海绵 → 滤纸 → 凝胶 → PVDF 膜 → 滤纸 → 海绵 → 正极（红色/透明面）。

顺序	层次（自下而上 / 负极 → 正极）
1	海绵垫（浸润转印缓冲液）
2	滤纸 ×2–3 层（浸润转印缓冲液）
3	SDS-PAGE 凝胶（已在转印缓冲液中平衡 5–10 min）
4	PVDF 膜（已活化并平衡）
5	滤纸 ×2–3 层（浸润转印缓冲液）

顺序	层次（自下而上 / 负极 → 正极）
6	海绵垫（浸润转印缓冲液）

关键：膜必须位于凝胶与正极之间（蛋白带负电，向正极迁移）。每铺一层用玻璃棒或滚轮轻滚赶尽气泡——胶与膜之间的气泡会直接阻断蛋白转移，形成无信号的空白区。

3.5 转印条件参考

常用 Tris-甘氨酸转印缓冲液，PVDF 膜经甲醇活化后，也可使用不含甲醇的转印缓冲液。

方式	适用情形	参考条件	备注
湿转	小分子蛋白（< 30 kDa）为主	100V恒压或者 300 mA 恒流 20-30 min，4 ℃ / 全程冰浴	小蛋白防止时间过长穿膜
湿转	常规蛋白 15 - 100 kDa	300 mA 恒流 30-60min，全程冰浴	
湿转	大分子蛋白（> 100 kDa）	300 mA 恒流 60-90min，全程冰浴或 30 V / 90 mA 过夜	可加 0.1% SDS 助迁移，或将甲醇至10%以下（不是必须，用于优化条件），低温过夜对大蛋白最友好
半干转	快速转印常规至较大蛋白	Mini 胶，恒压 10 V 30 min 或 15 V 15 min Large 胶，恒压 25 V 30 min 或 15 V 60 min	数据仅供参考

转印时间需按目标蛋白分子量调整：分子量越大，迁移越慢，所需时间越长；小分子蛋白则须防止过转（穿透膜流失）。

3.6 转印效果验证

转印结束后，可先用丽春红染色液（0.1% 丽春红 S 溶于 5% 乙酸）染色约 5 min，水洗后观察条带；或将凝胶进行考马斯亮蓝染色，确认蛋白是否已完全迁出。确认转印成功后再进入封闭步骤，可避免后续试剂浪费。

3.7 封闭与抗体孵育

步骤	推荐条件	要点
封闭	5% 脱脂奶粉（TBST 配制）或 5% BSA	磷酸化蛋白检测优先用 BSA，脱脂奶粉含磷酸酶

步骤	推荐条件	要点
	（TBST 配制），室温摇床 45－60min	可能干扰
洗膜	TBST 室温摇床洗5-10分钟	洗去残留封闭液
一抗孵育	按抗体说明书稀释于封闭液， 室温孵育1-2h或者4 ℃ 过夜	液面须完全覆盖膜；4 ℃ 过夜对低丰度蛋白更有利
洗膜	TBST 洗 3 次，室温摇床第1次2分钟，第2次和第3次10分钟	去除未结合一抗
二抗孵育	HRP 标记二抗按推荐比例稀释，室温 30-60 min	二抗种属匹配一抗来源，例如一抗是兔源，二抗需是抗兔抗的抗体
洗膜	TBST 洗 3 次，室温摇床第1次2分钟，第2次和第3次10分钟	充分洗涤是降低背景的关键
检测	ECL 化学发光：A、B 液 1:1 混匀，孵育1-5 min（请参照不同品牌产品说明书），成像系统采集	建议尝试不同曝光时间以获得最佳信噪比，注意蛋白面朝上

4. 膜的剥离与重复使用

PVDF 膜机械强度高，可承受多次剥离重探，在同一张膜上检测多个目标蛋白，节省样品与时间。

1. 使用商品化或实验室配制的温和剥离缓冲液（如甘氨酸-SDS 体系，pH 2.2）处理，室温至 50 ℃ 条件下孵育。
2. 剥离后用 TBST 充分洗涤，重新封闭，再进入下一轮一抗孵育。
3. 全程保持膜湿润；避免剧烈刮擦膜表面。
4. 建议先检测低丰度 / 难检测的目标，再剥离检测高丰度目标。

5. 注意事项

- 全程佩戴无粉手套，使用干净镊子（建议圆头镊）操作，避免指纹、角蛋白污染及膜面划伤。
- 膜在活化后至封闭完成前的任何阶段均不得干燥；操作中短暂转移也应保持膜面湿润。
- 甲醇易燃且有毒性，活化操作请在通风橱内进行，远离火源，按实验室危化品规程处理废液。
- 转印缓冲液重复使用会显著降低转印效率（一般不建议超过 2－3 次）；转印过程注意散热，必要时使用冰浴或冷却装置。
- 膜的保存过程中避免弯折、避免与尖锐物品接触。
- 本产品为实验耗材，仅供科研与检测使用，不可用于临床诊断或人体内使用。
- 不同抗体体系、封闭液与检测底物组合可能存在差异，建议首次使用时以已知阳性样本进行条件优化。

6. 常见问题排查

现象	可能原因	处理建议
膜出现白色斑块 / 局部无信号	活化不充分或膜已干燥	重新执行甲醇活化与水洗平衡；确保活化后全程湿润
膜出现黑色斑点	脱脂奶粉未充分溶解	更换封闭剂
转膜不均、条带扭曲	胶与膜之间存在气泡；膜与凝胶尺寸不匹配	每铺一层轻滚赶泡；膜略大于凝胶，对齐平整
小分子蛋白信号弱或无信号	孔径选择不当（用了 0.45 μm）；转印时间过长导致穿透	改用 0.22 μm 膜；缩短转印时间；在膜后叠加第二张膜验证
大分子蛋白转印不完全	转印时间不足；甲醇浓度过高致蛋白沉淀于胶内	延长时间或改用 5–10% 甲醇；可加 0.01–0.1% SDS 助迁移
背景高、杂带多	封闭不充分；洗涤不足；一抗浓度过高	延长封闭时间或更换封闭剂；增加洗涤次数与时长；优化一抗浓度
背景高、无杂带	二抗浓度过高	降低二抗浓度
整体信号弱	上样量不足；转印效率低；抗体失活或稀释过度	增加上样量；丽春红验证转印效率；核对抗体效价与稀释比
条带弥散、拖尾	转印温度过高；缓冲液离子强度异常	加强冷却；更换新鲜转印缓冲液
膜染色后背景深	染色时间过长；洗脱不充分	缩短染色时间，充分水洗

7. 储存、运输与有效期

项目	条件
储存条件	室温（10–30 ℃）、干燥、避免阳光直射与高湿环境

项目	条件
运输条件	常温运输
有效期*	2年