

目录号：5320

保存条件：4 °C避光保存，一年有效。

## 产品组分

组分	规格
超敏型 ECL Reagent A	50ml
超敏型 ECL Reagent B	50ml

## 产品介绍

本试剂盒包含增强型的鲁米诺底物和稳定的过氧化物体系，在灵敏度检测方面有显著提升，能检测低至飞克级的微量蛋白。其工作原理是：以辣根过氧化物酶（HRP）标记的抗体直接或间接结合膜上的目的蛋白，在洗膜后加入 ECL 工作液，在其碱性环境下，鲁米诺由 HRP 催化发光，然后可用 X 光胶片曝光，也可以直接进行 CCD 扫描拍照。

本试剂盒应用于免疫印迹实验，以化学发光法检测蛋白质。由于本产品发光液极其灵敏，推荐大多数进口抗体起始浓度为一抗 (1 mg/mL) 储存液可稀释 1:1,000 至 1:50,000 倍，二抗 (1mg/mL) 储存液可稀释 1:50,000 至 1:200,000 倍。发光信号持久，稳定性更好，不含有毒试剂，安全性更高。

## 使用方法

1. 为了获得最佳效果，工作液最好在临近使用前配制并立即使用。配置工作液时务必更换吸头，以免污染试剂。
2. 准备 ECL 工作液：将 A 液 和 B 液 按等体积比例 1:1 混合。推荐使用剂量：0.1ml 工作液/cm<sup>2</sup> 膜。
3. 用平头镊子取出洗好的膜，沥干膜上洗膜液，但不要让膜干燥。将结合有蛋白的一面朝上，放置于洁净保鲜膜上。
4. 加上配好的 ECL 工作液，孵育时确保工作液覆盖整张膜，室温孵育 1-2min。
5. 用平头镊夹起印迹膜，弃去印迹膜上 ECL 工作液，将一张洁净的保鲜膜平整的铺在印迹膜上，结合有蛋白的一面朝上。
6. 将处理好的印迹膜置于 X 光片盒中，在暗室中取一张胶片小心置于膜上，曝光时间取决于膜上的发光强度，曝光后立即显影定影，或将印迹膜放置到荧光成像仪内，按仪器说明书进行检测。

## 注意事项

1. 本 ECL 试剂盒灵敏度高，需要优化好上样量、一抗、二抗浓度和稀释液、印迹膜及封闭试剂，并按照蛋白表达丰度，参考推荐的抗体稀释比例，来获得最佳实验结果。
2. 如果印迹膜上条带过亮时，建议使用膜再生液去除抗体后重新封闭孵育，并提高一抗二抗稀释比例。如果条带过暗也可将二抗稀释比例降低至 1:5000 至 1:10,000 倍，以达到最佳效果。
3. 本试剂盒 A 液和 B 液不可以相互污染，否则会降低产品的使用效果。
4. 发光强度会随时间缓慢减弱，建议在两小时内完成实验。
5. 孵育二抗后，洗膜缓冲液应避免使用叠氮钠，叠氮化钠(NaN<sub>3</sub>)会抑制 HRP 活性。
6. 建议使用高质量保鲜膜以提高荧光稳定性及避免膜上的杂质污染印迹膜造成曝光背景值偏高。
7. B 液含有氧化剂，易被还原而失效，使用后请盖紧瓶盖，以防失效。

使用本试剂盒时注意有效防护，为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

## 常见问题解决方案

遇到的问题	原因分析	推荐解决方法
胶片出现反影	反应系统中 HRP 量过多	稀释 HRP 标记物
膜上出现棕色或黄色条带		
暗室中观察到强烈发光		
条带有空斑		
发光信号持续时间短	保鲜膜、显影液或定影液污染	养成良好的实验习惯
	反应系统中 HRP 量过少	增加 HRP 标记物
胶片无条带显现或者信号较弱	转膜的效率低	提高转膜效率，用预染 Marker 判断。
	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	曝光后 X 光谱全黑（而非透明色），则表明胶片已完全曝光，使用新的 X 光片
	显影/定影液有问题	可预先曝光一张胶片进行判断，如有问题当换用新的显影/定影液
高背景	反应系统中 HRP 量过多	稀释 HRP 标记物，延长封闭时间
	抗体未清洗干净	增加洗膜次数
	封闭不完全	优化封闭条件
	使用错误的封闭剂	使用其他的封闭剂
	过度曝光	降低曝光时间
高背景	高浓度的抗体	进一步稀释一抗和二抗，优化抗体稀释度
	低效的阻断	增加 Tween-20 的 TBST 缓冲液，增加脱脂奶粉阻断缓冲液浓度
	洗涤不充分	增加洗涤液体积，或者多增加洗涤次数和时间
	一抗的质量	抗体自身的质量问题，或重新稀释新的一抗。
	缓冲液污染	检测缓冲液颗粒或细菌不纯物，或更换旧的缓冲液
非特异性条带	一抗用量过多或者特异性较差	减少一抗稀释比例或者更换一抗
	SDS 引起蛋白非特异性结合	实验流程中避免使用 SDS
不规则的黑点	膜上含有气泡	轻轻将气泡移除
	被污染的设备	蛋白质或残留的凝胶块可能会粘到膜上，抗体被困在其中，因洗涤不佳造成局部信号
	样品与膜相互作用	始终用干净的塑料托盘，避免任何类型的交叉污染