

## ECL 化学发光底物（特超敏）

产品编号	产品名称	规格
BL520A	ECL 化学发光底物（特超敏）	100 ml
BL520B	ECL 化学发光底物（特超敏）	500ml

### 产品简介：

ECL 化学发光底物（特超敏）可为使用辣根过氧化物酶(HRP)偶联物的免疫印迹实验提供明亮的信号和低皮克级检测灵敏度。该 ECL 底物能够兼容各种膜、封闭液和宽范围抗体稀释液，以出色性能、通用性和高性价比，满足用户的免疫印迹应用需求。

### 产品组份：

产品编号	产品名称	规格
BL520A-1/ BL520B-1	增强型发光液 A 液	50ml/250ml
BL520A-2/ BL520B-2	稳定剂 B 液	50ml/250ml

### 用途：

用于 HRP 标记抗体的 Western Blot 和 HRP 标记探针的核酸杂交。

### 产品特点：

- 1、低皮克级灵敏度：检测硝化纤维素膜或 PVDF 膜上低皮克级的蛋白条带；
- 2、长信号持续时间：在条件优化情况下，经底物孵育的印迹条带能够持续输出 6-8 小时的可检测光信号；
- 3、稳定试剂：工作液在 24 小时内保持稳定；
- 4、成像方法：适用于 X 射线胶片、CCD 或激光凝胶成像仪；
- 5、价格经济：针对稀释的抗体浓度条件进行了优化：  
0.2 至 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  一抗（以 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  储存液稀释 1:1,000 至 1:5,000 倍）  
10 至 50  $\text{ng}/\text{mL}$  二抗（以 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  储存液稀释 1:20,000 至 1:100,000 倍）
- 6、简单易用：可替代其它公司的 ECL 发光底物，操作步骤无需进行特别优化；

### 使用方法：

- 1、执行常规 SDS-PAGE、转膜和 Western Blot 步骤。注意用 HRP 标记 IgG 或用一抗-链亲和素-生物素-HRP 夹法。

2、Western Blot 最后一次洗膜的同时配制新鲜发光工作液：分别取等体积的溶液 A 和 B，放入干净容器中混合。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。将膜完全浸入发光工作液(0.125mL 发光工作液/cm<sup>2</sup>膜)中，使膜与发光工作液充分接触。室温孵育 3 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、滤纸上沥干膜上发光工作液。但勿洗去发光液。

5、打开 X 光胶片暗盒，在暗盒内表面铺一张面积大于膜的保鲜膜。将 Western Blot 膜贴在保鲜膜上，将保鲜膜折起来完全包裹 Western Blot 膜，去除气泡和皱褶。用滤纸吸去多余的发光工作液。用胶带将覆盖 Western Blot 膜的保鲜膜固定在暗盒内，蛋白带面向上。

6、暗房内压 X 光胶片，分别曝光不同的时间如数秒到数分钟。显影冲洗。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 min 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。

#### **注意事项：**

为获得最佳效果，需优化该系统，包括样品量、一抗和二抗浓度、膜和封闭试剂的类型。

1、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。

2、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，牛奶中含有的不定量内源性生物素会导致高背景信号。

3、实验中避免印迹膜变干。

4、叠氮钠是 HRP 的抑制物，不要使用叠氮钠作为缓冲液的防腐剂。

5、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。

6、短时间暴露于实验室常规照明不会损害该工作液，但应避免长期暴露在强光下

**问题解答：**

问题	可能问题	解决方案
胶片上有反转像（即黑色背景，白色带）	系统中 HRP 过多	将 HRP 标记二抗稀释至少 10 倍
膜上有褐色或黄色带		
印迹在暗室中发光		
信号持续时间少于 8 小时		
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
	抗原或抗体的量不足	增加抗体或抗原的量
	蛋白质转移率低	优化转印
	HRP 或底物活性低	见下文注释
高背景	系统中 HRP 过多	将 HRP 标记二抗稀释至少 10 倍
	封闭不充分	优化封闭条件
	封闭式机不合适	尝试一种不同的封闭试剂
	洗涤不充分	增加洗涤时间、次数或洗涤缓冲液体积
	胶片过度曝光	缩短曝光时间或使用背景消除剂
	抗原或抗体的浓度太高	减少抗体或抗原的量
蛋白质条内有斑点	蛋白质转膜效率低	优化转印流程
	膜的水化不均匀	按照制造商建议适度的使膜水化
	胶片与膜之间存在气泡	在胶片曝光前，去除气泡
胶片上背景有斑点	HRP 标记二抗中存在聚集物	使用 0.2um 的过滤器
非特异性条带	系统中 HRP 过多	将 HRP 标记二抗稀释至少 10 倍。
	SDS 导致的蛋白非特异性结合	在检测过程中不使用 SDS

\*为检测系统活性，暗室中，在一个清洁试管中制备 1-2ml 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。

**保存条件：**

室温运输，4 °C 密封避光保存一年，短期可放置室温。