

服务热线:400-6169-114 020-84224925 网站:www.genesion.com.cn Email:whiga22@126.com

## 超敏化学发光液 GenSuper ECL

产品名称:超敏 Ecl 化学发光液

产品编号: JXE0011-100ml/JXE0011-500ml

产品规格: 100ml/500ml

**保存:** 室温运输, 收到后在 4 度避光下储存试剂

**重要提示:** 超敏 Ecl 化学发光液是一种高灵敏性底物, 其灵敏度比其它化学发光产品 (包括 Thermo Scientific, ECL) 更高, 为获得底物的最佳效果, 抗体须比其他那些底物一起使用时浓度更低。如果你已经在使用上文所列的底物之一或另一种“入门级别”的化学发光底物, 请将抗体再稀释至少五倍, 例如: 如果你使用 ECL 底物时将抗体按 1:100 稀释, 那么使用 GenSuper 底物时抗体应该按 1:500 稀释。下面列出了建议的稀释度范围。

一抗稀释度范围从 1mg/ml 储备液起 1:1,000-1:5,000 或 0.2-0.1ug/ml  
二抗稀释度范围从 1mg/ml 储备液起 1:20,000-1:100,000 或 10-50ng/ml

### 产品简介

超敏 Ecl 化学发光液是一种用于检测免疫印迹膜上辣根过氧化物酶 (HRP) 的高灵敏的增强底物。该物底极强的信号输出能够使皮克量的抗原得到检测。信号的敏感度、强度和持续时间使利用照相或者其他成像方式检测成为可能。印迹膜可以反复在胶片上曝光以获得最佳效果, 也可以先将膜上的免疫检测试剂进行剥离并重新检测。

### 产品重要信息

- Ø 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, GenSuper 底物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。
- Ø 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。
- Ø 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。
- Ø 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
- Ø 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
- Ø 为获得最佳效果, 在孵育步骤请使用摇床。
- Ø 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, 过氧化氢和其他杂质含量很低。
- Ø 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
- Ø 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
- Ø 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。
- Ø 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, 并避免长期暴漏在任何强光下, 短时间暴漏于实验室常规照明不会损害该工作液

## 操作概述

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

1. 将一抗从 1mg/ml 储备液稀释到 0.2~1.0ug/ml 或 1:1,000~1:5,000 稀释度
  2. 将二抗从 1mg/ml 储备液稀释到 10~50ng/ml 或 1:20,000~1:100,000 稀释度
3. 将两种底物组份按 1:1 比例混合，制备底物工作液。注：暴漏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，并避免长期暴漏于任何强光。短时间暴漏于实验室常规照明不会损害该工作液。
  4. 将印迹膜在 West Pico 底物工作液中孵育 5 分钟。
  5. 吸出多余试剂。用清洁的塑料膜盖住该印迹膜。

## 其他所需材料

- 0 已完成转印的印迹膜：使用任何合适的电泳法分离蛋白质，并将这些蛋白质转移到硝酸纤维素膜上。也可使用其他类型的膜，但操作步骤可能需要进行优化。
- 0 稀释缓冲液：使用 Tris 或磷酸盐缓冲液。
- 0 洗涤缓冲液：将 5mL 10% 的 Tween-20 加入 1,000mL 稀释缓冲液（Tween-20 的终浓度将为 0.05%）。
- 0 封闭试剂：将 0.5mL 10% 的 Tween-20 加入 100mL 的封闭缓冲液，选择一种与稀释缓冲液具有相同基本组分的封闭缓冲液。
- 0 一抗：选择一种目标蛋白质特异性抗体。使用稀释缓冲液制备该抗体的 1mg/ml 储备液。使用封闭试剂将抗体从储备液稀释成抗体工作液。稀释度介于 1:1,000 和 1:5,000 之间或抗体工作液浓度为 0.2-1ug/ml。最佳稀释度取决于一抗和膜上的抗原量。
- 0 HRP 标记的二抗：选择一种与二抗特异性结合的 HRP 标记二抗，使用稀释缓冲液制备该抗体的 1mg/ml 储备液。使用封闭试剂将抗体从储备液稀释成抗体工作液。稀释度介于 1:20,000 和 1:100,000 之间或抗体工作液浓度为 10-50ug/ml。该浓度范围在使用链亲和素-HRP 时也适用。二抗的最佳稀释度取决于 HRP 标记二抗和膜上的抗原量。
- 0 用于处理放射显影胶片的胶片暗盒、显影和定影剂
- 0 用于孵育的旋转摇床。

## 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：使用在前文其他所需材料章节中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：孵育前，膜在洗涤缓冲液中的短暂淋洗会提高洗涤效率。请注意：使用在前文其他所需材料章节中建议的 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 0.01~0.1ml 工作液。工作液可以在温室下稳定 8 小时。注：暴漏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，并避免长期暴漏于任何强光。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，才去一下措施：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；切莫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（如 Bio-Rad 的分子成像仪系统）或 C（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浓度重新检测。

## 常见问题及解决方案

问题	可能问题	解决方案
1) 胶片上有反转像 (即黑色背景, 白色带) 2) 膜上有褐色或黄色带 3) 印记在暗室中发光 4) 信号持续时间少于 8 小时	系统中 HRP 过多	系统中 HRP 过多
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	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	抗原或抗体的量不足
	增加抗体或抗原的量	增加抗体或抗原的量
	蛋白质转移率低	蛋白质转移率低
高背景	高背景	高背景
系统中 HRP 过多	系统中 HRP 过多	系统中 HRP 过多
将 HRP 标记二抗稀释至少 10 倍	将 HRP 标记二抗稀释至少 10 倍	将 HRP 标记二抗稀释至少 10 倍
封闭不充分	封闭不充分	封闭不充分
优化封闭条件	优化封闭条件	优化封闭条件
封闭式机不合适	封闭式机不合适	封闭式机不合适
蛋白质条内有斑点	蛋白质条内有斑点	蛋白质条内有斑点
蛋白质转膜效率低	蛋白质转膜效率低	蛋白质转膜效率低
优化转印流程	优化转印流程	优化转印流程
胶片上背景有斑点	胶片上背景有斑点	胶片上背景有斑点
非特异性条带	HRP 标记二抗中存在聚集物	HRP 标记二抗中存在聚集物
	使用 0.2um 的过滤器	使用 0.2um 的过滤器

\* 为检测系统活性, 在暗室中, 在一个清洁试管中制备 1-2ml 底物工作液。关闭灯, 添加 1ul 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。