

## ECL Chemiluminescent Substrate Detection Kit (Hypersensitive)

### 产品描述

ECL Chemiluminescent Substrate Detection Kit (Hypersensitive)可为使用辣根过氧化物酶(HRP)偶联物的免疫印迹实验提供明亮的信号,可通 HRP 实现低皮克级和飞克级(以 HRP 浓度为标准)的免疫印迹检测。该 ECL 底物能够兼容各种膜、封闭液和宽范围抗体稀释液,以出色性能、通用性和高性价比,满足用户的免疫印迹应用需求。

产品特点:

- 用于辣根过氧化物酶(HRP)的增强型化学发光底物
- 低皮克级灵敏度- 检测硝化纤维素膜或 PVDF 膜上低皮克级的蛋白条带
- 长信号持续时间- 在条件优化情况下,经底物孵育的印迹条带能够持续输出 6 至 8 小时的可检测光信号
- 稳定试剂- 工作液在 24 小时内保持稳定;试剂盒在室温下可稳定放置长达 1 年
- 价格经济- 针对稀释的抗体浓度条件进行了优化:

### 组分和储存条件

Components	100 mL	500 mL
ECL Chemiluminescent Substrate Detection Kit (Hypersensitive)-A	50 mL	250 mL
ECL Chemiluminescent Substrate Detection Kit (Hypersensitive)-B	50 mL	250 mL

Store the components dry at 4 °C and protect from light for 12 months.

### 实验操作

#### (1) 简要操作步骤

注: 优化抗原和抗体的浓度。必须使用建议的抗体稀释度,以保证阳性结果。有关建议的稀释度范围请参考其他所需材料。

1. 执行常规SDS-PAGE、转膜和Western Blot步骤。注意用HRP标记IgG或用一抗-链亲和素-生物素-HRP夹法。
2. 将两种底物组份按 1:1 比例混合,制备底物工作液。

注: 暴露于日光或任何其他强光可能损害工作液,为获得最佳结果,将此工作液保存在琥珀色瓶中,并避免长期暴露于任何强光。短时间暴露于实验室常规照明不会损害该工作液。

3. 将印迹膜在底物工作液中孵育 5 分钟。
4. 吸出多余试剂。用清洁的塑料膜盖住该印迹膜。
5. 使印迹膜在 X 光胶片上曝光。

#### (2) 蛋白印迹法详细操作步骤

1. 将印记膜从蛋白转印设备中取出，加入合适的封闭液在温室下孵育 20-60 分钟，同时振荡，以封闭膜上非特异性蛋白结合位点。*请注意：使用在前文建议的抗体稀释度是非常重要的。*
2. 将膜从封闭液中取出，与一抗工作液在温室孵育 1 小时，同时振荡；或在 28°C 孵育过夜，不振荡。
3. 将足量的洗涤缓冲液加至膜上，保证缓冲液将膜完全覆盖。振荡孵育≥5 分钟，更换洗涤缓冲液并重复该步骤 4-6 次。增加洗涤缓冲液体积，洗涤次数和洗涤时间有助于降低背景信号。

*注 1：孵育前，膜在洗涤缓冲液中的短暂淋洗会提高洗涤效率。*

*注 2：使用在前文建议的 HRP 标记二抗稀释度是非常重要的。*

4. 将 HRP 标记的二抗工作液与膜在温室孵育 1 小时，同时振荡。
5. 重复步骤 3，以除去未结合的 HRP 标记二抗。*注：膜与 HRP 标记二抗孵育后必须进行彻底洗涤。*
6. 将 A 溶液与 B 液等比例混合，制备成工作液。每 cm<sup>2</sup> 膜使用 0.01~0.1 mL 工作液。工作液可以在温室下稳定 8 小时。*注：暴露于日光或任何其他强光下可能损害工作液，为获得最佳结果，将此工作液保存在琥珀色瓶中，并避免长期暴露于任何强光。实验室的常见照明不会损害工作液。*
7. 将印记膜在工作液中孵育 5 分钟。
8. 从工作液中取出印记膜，并置于一个塑料片或清洁的塑料纸（膜）中，用一张吸水纸吸除多余的液体，并从印记和塑料纸之间小心地压出气泡。
9. 将包在塑料纸（膜）中的印记膜置于胶片暗盒中，蛋白质面朝上，除适用于胶片曝光的灯（如红色安全灯）之外，关闭所有的灯。

*注：胶片必须在曝光期间保持干燥，为获得最佳效果，采取以下措施：*

- \* 确保将多余的底物从膜和塑料纸上完全去除。
- \* 在整个胶片处理期间，使用手套。
- \* 切勿将印记膜置于已显影的胶片上，因为胶片上的化学物质会减弱信号。

10. 将 X 光胶片置于膜的上面。建议第一次曝光 60 秒。之后可调整曝光时间以达到最佳结果。化学发光反应在底物孵育后的前 5-30 分钟期间是最强烈的。这一反应可以持续几个小时，但强度会随时间下降，如有底物孵育后较长时间后曝光，曝光时间可能需要延长以获得较强信号。如果使用磷光存储成像设备或 CCD 照相机可能需要较长的曝光时间。

