



## Femto ECL & Dura ECL 化学发光底物 说明书

产品编号: DIB051-2-100ml      DIB051-2-500ml

产品规格: 100ml      500ml

试剂盒成分: ECL Solution A, 10mL; ECL Solution B, 10mL; Sufficient for 200cm<sup>2</sup> of membrane

保存: 室温运输, 收到后在4℃避光下储存试剂

**重要提示:** Femto ECL & Dura ECL化学发光底物是一种特超高灵敏性底物, 其灵敏度比其它化学发光产品(包括Thermo和Millipore的ECL)更高, 为获得底物的最佳效果, 抗体须比其他那些底物一起使用时浓度更低。如果你曾使用国产的ECL化学发光液, 请将抗体在原来稀释浓度的基础上, 再稀释至少10倍以上, 例如: 如果你使用国产ECL底物时将抗体按1:100稀释, 那么使用Femto ECL & Dura ECL底物时抗体应该按1:1000稀释。建议的稀释度范围。

一抗稀释度范围从1mg/ml储备液起1:1,000-1:5,000或0.2-0.1ug/ml  
二抗稀释度范围从1mg/ml储备液起1:20,000-1:100,000或10-50ng/ml

### 产品简介

Femto ECL & Dura ECL化学发光底物是一种用于检测免疫印迹膜上辣根过氧化物酶(HRP)的高灵敏的增强底物。该物底极强的信号输出能够使皮克量的抗原得到检测。信号的敏感度、强度和持续时间使用照相或者其他成像方式检测成为可能。印迹膜可以反复在胶片上曝光以获得最佳效果, 也可以先将膜上的免疫检测试剂进行剥离并重新检测。

### 注意事项(重要):

- ★为获得最佳效果, 必须优化该系统的全部组分, 包括样品量、一抗和二抗浓度以及膜和封闭试剂的类型。由于该底物极其敏感, 底物要求使用比大多数市售底物少得多的样品、一抗、二抗, 通常再稀释浓度10-100倍。
- ★使用该产品比使用沉淀比色底物检测所需的抗体浓度低。为优化抗体浓度, 请进行一次系统的点印迹分析。
- ★封闭试剂有可能与抗体产生交叉反应, 出现非特异性信号。封闭缓冲液同时也会影响系统的灵敏性。选择合适的封闭缓冲液非常必要。
- ★使用亲和素-生物素检测系统时, 避免使用牛奶作为封闭试剂, 因为牛奶中含有不定量的内源性生物素, 会导致高背景信号。
- ★洗涤缓冲液、封闭缓冲液、抗体溶液和底物工作液的使用体积必须确保在整个实验过程中印迹膜完全被液体覆盖, 避免膜变干。增大封闭缓冲液及洗涤缓冲液的使用量可以降低非特异性的信号。
- ★将最终浓度加入封闭缓冲液和稀释的抗体溶液, 以降低非特异信号。不要使用叠氮钠, 它是底物的抑制物。
- ★为获得最佳效果, 在孵育步骤请使用摇床。避免手与膜直接接触, 实验过程应戴手套或使用干净的镊子。
- ★所有设备必须清洁且不沾染外来物质。金属器械(如剪刀)不得具有可见的锈迹。锈迹可能导致斑点形成和高背景。
- ★底物工作液在室温下可稳定1小时。避免暴漏在紫外和太阳光下, 短时间暴漏于实验室常规照明不会损害该工作液。

### 操作步骤概述:

注: 优化抗原和抗体的浓度。必须使用建议抗体稀释度, 以保证阳性结果。建议的稀释度范围请参考其他所需材料。

1. 将一抗从1mg/ml储备液稀释到0.2~1.0ug/ml或1:1,000~1:5,000稀释度
2. 将二抗从1mg/ml储备液稀释到10~50ng/ml或1:20,000~1:100,000稀释度
3. 将两种底物组份按1:1比例混合, 制备底物工作液。

注: 暴漏于太阳光/紫外光下会损害工作液, 此工作液应保存在棕色瓶中。短时间暴漏于实验室常规照明不会损害该工作液。

4. 将印迹膜在Femto ECL & Dura ECL底物工作液中孵育5分钟。
5. 吸出多余试剂。用清洁的塑料膜盖住该印迹膜。
6. 使印迹膜在X光胶片上曝光。

### 其他所需材料

- ★已完成转印的印迹膜: 使用任何合适的电泳法分离蛋白质, 并将这些蛋白质最好转移到硝酸纤维素膜上。
- ★稀释缓冲液: 使用Tris或磷酸盐缓冲液。
- ★洗涤缓冲液: 将5mL 10%的Tween-20加入1.000mL稀释缓冲液(Tween-20的终浓度将为0.05%)。
- ★封闭试剂: 将0.5mL 10%的Tween-20加入100mL的封闭缓冲液, 选择一种与稀释缓冲液具有相同基本组分的封闭缓冲液。
- ★一抗: 选择一种目标蛋白质特异性抗体。使用稀释缓冲液制备该抗体的1mg/ml储备液。使用封闭试剂将抗体从储备液稀释成抗体工作液。稀释度介于1:1,000和1:5,000之间或抗体工作液浓度为0.2-1ug/ml。最佳稀释度取决于一抗和膜上的抗原量。
- ★HRP标记的二抗: 选择一种与二抗特异性结合的HRP标记二抗, 使用稀释缓冲液制备该抗体的1mg/ml储备液。使用封闭试剂将抗体从储备液稀释成抗体工作液。稀释度介于1:20,000和1:100,000之间或抗体工作液浓度为10-50ug/ml。该浓度范围在使用链亲和素-HRP时也适用。二抗的最佳稀释度取决于HRP标记二抗和膜上的抗原量。
- ★用于处理放射显影胶片的胶片暗盒、显影和定影试剂
- ★用于孵育的旋转摇床。



