

ECL Plus 化学发光底物说明书

保存：室温运输，收到后在 4°C避光下储存试剂

一. 产品描述：Super ECL Plus超敏发光液用于检测直接或间接标记辣根过氧化物酶HRP的抗体及其关联的抗原。由于采用了独特的发光底物系统，Super ECL Plus超敏发光液是目前最灵敏的商业化荧光ECL检测试剂：

- (1) 可使用更高的抗体稀释倍数(1:2000 ~ 1:10000)，极其节省抗体。
- (2) 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
- (3) 灵敏度更高—可检测低皮克级的蛋白
- (4) 信号持续时间更长—光信号持续时间长达5小时
- (5) 更多成像方法—适用于X射线胶片、CCD或激光成像仪
- (6) 价格更经济—相比其他品牌的类似产品，不仅具有高品质和高性能，同时价格也更低

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

三. 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。

操作概述

注：优化抗原和抗体的浓度。必须使用建议的抗体稀释度，以保证阳性结果。

- 1) 将一抗浓度稀释到0.05 ~ 1ug/ml
- 2) 将二抗浓度稀释到 0.005 ~ 0.04ug/mL
- 3) 将两种底物组份按 1:1 比例混合，制备底物工作液。

注：暴露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，并避免长期暴露于任何强光。短时间暴露于实验室常规照明不会损害该工作液。

- 4) 将印迹膜在 ECL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。

6) 使印迹膜在X光胶片上曝光。

2. Western Blot最后一次洗膜的同时新鲜配制发光工作液：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/cm²膜）中，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. 用镊子夹起膜，搭在滤纸上沥干发光工作液。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，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。

四. 储存：4 °C密封避光保存一年以上。短期可放置室温。

五. 安全性：无特殊毒性，按普通化学品处理。

六. 注意事项：

（1）步骤1～5可在日光灯下操作；但发光液曝露于强光下时间过久灵敏度可能略有降低，移到暗房操作可避免之。戴手套可以避免在膜上留下手印。

（2）长时间曝光或蛋白过量，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。

（3）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。

- (4) 由于超敏发光液极其灵敏，强烈推荐大多数进口抗体起始浓度为一抗1:1000 ~ 1:4000，二抗1:2000 ~ 1:5000。抗体浓度过高将造成高背景或没有条带，导致失败。
- (5) 某些保鲜膜包裹印迹膜时可能会淬灭荧光，应选择高质量保鲜膜。
- (6) 使用肉眼可见的预染色蛋白Marker和荧光-放射自显影曝光标签可精确确定胶片上条带的位置和大小。
- (7) NaN_3 能抑制HRP活性，回收第二抗体应避免使用 NaN_3 ，如必需使用勿超过0.01%。