*警告：胶片与膜之间的任何移动可能在胶片上造成人为的非特异信号。*

11. 使用合适的显影剂和定影剂对胶片进行显影。如果信号太强，则缩短曝光时间或将印记膜进行剥离并降低抗体浓度重新检测。

## ■ 常见问题及解决方案

问题	可能原因	解决方案
胶片上有反转像(即黑色背景, 白色带)	系统中 HRP 过多	将 HRP 标记二抗稀释至少 10 倍
膜上有褐色或黄色带		
印记在暗室中发光		
信号持续时间少于 8 小时		
信号弱或无信号	系统中过多的 HRP 耗尽了底物并导致信号迅速衰减	将 HRP 标记二抗稀释至少 10 倍
	抗原或抗体的量不足	增加抗体或抗原的量
	蛋白质转移率低	优化转印
	HRP 或底物活性低	见下文注释*
高背景	系统中 HRP 过多	将 HRP 标记二抗稀释至少 10 倍
	封闭不充分	优化封闭条件
	封闭式机不合追	尝试一种不同的封闭试剂
	洗涤不充分	增加洗涤时间、次数或洗涤缓冲液体积
	胶片过度曝光	缩短曝光时间或使用背景消除剂
	抗原或抗体的浓度太高	减少抗体或抗原的量
蛋白质条内有斑点	蛋白质转膜效率低	优化转印流程
	膜的水化不均匀	按照制造商建议适度的使膜水化
	胶片与膜之间存在气泡	在胶片曝光前, 去除气泡
胶片上背景有斑点	HRP 配标记二抗中存在聚集物	使用 0.2 $\mu\text{m}$ 的过滤器
非特异性条带	系统中 HRP 过多	将 HRP 标记二抗稀释至少 10 倍
	SDS 导致的蛋白非特异性结合	在检测过程中不使用 SDS

**\*Note:** \*为检测系统活性, 在暗室中, 在一个清洁试管中制备 1-2 mL 底物工作液。关闭灯, 添加 1  $\mu\text{L}$  未稀释的 HRP 标记二抗工作液。该溶液应当立即发出蓝色光, 蓝光信号在随后的几分钟渐淡。

## ■ 注意事项

- 为获得最佳效果, 必须优化该系统的全部组分, 包括样品量、一抗和二抗浓度以及膜和封闭试剂的类型。由于该底物极其敏感, 要求使用比大多数市售底物少得多的样品、一抗、二抗, 通常低至少 10-20 倍。
- 使用该产品比使用沉淀比色 HRP 底物检测所需的抗体浓度低。为优化抗体浓度, 请进行一次系统的点印迹分析。
- 没有一种封闭试剂对所有系统而言都是最佳的, 所以为每一个免疫印迹检测系统找到最合适的封闭缓冲液非常必需。封闭试剂有可能与抗体产生交叉反应, 导致出现非特异性信号。封闭缓冲液同时也会影响系统的灵敏性。当从一种底物转换为另一种底物时, 有时会出现信号衰减或背景增加的现象, 原因可能是封闭缓冲液不适合新的检测系统。

4. 使用亲和素/生物素检测系统时，避免使用牛奶作为封闭试剂，因为牛奶中含有不定量的内源性生物素，会导致高背景信号。
5. 保证洗涤缓冲液、封闭缓冲液、抗体溶液和底物工作液的使用体积，以确保在整个实验过程中印迹膜完全被液体覆盖，避免膜变干。增大封闭缓冲液及洗涤缓冲液的使用量可以降低非特异性的信号
6. 为获得最佳效果，在孵育步骤请使用摇床。
7. 将 Tween20(终浓度 0.05-0.1%)加入封闭缓冲液和稀释的抗体溶液，以降低非特异信号；用高品质的产品，如去污剂。它保存在安瓿中，过氧化物和其他杂质含量量很低。
8. 不要使用叠氮钠作为缓冲液的防腐剂。叠氮钠是 HRP 的抑制物。
9. 避免手与膜直接接触，实验过程应戴手套或使用干净的镊子。
10. 所有设备必须清洁且不沾染外来物质。金属器械（如剪刀）不得具有可见的锈迹。锈迹可能导致斑点形成和高背景。
11. 底物工作液在室温下可稳定 8 小时。日光或任何其他强光下可能损害底物，为获得最佳结果，将底物工作液保存在琥珀色瓶中，并避免长期暴露在任何强光下，短时间暴露于实验室常规照明不会损害该工作液。



**APExBIO Technology**

**[www.apexbt.com](http://www.apexbt.com)**

7505 Fannin street, Suite 410, Houston, TX 77054.

Tel: +1-832-696-8203 | Fax: +1-832-641-3177 | Email: [info@apexbt.com](mailto:info@apexbt.com)