

ECL 发光试剂盒（超敏型）

ECL Super Sensitive Kit

货号：DE2002-100

保存：4°C

货号	规格
DE2002-试用装	6ml
DE2002-100	100ml
DE2002-500	500ml

【产品概述】

本产品是基于鲁米诺底物的化学发光试剂盒，能够被辣根过氧化物酶(HRP)催化发光。本试剂盒优化了底物组成，使用了新型高效增强剂，发光强度比传统 ECL 显色液提高了 30-300 倍，并有效地降低了背景。试剂盒采用独特的生产工艺提高了试剂盒的稳定性，室温可以放置一年。工作液被 HRP 催化后，发出特定波长荧光（400-450nm），可对 X 光胶片曝光，也可直接使用荧光 CCD 扫描，主要应用于 Western 检测以及化学发光免疫检测系统。

【产品组分及保存条件】

货号	成分	保存条件
DE2002A	Solution A	4°C保存
DE2002B	Solution B	4°C保存

【缓冲液配制】

一抗工作浓度：0.2-1.0 μg/mL；

HRP 标记二抗工作浓度：10-500 ng/mL，根据二抗效价调整。

显色液的使用比例：Solution A : Solution B = 1:1；10 cm² 转印膜使用 1-2 mL 工作液。

抗体去除液：

6M GuHCl, 0.2% Nonidet P-40 (NP-40), 0.1M β-mercaptoethanol, 20mMTris-HCl, pH7.5。

【操作步骤】

根据常规操作转印结束后，进行封闭、一抗孵育、二抗孵育以及必要的洗膜步骤，根据膜的大小，按每 10 cm² 膜使用 1-2mL 工作液，按比例吸取等体积溶液 A 和溶液 B 混匀，配制成发光检测工作液。用平头镊子将膜取出，膜的下缘轻轻接触吸水纸，去除膜上多余的液体。

用移液器将工作液加到转印膜上，使其均匀覆盖，室温孵育 1-2 分钟，此步骤可在洁净保鲜膜上或塑料盒中完成。

1. X光胶片法

(1) 用平头镊子夹起转印膜，膜的下缘轻轻接触吸水纸，去除膜上多余的液体，留下少量工作液，不要让膜完全干燥。膜的蛋白面朝上，包裹于洁净保鲜膜内。轻轻赶出其间的气泡，用小块透明胶带粘住四角，固定在X光片暗盒内。

(2) 在暗室中取一张 X光胶片置于包裹的膜上，合上暗盒，曝光30 秒至1 分钟。立即定影、显影，根据曝光强度，调整下一张 X 光胶片的曝光时间。如果背景过高，可以使用两张 X光胶片同时压片。

2. 荧光拍照法

(1) 如果需要使用CCD拍照，可以将膜放置于工作液中，开机后按照使用说明，将转印膜取出，进行拍照。

(2) 可以根据背景情况，调整机器测量参数，提高信噪比。

3. 管式化学发光法

(1) 将鲁米诺的化学发光检测波长可设定在 425nm 左右, 可以选择单点测量, 或者取多次平均值。

(2) 按照机器要求, 将配制好的工作液加入到样品管中, 间隔一定时间测量发光强度, 注意鲁米诺系统的发光到达峰值有一定延迟 (30-300 秒), 不同样本的测量时间间隔要固定。

(3) HRP 催化鲁米诺发光的体系还受到反应温度以及 pH 的强烈影响, 所以工作试剂准备以及发光测量需要考虑到此类因素。

【注意事项】

试剂盒 Solution A 为底物, 保存于避光试剂瓶中, Solution B 为氧化剂。通常取样顺序是先取底物 Solution A, 换枪头后再取氧化剂 Solution B。

使用生物素-亲和素系统时, 避免使用牛奶封闭, 可能会造成背景过高。

金属氧化物颗粒可能会造成膜上出现颗粒状斑点, 避免使用带有锈迹的剪刀以及镊子, 可以使用平头塑料镊子。

叠氮化钠抑制 HRP 的催化能力, 在缓冲液中尽量避免使用叠氮化钠作为防腐剂。

封闭、洗膜、孵育等步骤耗时较长, 注意膜与塑料界面的摩擦不均匀可能造成部分位置条带消失, 可以在保鲜膜中孵育以及封闭, 洗膜的塑料盒底面不要有明显凸起, 可以通过剪角的方法, 区别转印膜有蛋白的一面。不同转印膜对蛋白的吸附能力不同, 硝酸纤维素较软, 避免出现折痕。PVDF 膜使用前需要使用甲醇水化均匀。

勿将多张膜置于同一个洗膜盒中洗膜, 相互吸附以及摩擦可能造成很深的背景。转印、封闭、孵育都要避免气泡。

【保存条件】

本产品经过严格质量检验, 并进行Western blot验证, 以确保产品质量。室温 (25°C) 保存一年, 2-8°C 保存两年。

【常见问题分析及其解决方案】

常见问题	原因分析	解决方案
胶片无条带显现或者信号较弱	转膜的效率低	用预染色分子量标准来判断, 提高转膜效率
	抗原/抗体量少或不匹配	增加抗原/抗体量或选择合适抗原/抗体
	X 光胶片有问题	X 光片洗片以后应当为透明的胶片, 如果全黑则说明已经完全曝光了, 应当废弃
	定显影液有问题	可以先曝光一张胶片来验证, 弱有问题及时更换新的定显影液
	反应系统中 HRP 量过多	稀释 HRP 标记物 (HRP 浓度到 0.1ug/ml 20min 不会完全淬灭)
X 光胶片背景脏	一抗、二抗浓度太高	降低抗体浓度, 延长封闭时间
	抗体未清洗干净	增加洗膜次数
条带有空斑	抗原以及二抗的浓度过高	稀释样品重新跑胶, 也可以将混合好的显色液冰浴后, 加入到膜上, 立即快速显色
带型不规则	转膜时有气泡也有可能是转印膜没有水化均匀	转膜时尽量优化条件

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时, 本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。在所有情况下, 本公司对此产品所承担的责任, 仅限于此产品的价值本身。