

高灵敏化学发光检测试剂盒 (ECL Reagent)

产品简介:

ECL Reagent是一种基于Luminol的高灵敏性、非放射性化学发光底物,用于检测免疫印迹中固定在膜上的标记有辣根过氧化物酶(HRP)的蛋白,可检测pg级的抗原。Luminol在酶的催化作用下发生氧化降解,在增强剂的作用下发射波长为428nm的极强的光信号,持续时间长、稳定性高,检测方便。

其原理是,蛋白质或核酸电泳分离后转印到膜上,以一抗及HRP标记的二抗结合膜上的目的蛋白,或以HRP标记的探针直接或间接结合膜上的核酸。洗膜后用本产品配制的ECL工作液,在室温下孵育膜1分钟,将印迹膜用保鲜膜包裹粘帖固定于X光片曝光暗盒中,然后暗室中将X光胶片压在膜上曝光数秒到数分钟。显影定影后蛋白质或核酸条带可清晰显示在X光胶片上。也可不进行X光胶片曝光,而直接对印迹膜进行荧光CCD扫描。光信号支持重复曝光,以获得最佳的结果。也可洗膜脱抗体后可供再次检测。

贮藏条件:

2-8℃保存,可稳定保存一年。

使用方法:

1. 按常规方法完成SDS-PAGE和电转膜操作,将转印好的膜从转膜装置上卸下来,并用封闭剂封闭膜上的非特异结合位点,室温下摇晃封闭1小时或2-8℃静置封闭过夜。
◇ 注意:封闭非常重要
2. 弃封闭液,加入一抗工作液,室温下摇晃孵育1小时或2-8℃静置孵育过夜。
3. 用洗膜缓冲液漂洗膜2次,然后用充分体积的洗膜缓冲液洗膜4-6次,每次5分钟。
4. 用标记HRP的二抗工作液室温下摇晃孵育1小时。
5. 重复步骤3,彻底洗掉没有结合的二抗。
6. 将试剂A和试剂B按1:1的比例混合成ECL工作液,根据每平方厘米膜片使用0.1-0.2ml的量以覆盖全膜片。用ECL工作液充分覆盖膜后室温孵育1分钟。
◇ 注意:ECL工作液最好在临时用前现配现用,室温下放置最多不超过1小时。
7. 用平头镊钳住膜片,垂直置于吸水纸上吸去过量试剂,将膜置于两层保鲜膜之间,小心赶走膜与保鲜膜之间的气泡。
8. 将膜片吸附蛋白的面朝上置于暗盒中,于暗室中,取出胶片覆于膜表面,第一次曝光60秒,之后根据结果调整曝光时间,以达到最佳效果。
◇ 注意:确保膜和保鲜膜上多余的液体已移除,曝光过程中要保持胶片干燥。
9. 取出胶片在显影液和定影液显影。如果信号太强,减少曝光时间或脱掉抗体后降低抗体浓度重新孵育。
10. 在孵育后的最初5-30分钟内发光最强,发光最长可持续数小时,但随着时间的推移光信号减弱。
◇ 注意:膜与胶片之间的移动,将影响图片效果,造成干扰。
11. 膜的重复使用:配置62.5mm Tris-HCl, pH6.7, 2%SDS, 7ml/100ml的巯基乙醇的溶液,膜放入后,70℃振荡水浴30分钟。再用TBST或PBST缓冲液洗脱,最后用BSA(牛血清白蛋白)或牛奶封闭。

注意事项:

1. 本试剂每个批号均独立优化, 请不要混用或稀释本试剂以免降低敏感性。
2. ECL 工作液配制过程中吸取试剂 A 和试剂 B 时务必更换枪头, 工作液新鲜配制后立即使用, 放置过久会影响灵敏度。
3. 根据不同的实验选择合适的封闭剂, 如避免使用脱脂奶粉去检测抗生物素/生物素系统, 因为牛奶中含有许多内源生物素, 会导致背景过高。
4. 使用足够体积的洗涤缓冲液、封闭液、抗体稀释液及 ECL 底物反应液, 使液体能充分覆盖膜表面, 避免膜变干。使用大量洗涤缓冲液和封闭液并不会导致发光没有信号。在各孵育和洗涤的过程中, 最好使用水平托盘摇床。
5. 避免使用含有叠氮钠的缓冲液, 叠氮钠会抑制 HRP 反应, 干扰实验结果。
6. 请勿空手拿膜, 务必全程戴手套并使用清洁的平口镊子夹膜。
7. 操作过程中请勿使用生锈的金属盒 (如剪刀、镊子等), 以免造成严重的背景。
8. 根据蛋白丰度不同曝光时间可能是数秒至数小时。
9. 曝光时间过长会使背景加深, 曝光不足会导致条带模糊。
10. 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。

包装规格

	货号	规格	包装规格 (试剂 A/B)
高灵敏度型	E002-010	10ml (5ml / 5ml)	1 瓶 / 1 瓶
	E002-100	100ml (50ml / 50ml)	1 瓶 / 1 瓶
	E002-200	200ml (100ml / 100ml)	1 瓶 / 1 瓶
	E002-250	250ml (125ml / 125ml)	1 瓶 / 1 瓶
	E002-X	500ml 以上	
超灵敏度型	E003-003	3ml (1.5ml / 1.5ml)	1 管 / 1 管
	E003-100	100ml (50ml / 50ml)	1 瓶 / 1 瓶
	E003-200	200ml (100ml / 100ml)	1 瓶 / 1 瓶
	E003-X	200ml 以上	

外包装使用示意图:



打开盒盖



沿着虚线把盒盖去除



瓶子移出



内侧盖压下纸盒内侧