## 蛋白印迹法详细操作步骤

- 1.将印迹膜从蛋白转印设备中取出，加入合适的封闭液在温室下孵育20-60分钟，同时振荡。以封闭膜上非特异性蛋白结合位点。  
注意：使用前文建议的抗体稀释度是非常重要的。
- 2.将膜从封闭液中取出，与一抗工作液在温室孵育1小时，同时振荡；或在28℃孵育过夜，不振荡。
- 3.将足量的洗涤缓冲液加至膜上，保证缓冲液将膜完全覆盖。振荡孵育≥5分钟，更换洗涤缓冲液并重复该步骤4-6次。增加洗涤缓冲液体积，洗涤次数和洗涤时间有助于降低背景信号。  
注：孵育前，膜在洗涤缓冲液中的短暂淋洗会提高洗涤效率。  
请注意：使用前文建议的HRP标记二抗稀释度是非常重要的。
- 4.将HRP标记的二抗工作液与膜在温室孵育1小时，同时振荡。
- 5.重复步骤3，以除去未结合的HRP标记二抗。注：膜与HRP标记二抗孵育后必须进行彻底洗涤。
- 6.将A溶液与B液等比例混合，制备成工作液。每cm<sup>2</sup>膜使用0.01~0.1ml工作液。工作液可以在温室下稳定8小时。  
注：暴露于太阳光/紫外光下会损害工作液，此工作液应保存在棕色瓶中。短时间暴露于实验室常规照明不会损害该工作液。
- 7.将印迹膜在工作液中孵育5分钟。
- 8.从工作液中取出印迹膜，并置于一个干净的塑料片/膜中，用吸水纸吸除多余的液体，并从印记和塑料纸之间小心地压出气泡。
- 9.将包在塑料纸（膜）中的印迹膜置于胶片暗盒中，蛋白质面朝上，除适用于胶片曝光的灯（如红色安全灯）之外，关闭所有的灯。  
注意：曝光期间胶片必须保持干燥；确保将多余的底物从膜和塑料纸上完全去除；在整个胶片处理期间，使用手套；切莫将印迹膜置于已显影的胶片上，因为胶片上的化学物质会减弱信号。
- 10.将X光胶片置于膜的上面。建议第一次曝光60秒。之后可调整曝光时间以达到最佳结果。化学发光反应在底物孵育后的前5-30分钟期间是最强烈的。这一反应可以持续几个小时，但强度会随时间下降，如有底物孵育后较长时间后曝光，曝光时间可能需要延长以获得较强信号。如果使用磷光存储成像设备（如Bio-Rad的分子成像仪系统）或CCD照相机可能需要较长的曝光时间。警告：胶片与膜之间的任何移动可能在胶片上造成人为的非特异信号。
- 11.使用合适的显影剂和定影剂对胶片进行显影。如果信号太强，则缩短曝光时间或将印迹膜进行剥离并降低抗体浓度重新检测。

## 常见问题及解决方案

问题	可能问题	解决方案
1) 胶片上有反转像（即黑色背景，白色带） 2) 膜上有褐色或黄色带 3) 印记在暗室中发光 4) 信号持续时间少于8小时	系统中HRP过多	将HRP标记二抗稀释至少20倍
信号弱或无信号	系统中过多的HRP耗尽了底物并导致信号迅速衰减	将HRP标记二抗稀释至少20倍
	抗原或抗体的量不足	增加抗体或抗原的量
	蛋白质转移率低	优化转印
	HRP或底物活性低	4*见下文注释
高背景	系统中HRP过多	将HRP标记二抗稀释至少20倍
	封闭不充分	优化封闭条件
	封闭式机不合适	尝试一种不同的封闭试剂
	洗涤不充分	增加洗涤时间、次数或洗涤缓冲液体积
	胶片过度曝光	缩短曝光时间或使用背景消除剂
	抗原或抗体的浓度太高	减少抗体或抗原的量
蛋白质条内有斑点	蛋白质转膜效率低	优化转印流程
	膜的水化不均匀	在胶片曝光前，去除气泡
	胶片与膜之间存在气泡	在胶片曝光前，去除气泡
胶片上背景有斑点	HRP标记二抗中存在聚集物	使用0.2um的过滤器
非特异性条带	系统中HRP过多	将HRP标记二抗稀释至少10倍。
	SDS导致的蛋白非特异性结合	在检测过程中不使用SDS

\* 为检测系统活性，在暗室中，在一个清洁试管中制备1-2ml底物工作液。关闭灯，添加1ul未稀释的HRP标记二抗工作液。该溶液应当立即发出蓝色光，蓝光信号在随后的几分钟渐淡。

## 不同ECL发光液检测灵敏度

产品名称	检测浓度	推荐一抗孵育浓度 (ng/mL)	推荐二体孵育浓度 (ng/mL)
ECL plus	皮克级~10 <sup>-12</sup> g	一抗浓度：100~500	二抗浓度：10~50
Pico ECL	皮克级至飞克级10 <sup>-12</sup> g~0 <sup>-15</sup> g	一抗浓度：100~500	二抗浓度：10~50
Femto ECL	小于飞克级<10 <sup>-15</sup> g	一抗浓度：20~100	二抗浓度：4~20
Dura ECL	小于飞克级<10 <sup>-15</sup> g	一抗浓度：2~100	二抗浓度：2~10