

ECL 发光试剂盒（极敏型）

ECL Super plus Sensitive Kit

货号：DE2003-100

保存：4℃

货号	规格
DE2003-试用装	6ml
DE2003-100	100ml
DE2003-500	100ml*5

【产品概述】

本产品是一款采用全新配方生产，适用于检测 HRP 或其标记物的化学发光试剂。最低可检测飞克级别的抗原。持续发光时间长达 六个小时。产品具有超高灵敏度、超低背景、发光持久等特性。适用于 Western blot 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
DE2003A	Solution A	4℃ 保存 24个月
DE2003B	Solution B	4℃ 保存 24个月

【操作步骤】

1. 常规电泳、转膜、HRP 标记抗体或核酸探针孵育、洗膜。注意用 HRP 标记 1gG 或用一抗-链亲和素-生物素-HRP 夹法。核酸杂交膜用 HRP 标记探针杂交，洗膜。
2. 洗涤膜上的 HRP 标记二抗时，新鲜配制发光工作液：分别取等体积的溶液 Solution A 和 Solution B 1:1 混合，放置使之升到室温否则会减弱荧光强度。建议立即使用工作液，室温放置数小时后仍可使用但灵敏度略有降低。
3. 用镊子取出膜，搭在滤纸上沥干洗液但勿使膜完全干燥。将膜完全浸入并与发光工作液(0.125ml 发光工作液/cm 膜)充分接触。室温孵育 3-5 分钟，准备立即压片曝光。孵育时间过长不会增加灵敏度，有时还会导致曝光条带异常。发光过程的本质是酶促反应，使用过少的发光工作液不利反应进行，也会导致膜上条带曝光不均和明显降低灵敏度。为达节约目的可将膜剪小但勿降低发光液用量。
4. 用镊子夹起膜，搭在滤纸上沥干发光工作液。
5. 在 X 光胶片暗盒内面铺一张面积大于膜的保鲜膜。将杂交膜贴在保鲜膜上，将保鲜膜折起来完全包裹杂交膜，去除气泡和皱褶，可剪去边缘 部多余的保鲜膜。用滤纸吸去多余的发光工作液。用胶带将覆盖杂交膜的保鲜膜固定在暗盒内，最好蛋白带面向上。
6. 在黑暗中放入 X 光胶片，分别曝光不同的时间如数秒到数分钟，显影冲洗。

【注意事项】

1. 由于牛奶中含有内源性生物素，在使用亲和素/生物素系统时，封闭液中请避免使用奶粉；
2. 在封闭缓冲液及所有抗体稀释液中加入高质量的吐温-20（终浓度为 0.05%），以减少非特异性结合；
3. 由于叠氮钠是 HRP 抑制剂，在缓冲液中避免使用叠氮钠作为防腐剂；
4. 整个免疫印迹实验过程请确保印迹膜始终处于湿润状态，避免干燥；
5. 为获得最佳实验效果，抗体孵育及膜洗涤步骤中请使用摇床辅助完成；
6. 在膜操作过程中请戴手套操作或者使用干净的镊子，避免蛋白污染；
7. 避光条件下，配制好的化学发光检测底物工作液可在室温下稳定 8 小时，为获得最佳效果，可于棕色瓶中配制工作液，避免强光长时间的照射。正常实验室灯光短时间照射不影响工作液的使用；
8. 蛋白过量或长时间曝光，将加深背景并使条带强弱变化失去线性关系。曝光不足则条带模糊；
9. 发光工作液孵育约 3 分钟后膜上的条带发光。强条带发光在暗房中肉眼可见，低丰度蛋白条带发光较弱甚至肉眼不可见但可使 X 光胶片曝光。不能简单以肉眼观察判断条带发光时间。肉眼不可见的荧光实际上可持续数小时并使 X 光胶片感光，因而弱带可曝光 1-10 小时。如果曝光后条带不佳，可用洗膜缓冲液洗膜，重新孵育二抗，然后重新用 ECL 发光和曝光；

【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
X 光胶片背景脏	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）
	一抗、二抗浓度太高	降低抗体浓度，延长封闭时间
条带有空斑	抗体未清洗干净	增加洗膜次数
	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。