



# ECL Basic

# ECL Enhanced

# ECL Super

## 目录

1. 产品介绍.....	1
2. 缓冲液配制.....	1
3. 操作步骤.....	1
4. 问题及解决方案.....	2
5. 注意事项.....	2
6. 订购信息及相关产品.....	2

## 1. 产品介绍

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) 催化发光。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。发光检测工作液被HRP催化后, 发出特定波长荧光 (400-450 nm), 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。

## 2. 缓冲液配制

一抗工作浓度: 0.2-1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;

HRP标记二抗工作浓度: 10-500  $\text{ng}/\text{mL}$ , 根据二抗效价调整;

发光检测工作液的使用比例: 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

ECL Basic: 0.1 M 甘氨酸, HCl调整pH至2.7;

ECL Enhanced: 2% SDS, 0.1 M  $\beta$ -mercaptoethanol, 50 mM Tris-HCl, pH 7.0;

ECL Super: 6 M GuHCl, 0.2% Nonidet P-40 (NP-40), 0.1 M  $\beta$ -mercaptoethanol, 20 mM 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1-2 mL工作液, 按比例吸取等体积Solution I和Solution II混匀, 配制发光检测工作液。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 min, 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 s至1 min。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) 将鲁米诺的化学发光检测波长可设定在425 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 s), 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. 问题及解决方案

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
X光胶片背景脏	反应系统中HRP量过多	稀释HRP标记物
	一抗、二抗浓度太高	降低抗体浓度, 延长封闭时间
条带有空斑	抗体未清洗干净	增加洗膜次数
	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
条带不规则	转膜时有气泡也有可能是转印膜没有水化均匀剂盒	转膜时尽量优化条件

## 5. 注意事项

- 1) 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。
- 2) 本试剂盒较为稳定, 室温(25°C)可以保存一年以上, 长期不用建议保存在2-8°C。
- 3) 使用生物素-亲和素系统时, 避免使用牛奶封闭, 可能会造成背景过高。
- 4) 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。
- 5) 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。
- 6) 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。
- 7) 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。
- 8) 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造成很深的背景。
- 9) 转印、封闭、孵育都要避免气泡。

## 6. 订购信息及相关产品

产品名称	货号	规格
ECL Basic	AL008-01	50 mL+50 mL
	AL008-02	250 mL+250 mL
ECL Enhanced	AL009-01	50 mL+50 mL
	AL009-02	250 mL+250 mL
ECL Super	AL010-01	50 mL+50 mL