

## 增强型/超敏型 ECL 化学发光试剂盒

### Enhanced/Super ECL Kit

货号	Solution I	Solution II
BF06053-50 (增强型)	25ml	25ml
BF06053-100 (增强型)	50ml	50ml
BF06053-250 (增强型)	125ml	125ml
BF06053-500 (增强型)	250ml	250ml
BF06053S-50 (超敏型)	25ml	25ml
BF06053S-100 (超敏型)	50ml	50ml
BF06053S-250 (超敏型)	125ml	125ml
BF06053S-500 (超敏型)	250ml	250ml

室温 (25℃) 可以保存 1 年以上, 但长期不用建议保存在 4℃ 冰箱

#### 1. 产品说明

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, 发出强烈辉光, 检测灵敏度达到 pg 级。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 30-100 倍, 并有效地降低了背景。试剂盒使用新的氧化剂代替不稳定的双氧水, 提高了试剂盒的稳定性, 室温可稳定放置 1 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。

超敏型的灵敏度比增强型高 10 倍以上 (见下图), 对于增强型无法检测的微量样品, 可以选择超敏型。



## 2. 溶液配制

- 1) 一抗工作浓度：0.2-1.0  $\mu\text{g/ml}$ ;
- 2) HRP 标记二抗工作浓度：10-500 ng/ml，根据二抗效价调整。
- 3) 发光检测工作液的配制：Solution I : Solution II = 1:1 (10  $\text{cm}^2$  转印膜使用 1-2 ml 工作液)

### 抗体去除液（用于膜的再生）

- 基本型：0.1M 甘氨酸，HCl 调整 pH 至 2.7
- 传统型：2% SDS, 0.1M mercaptoethanol, 50mM Tris-HCl, pH 7.0
- 高效型：6M GuHCl, 0.2% Nonidet P-40 (NP-40), 0.1M  $\beta$ -mercaptoethanol, 20mM Tris-HCl, pH7.5

## 3. 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 $\text{cm}^2$  膜使用 1-2ml 工作液，按比例吸取等体积溶液 I 和溶液 II 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。

### 3.1 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。

### 3.2 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。

### 3.3 管式化学发光法

- 1) 将鲁米诺的化学辉光检测波长可设定在 420 nm 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。

#### 4. 注意事项

- 1) 针对含量较高的蛋白 (比如内参蛋白), 发光强度较高, 可以将工作液用去离子水稀释 2-5 倍, 可以节省显色液。
- 2) 试剂盒 Solution I 为底物, 保存于避光试剂瓶中, Solution II 为氧化剂。通常取样顺序是先取底物 Solution I, 换枪头后再取氧化剂 Solution II。这样可以避免忘记换枪头, 造成底物失效。
- 3) 本试剂盒较为稳定, 室温 (25°C) 可以保存一年以上, 但长期不用建议保存在 4°C 冰箱中, 夏季高温可能会造成试剂的分解, 降低检测灵敏度。
- 4) 使用生物素-亲和素系统时, 避免使用牛奶封闭, 否则可能会造成背景过高。
- 5) 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, 如果没有, 可以在尖头镊子上套上枪头。
- 6) 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。
- 7) 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。
- 8) 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。
- 9) 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留下痕迹。
- 10) 转印、封闭、孵育都要避免气泡, 这是获得完美图片的关键。
- 11) 部分保鲜膜上有化学发光淬灭剂, 注意选择。市售普通保鲜膜可能太薄, 容易皱缩, 请选择厚度高一点的保鲜膜, 其表面应当光滑平整。

#### 5. 问题及解决方案

3 / 4

问题	原因分析	推荐解决方案
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，若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
X光胶片背景脏，或者出现“一片黑”	一抗、二抗浓度太高	降低抗体浓度，延长封闭时间；或将ECL工作液用去离子水稀释2-5倍后使用
	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