



## 特超敏 ECL 化学发光即用型底物

**产品货号:** AR1196

**产品名称:** 特超敏 ECL 化学发光即用型底物

**产品批号:** 见外包装标签

**产品组份:** 50ml 工作液 (可用于 500cm<sup>2</sup> 的膜)

溶液 A      25ml

溶液 B      25ml

**产品保存:** 4°C保存, 一年有效。

### 产品说明:

博士德生产的特超敏 ECL 化学发光试剂盒, 是一款具有超高灵敏度的化学发光(ECL)底物, 可与二抗上耦连的辣根过氧化物酶发生化学反应, 发出荧光, 从而可以通过用 X 光片压片或 CCD 成像仪检测样品, 当底物与优化的抗体浓度和封闭缓冲液配合使用时, 可检测到常规 ECL 底物无法检测的低丰度靶蛋白。

### 产品特点:

- 1.用于辣根过氧化物酶(HRP)的化学发光底物;
- 2.使用适当的一抗和二抗, 可在 NC 膜或 PVDF 膜上检测丰度为低皮克到中等飞克的蛋白条带;
- 3.所得信号的可定量检测范围跨越两个数量级;
- 4.通过胶片或成像系统进行曝光, 易于捕获图像;
- 5.试剂盒组分能够在 4°C条件下稳定放置一年;
- 6.配方经过优化, 可适用于浓度极低的抗体检测。

### 重要产品信息:

好的免疫印迹结果需要优化实验条件, 包括样品量, 凝胶类型, 转移方法, 膜类型, 封闭剂, 洗涤缓冲液, 一抗浓度, 二抗浓度和孵育时间等。

- 1.为获得最佳效果, 在孵育步骤中使用摇床。
- 2.不要使用叠氮化钠作为缓冲液的防腐剂, 它会抑制 HRP 的活性。
- 3.始终戴上手套或使用干净的塑料镊子, 金属装置必须没有可见的生锈痕迹, 这写都可能导致斑点或高背景。
- 4.工作液暴露在阳光下或任何其他强光下都可能损害工作液使用效果。
- 5.由于封闭剂与抗体的交叉反应引起非特异性信号, 所以实验测试对于确定每种蛋

**FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR DIAGNOSTIC AND CLINICAL USE.**



白质印迹系统的适当封闭剂是至关重要的。

6.当使用抗生物素蛋白/生物素系统时，避免使用牛奶作为封闭剂，牛奶中含有不同量的内源性生物素，导致高背景信号。

7.使用足够量的洗涤缓冲液，封闭缓冲液，抗体溶液和底物工作溶液来覆盖印迹膜并确保其不变干。使用大体积的封闭和洗涤缓冲液可以使非特异性信号最小化。

8.将 Tween-20 洗涤剂（终浓度为 0.05-0.1%）加入到封闭缓冲液和所有稀释的抗体溶液中，以减少非特异性信号。

#### **注意事项：**

- 1.A 液和 B 液吸取过程中必须更换移液器枪头，避免相互污染失效。
- 2.A 液和 B 液混合为工作液后，需避免强氧化剂如次氯酸钠等工作液的影响。
- 3.须确保试剂瓶干净，无微生物或其它试剂污染。
- 4.为了您的安全，请穿实验服并佩戴一次性手套。

#### **需要材料：**

NC 膜或 PVDF 膜；

X 射线胶片或成像系统；

摇床；

洗涤缓冲液：含有 0.05-0.1%吐温 20 的洗涤液，PBS：10mM 磷酸钠，150mM NaCl，pH7.2

TBS：10mM Tris，150mM NaCl，pH7.4；

特异性的一抗，用洗涤缓冲液或封闭缓冲液稀释；

HRP 标记的二抗，特异性针对一抗，用洗涤缓冲液或封闭缓冲液稀释；

封闭液：洗涤缓冲液中 1-5%（w/v）封闭剂（例如酪蛋白，BSA 或脱脂奶粉）。

**注意：博士德的 ECL 底物与所有封闭缓冲液兼容**

#### **使用说明：**

- 1.室温封闭膜 60 分钟，同时摇动。
- 2.去除封闭液并添加一抗，在室温振荡孵育 1 小时或在 2-8°C 振荡过夜。
- 3.将膜悬浮于清洗缓冲液中摇动 5 分钟以上，更换洗涤缓冲液至少 4-6 次。增加洗涤缓冲液体积，洗涤次数和洗涤时间可能有助于背景信号最小化。

4.在室温下孵育二抗 1 小时，同时摇动。

5.重复步骤 3，去除未结合的 HRP 结合物。

**注意：**与 HRP 结合物孵育后，膜必须彻底清洗。



6.通过混合等量的检测试剂 A 和 B 来制备底物工作溶液。每平方厘米膜使用 0.1mL 工作溶液。

7.在室温下用工作液孵育印迹膜 1-2 分钟。

8.将印迹膜放在透明的保鲜膜或保护膜中。使用吸收性的纸巾去除多余的液体，小心地将气泡压出。

9.将印迹膜放在 X 光胶片或成像系统上显色。底物孵育后的 30 分钟内，发光最强烈。

**疑难解答：**

|           |                 |            |
|-----------|-----------------|------------|
| 膜整个面都发光   |                 |            |
| 膜上有棕色或黄色带 | 酶标二抗量过多         | 减少二抗的浓度    |
| 发光时间短     |                 |            |
| 低信号或无信号   | 抗原或抗体量不足        | 减少二抗的浓度    |
|           | 转印失败            | 优化转印       |
|           | 二抗或底物活性低        | 更换二抗或底物    |
| 高背景       | 二抗浓度过高          | 降低二抗的用量    |
|           | 封闭不够充分          | 优化封闭       |
|           | 封闭液使用不当         | 更换质量更好的封闭液 |
|           | 洗涤不够充分          | 增加洗涤时间和次数  |
|           | 抗原或抗体浓度过高       | 降低抗原或抗体的用量 |
|           | 抗体特异性差          | 更换质量更好的抗体  |
| 条带里有斑点    | 无效的蛋白转移         | 优化转印       |
|           | 不均匀的膜           | 更换质量更好的膜   |
|           | 转印过程中膜胶之间有气泡    | 小心的赶出气泡    |
| 膜上有斑点     | 封闭液不均匀          | 过滤封闭液      |
| 非特异性的条带   | HRP 标记的二抗浓度过高   | 降低二抗的用量    |
|           | SDS 引起的蛋白非特异性结合 | 不使用 SDS    |
|           | 抗体特异性差          | 更换质量更好的抗体  |
|           | 封闭不充分           | 优化封闭       |