

ECL Plus Western Blotting Substrate

产品货号	产品名称	规格	适用范围
S81001	Sensitive ECL Plus Western Blotting Substrate	10 mL, 100 mL, 500 mL	低皮克级水平蛋白分子的检测
S81002	Ultrasensitive ECL Plus Western Blotting Substrate	10 mL, 100 mL, 500 mL	高飞克到低皮克级水平蛋白分子检测
S81003	Supersensitive ECL Plus Western Blotting Substrate	10 mL, 100 mL	低飞克级水平蛋白分子检测
储运条件	保存：4 °C 密封避光保存，禁止冻融；冰袋运输。		

产品组分

产品货号	S81001			S81002			S81003	
规格 组分	10 mL	100 mL	500 mL	10 mL	100 mL	500 mL	10 mL	100 mL
Solution A	5 mL	50 mL	250 mL	5 mL	50 mL	250 mL	5 mL	50 mL
Solution B	5 mL	50 mL	250 mL	5 mL	50 mL	250 mL	5 mL	50 mL

产品介绍

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。

应用范围

基于 HRP 标记的核酸探针或抗体的免疫印迹实验。

产品特点

1. 超高灵敏度：能检测到低至飞克级别的蛋白，超痕量蛋白检测表现出色；
2. 长效稳定信号：光信号持续稳定，灵敏型 1~2 h，超敏型 6~8 h，特超敏型 8 h，实验结果可靠一致；
3. 低背景高精度：有效降低背景干扰，显著提升信噪比；
4. 高性价比典范：节省抗体用量，低成本实现高检测效能；
5. 广泛兼容性：兼容多种成像方法。

注意事项

1. 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。
2. 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。
3. 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。
4. 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。
5. 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。
6. 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，能精确定位胶片上条带的位置与大小。
7. 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。
8. 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。
9. 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。
10. ECL 工作液避免隔天使用，否则会降低实验结果准确性。
11. 本产品仅限于科研用途并且不得存放于普通住宅内。
12. 为了您的安全和健康，请遵循您所在常规实验室安全规定。

操作步骤（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 $^{\circ}\text{C}$ 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 Solution A 和 Solution B，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。

- (1) 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）。
- (2) 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 μ l ECL 工作液/cm² 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），将膜小心的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。

FAQ

1. 问：出现白色条带黑色背景的反向图像、膜上有黄色或棕色条带、在暗室有强烈发光、发光持续时间很短？
- 答：原因可能是底物显色反应过度，需要 10 倍以上的倍数稀释 HRP 结合物。
2. 问：没有信号或仅有微弱信号？
- 答：（1）抗体浓度过低、效价下降、特异性差或孵育条件不当，都可能影响信号的产生，此情况优化抗体浓度，通过预实验确定最佳稀释度；检查抗体的保存条件和有效期，使用新鲜的抗体；确保孵育过程中温度、时间和缓冲液等条件合适，一般 4°C 过夜或室温孵育 1-2 h。
- （2）目标蛋白表达量低或上样量不足，会使信号微弱甚至检测不到，需要增加上样量，但要注意不要超过凝胶的承载能力；对样品进行浓缩或采用更高效的蛋白提取方法，提高目标蛋白的浓度。
- （3）转膜效率低，蛋白没有有效转移到膜上；转膜过程中膜与凝胶之间有气泡，阻碍蛋白转移；转膜时间或条件不合适，需要优化转膜条件，根据蛋白分子量大小选择合适的转膜时间和电流；转膜前排除膜与凝胶间的气泡；转膜后根据多色 Marker 的情况判断转膜效果，如有问题调整转膜参数。
- （4）成像设备灵敏度低、曝光时间过短或设备故障，会导致信号检测不到或微弱；解决方向有几个可供参考，选择灵敏度高的成像设备；适当延长曝光时间，通过预实验确定最佳曝光时间；定期维护和校准成像设备，确保其正常运行。
3. 问：曝光后结果显示高背景？
- 答：（1）封闭不充分，膜上未结合蛋白的位点没有被封闭剂完全覆盖，导致抗体非特异性结合，从而产生高背景。延长封闭时间，一般封闭 1-2 h，也可 4°C 封闭过夜；更换封闭剂，如从 5% 脱脂奶粉换成 5%BSA，或反之；确保封闭剂的浓度和质量，按照说明书配制。

- (2) 抗体浓度过高或孵育时间过长，过量的抗体容易与膜上的非特异性位点结合，增加背景信号。优化抗体浓度，通过预实验确定最佳稀释度；缩短抗体孵育时间，一般室温孵育 1-2 h 或 4°C 过夜，可根据实际情况调整。
- (3) 洗膜不充分，未结合的抗体没有被充分洗脱，残留的抗体导致背景升高。加洗膜次数，一般洗膜 3-5 次，每次 5-10 min；提高洗膜液的严谨性，如适当增加洗膜液中 Tween-20 的浓度，但要注意过高浓度可能影响蛋白与膜的结合。
- (4) 膜被污染，实验过程中膜接触到了杂质、灰尘或其他蛋白，导致非特异性反应。实验操作在洁净的环境中进行，使用干净的镊子和容器处理膜；避免膜与皮肤直接接触，防止汗液中的蛋白污染膜。
- (5) 底物显色过度，底物反应时间过长，使得非特异性信号也被放大。严格控制底物显色时间，在出现清晰条带且背景较低时及时终止反应；可以先进行预实验，确定合适的显色时间范围。

4. 问：曝光后蛋白条带显示为点状或有很多斑点是什么原因，如何优化解决？

答：(1) 样品问题，样品中蛋白存在聚集现象，可能是由于蛋白浓度过高、保存不当或含有杂质等原因，使得蛋白在电泳过程中不能均匀分离，从而出现点状条带。对样品进行适当稀释，降低蛋白浓度；确保样品在低温下保存，并避免反复冻融；可对样品进行离心或过滤处理，去除杂质。

(2) 凝胶问题，凝胶制备不均匀，如胶浓度不一致、聚合不完全或有气泡，会导致蛋白在凝胶中迁移不规律，形成点状条带。重新制备凝胶，确保试剂准确称量和充分混合；在灌胶过程中避免产生气泡，如有气泡需及时排除；保证凝胶聚合时间充足，可通过观察凝胶边缘是否清晰来判断聚合情况。

(3) 转膜问题，转膜时膜与凝胶之间接触不紧密，存在局部空隙，使蛋白不能均匀转移到膜上，出现点状分布。转膜前将膜和凝胶充分浸泡在转膜缓冲液中，排除气泡；在转膜装置中正确放置膜和凝胶，确保二者紧密贴合；可适当增加转膜压力或延长转膜时间，但要注意避免过度转膜导致蛋白丢失。

(4) 抗体问题，抗体质量不佳或存在聚集，与抗原结合不均匀，导致条带呈点状。更换质量可靠的抗体；对抗体进行离心处理，去除可能存在的聚集物；优化抗体孵育条件，如适当降低孵育温度、延长孵育时间，以提高抗体与抗原的结合效率。