

普通 ECL 化学发光检测试剂盒

产品编号: B500012 / B500013 / B500014

包装规格: A 液 (发光剂), 50mL / 100mL / 250mL

B 液 (稳定剂), 50mL / 100mL / 250mL

产品简介:

Proteintech 研发的普通 ECL 化学发光检测试剂盒是免疫印迹实验中与辣根过氧化物酶 (HRP) 配套使用的底物检测试剂盒。本产品能够在 HRP 的催化下发生化学反应而发光, 可用于检测固定在膜上的蛋白质等生物大分子, 其高灵敏度能够检测 ng 级别的抗原, 发光信号强烈持久, 可以使用照相技术 (X-光胶片曝光) 或者其他成像方法 (如荧光或化学发光成像仪) 进行检测。

保存条件:

4°C 避光保存, 一年有效。如果长期不用, 可以 -20°C 保存。

注意事项:

1. 为获得最佳实验结果, 请务必优化实验条件, 包括检测样品的用量、一抗、二抗稀释度、杂交膜及封闭试剂的选择。
2. 务必使用推荐的抗体稀释浓度以获得阳性结果, 最佳抗原和抗体用量须通过预实验来确定。
3. 由于奶粉中含有内源性生物素, 在使用亲和素/生物素系统时, 封闭液中应避免使用奶粉。
4. 由于叠氮钠是 HRP 抑制剂, 在缓冲液中应避免使用叠氮钠作为防腐剂。
5. 在与膜发生接触过程中, 请佩戴手套且使用干净镊子等洁净器材, 避免蛋白污染及高背景。
6. A 液和 B 液在吸取过程中必须要更换枪头, A 液和 B 液相互污染后会导致 A 液或 B 液逐渐失效, 影响后续的使用效果。A 液与 B 液混合后须尽快使用, 放置过久会影响灵敏度。
7. 各溶液使用后, 请盖紧瓶盖避光保存, 以防失效。特别是 B 液, 含有氧化剂, 比较容易被还原而失效。
8. A 液和 B 液均对人体有害, 操作时请注意适当防护。为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明:

1. Western 二抗孵育后, 印迹膜经过数次充分洗涤后, 用平头镊将膜取出, 用吸水纸略吸去过多的液体 (切勿接触膜的蛋白质), 然后置于一洁净器皿内或是保鲜膜上。

- 根据印迹膜大小，将 A 液与 B 液等体积混合，配制为发光检测底物工作液（使用量约为每 10cm²膜 1mL 或者根据个人实验习惯使用）。滴加发光底物工作液到印迹膜上，确保工作液均匀覆盖在膜上，放置 1-2 分钟。
- 取膜，弃发光底物工作液，用吸水纸略吸去过多的液体，将膜放置于两片洁净保鲜膜中间，此过程应小心完成，避免膜与膜之间产生气泡。随后进行压片检测或是荧光成像仪检测。
- 压片检测：将膜固定于片夹内，暗室内压片 1 分钟，立即显影定影，根据结果再调整压片时间。或直接分别压片 30 秒，1,3,5 分钟，然后一起显影定影观察结果。
- 荧光成像仪检测：将膜放置到荧光成像仪内，参照仪器说明书进行检测。

问题解答:

| 问题 | 可能原因 | 解决方法 |
|------------------|--------------------------------|--|
| 高背景（背景高或无特异性蛋白带） | 一抗的稀释没有使用正确的缓冲液和正确的浓度 | 使用推荐的封闭液和 TBS/T 稀释抗体并 4℃ 孵育过夜。 |
| | 化学发光检测时没有使用相应的膜 | 使用高质量的 NC 膜或 PVDF 膜 |
| | 膜封闭不足导致一抗或二抗产生大量的非特异性结合 | 用含 5% 脱脂奶粉的 TBS/T 在室温封闭 1-2 小时 |
| | 二抗的稀释没有使用正确的缓冲液和正确的浓度，或二抗的特异性差 | 一些二抗会与蛋白产生非特异性的结合。因此在检测中可加入一步二抗的对照试验，在没有一抗的情况下，直接加入二抗孵育。也可将二抗用含 5% 脱脂奶粉的 TBS/T 在室温下孵育 1 小时 |
| | 配制试剂的用水水质不佳 | 在配制试剂时（尤其是磷酸化抗体）使用 Milli-Q 或其它超纯的去离子水 |
| 信号弱（检测不到信号） | 一抗孵育不足 | 适当延长孵育时间（4℃ 孵育过夜） |
| | 转膜不完全 | 转膜时采用更高的电压和更长的时间。也可采用预染的蛋白 Marker 监控转膜的过程 |
| | 封闭膜超时 | 缩短封闭膜的时间 |
| | 蛋白的表达水平低于检测底限 | 在每孔中加入更多的蛋白；先采用免疫沉淀法富集蛋白；换用表达高的样本或细胞；检测前适当刺激蛋白的表达 |
| | 二抗与一抗的结合率太低 | 提高二抗的浓度或换用与一抗匹配的二抗 |
| | 配制试剂时发生交叉污染 | 重新配制各种试剂 |