

灵敏型 ECL Plus 化学发光检测试剂盒说明书

1 产品基本信息

产品名称（中文）：灵敏型 ECL Plus 化学发光检测试剂盒

产品名称（英文）：Sensitive ECL Plus Western Blotting Substrate

产品编号：MD1614

2 规格或纯度

10 mL, 100 mL, 500 mL

3 产品介绍

产品简介：

试剂盒基于辣根过氧化物酶（HRP）催化化学反应进而产生光信号的原理。通过电泳实验，依据目标蛋白质或核酸的电荷、分子大小等特性，将其分离，随后转移至具备良好吸附性能的印迹膜上，常见的如 NC 膜或 PVDF 膜。检测蛋白时利用抗原抗体间的特异性结合，使目标蛋白质分子结合到膜上的特异性一抗，再结合 HRP 标记的二抗，形成具有级联放大效应的免疫反应体系；检测核酸时，则使用 HRP 标记的核酸探针与目标核酸进行杂交实现对目标核酸序列的特异性识别。随后向反应体系添加本试剂盒配套的化学发光底物，HRP 发挥催化作用，促使底物发生化学反应，生成处于激发态的产物。这些激发态产物在向基态转化的过程中，会以光子形式释放能量，产生化学发光信号。借助化学发光成像系统或检测仪器捕捉与分析产生的光信号，光信号的有无可判断目标分子是否存在，对光信号强度的分析可以获得目标分子相对含量。

产品特点：

- 超高灵敏度：能检测低至飞克级别的蛋白，超痕量蛋白检测表现出色；
- 长效稳定信号：光信号持续稳定，灵敏型 1~2 h，实验结果可靠一致；
- 低背景高精度：有效降低背景干扰，显著提升信噪比；
- 高性价比典范：节省抗体用量，低成本实现高检测效能；
- 广泛兼容性：兼容多种成像方法。

适用范围：

基于 HRP 标记的核酸探针或抗体的免疫印迹实验。

4 储存与运输

储存条件：4 °C 密封避光保存，禁止冻融

运输条件：冰袋运输

5 使用方法（仅供参考）

(1) 抗体孵育：进行常规的 SDS - PAGE 电泳和转膜步骤，一抗浓度控制在 0.25~1 $\mu\text{g/mL}$ ，室温孵育 1 h 或 4 °C 过夜，孵育后进行洗膜，二抗浓度为 0.1~0.2 $\mu\text{g/mL}$ ，孵育时间 30~60 min（检测体系必须基于 HRP 酶标抗体）。

(2) 制备 ECL 工作液：孵育后最后一次洗膜时，临用现配 ECL 工作液，分别量取等体积的 A 液和 B 液，混合均匀。

注：室温放置将导致发光工作液灵敏度降低，建议临用现配。

(3) ECL 工作液与膜共孵育：有两种操作方式可供选择。

a 泡染法：用镊子取出膜，沥干洗液，但要保持膜的湿润。将膜完全浸入发光液工作液中，与发光工作液充分接触，室温孵育 3 min；（推荐采用此操作方式）。

b 点染法：用镊子取出膜，沥干洗液，但要保持膜的湿润。将发光工作液缓慢滴加在膜上（125 μL ECL 工作液/ cm^2 膜），要求 ECL 工作液完全覆盖膜且分布均匀，室温孵育 3 min。

- (4) 成像仪检测：用平头镊子夹起膜，沥干多余的 ECL 工作液，但同样要保持湿润，然后确保含蛋白的一面朝上平稳地放置在成像仪的检测板上，即可使用成像仪按照仪器的操作说明进行检测。
- (5) 压片检测：用平头镊子夹起膜，沥干多余的 ECL 工作液，但同样要保持湿润，然后确保含蛋白的一面朝上平稳地放置于保鲜膜上，用吸水纸吸去多余的 ECL 工作液（过程中不能碰触到膜），将膜小心地包在两层保鲜膜中间，用片夹固定。将固定好的膜在暗室环境中先压片 1 min，随后立即显影，定影初步结果，根据初步结果进行适当调整后续压片时间。或分别压片 0.5、1、3、5 min，然后一起显影观察结果。

6 常见问题

Q1：反向图像（即白色条带黑色背景）、膜上有棕色或黄色条带、在暗室污点发光、信号持续时间少于 8 h 是什么原因造成的？该怎么解决？

答：可能由于体系中过多的 HRP。可进一步稀释 HRP 结合物。

Q2：信号微弱或没有是什么原因造成的？该怎么解决？

答：可能是体系中太多的 HRP 耗尽底物，导致信号很快消；抗原或抗体量不足；蛋白转膜效率过低。可进一步稀释 HRP 结合物增加抗原或抗体含量或优化转膜。

Q3：高背景是什么原因造成的？该怎么解决？

答：可能是体系中过多的 HRP；封闭不够；封闭液不合适；洗膜不够；过度曝光；抗原或抗体浓度过高。可进一步稀释 HRP 结合物；优化封闭条件；尝试换另一种封闭液；增加洗膜的时间、次数或洗膜液体积；降低曝光时间；降低抗原或抗体浓度。

Q4：蛋白条带内有斑点是什么原因造成的？该怎么解决？

答：可能是蛋白转膜效率过低；水化膜不均；膜和膜之间存在气泡。可优化转膜程序；正确执行制造商的推荐水化膜过程；曝光前去除气泡。

7 注意事项

- ECL 底物和发光液应避免暴露于强光下，长时间照射会造成灵敏度降低。
- 金属离子被氧化会使膜上产生颗粒状斑点，可使用塑料平头镊子，避免使用生锈的金属工具。
- ECL 两种组分使用过程中为避免交叉污染导致失效，请务必更换枪头。
- 长时间曝光会加深背景；蛋白过量，会使条带强弱变化失去线性关系；曝光不足，则条带模糊或较浅。
- 选择保鲜膜包裹印迹膜时，请使用高质量保鲜膜，避免淬灭荧光或造成污染。
- 利用预染 Marker 肉眼可见的彩色条带，结合荧光-放射自显影曝光标签，能精准确定胶片上条带的位置与大小。
- 叠氮化钠是 HRP 酶的抑制剂，会影响反应体系中酶的活性，抗体或探针回收时缓冲液中的防腐剂应避免使用叠氮化钠。
- 曝光后条带不够清晰，可将膜进行清洗，重新孵育二抗，用 ECL 再次曝光。
- 印迹膜要保持湿润状态，适量的封闭液和洗涤液可以降低非特异性信号的产生。
- ECL 工作液避免隔天使用，否则会降低实验结果准确性。
- 本产品仅限于科研用途并且不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请遵循您所在常规实验室安全规定。