



Femto ECL 特敏底物化学发光检测试剂盒

产品信息:

组成	保存	PA135-01
		100ml
溶液 FA	4°C避光	50ml
溶液 FB	4°C避光	50ml

产品简介:

Femto ECL 是一款具有超高灵敏度的增强型化学发光(ECL)底物, 也是目前最高灵敏度的化学发光底物, 可通过辣根过氧化物酶(HRP)实现低飞克级的免疫印迹检测。

存储温度: 室温运输, 收到后在 4°C避光下储存试剂。

产品特点:

- 灵敏—使用适当的一抗和二抗时, 可在硝化纤维膜或PVDF膜上检测丰度为飞克级的蛋白条带
- 定量—所得信号的可定量检测范围跨越两个数量级
- 明亮信号—通过胶片或成像系统进行曝光, 易于捕获图像
- 长信号持续时间—优化条件下, 可检测的光信号输出长达8小时
- 稳定试剂—试剂盒组份能够在4°C条件下稳定放置一年, 在室温下可稳定放置6个月
- 价格经济—配方经过优化, 可适用于浓度极低的抗体检测
- 1ng至0.2 µg/mL一抗 (以1 µg/mL储存液稀释1:5,000至1:100,000倍)
- 2ng至10 ng/mL二抗 (以1 µg/mL储存液稀释1:100,000至1:500,000倍)

当 Femto 底物与优化的抗体浓度和封闭缓冲液配合使用时, 可检测到常规 ECL 底物无法检测的低丰度靶标蛋白。

重要提示

- 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。
- 使用该产品比使用沉淀比色 HRP 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。
- 没有一种封闭试剂对所有系统而言都是最佳的, 所以为每一个免疫印迹检测系统找到最合适的封闭缓冲液非常必需。封闭试剂有可能与抗体产生交叉反应, 导致出现非特异性信号。封闭缓冲液同时也会影响系统的灵敏度。当从一种底物转换为另一种底物时, 有时会出现信号衰减或背景增加的现象, 原因可能是封闭缓冲液不适合新的检测系统。
- 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。
- 保证洗涤缓冲液、封闭缓冲液、抗体溶液和底物工作液的使用体积, 以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。
- 为获得最佳效果, 在孵育步骤请使用摇床。
- 将 Tween20(终浓度 0.05-0.1%)加入封闭缓冲液和稀释的抗体溶液, 以降低非特异信号。使用高品质的产品, 如去污剂。它保存在安瓿中, 过氧化物和其他杂质含量很低。
- 不要使用叠氮钠作为缓冲液的防腐剂。叠氮钠是 HRP 的抑制物。
- 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 8 小时。日光或任何其他强光下可能损害底物, 为获得最佳结果, 将底物工作液保存在琥珀色瓶中, 并避免长期暴露在任何强光下, 短时间暴露于实验室常规照明不会损害该工作液。

操作概述

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

- 1) 将一抗浓度稀释到 1ng 至 0.2 ng/mL (以 1 μ g/mL 储存液稀释 1:5,000 至 1:100,000 倍)
- 2) 将二抗浓度稀释到 2ng 至 10 ng/mL (以 1 μ g/mL 储存液稀释 1:100,000 至 1:500,000 倍)
- 3) 将两种底物组份按 1:1 比例混合，制备底物工作液。

注：暴漏于日光或任何其他强光可能损害工作液，为获得最佳结果，将此工作液保存在琥珀色瓶中，并避免长期暴漏于任何强光。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 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：用合适的电泳法分离蛋白质，并将这些蛋白质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 1000mL 稀释缓冲液 (Tween-20 的终浓度将 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储存液。使用封闭试剂将抗体从储备液稀释成抗体工作液。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储存液。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 1:100000 和 1:500000 之间或抗体工作液浓度为 2~10ng/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) 将印记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。请注意：使用在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°C 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 \geq 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：使用在前文建议的 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 FA 溶液与 FB 溶液等比例混合，制备成工作液。每 cm^2 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：暴漏雨日光或任何其他强光下可能损害工作液，为获得最佳结果，将此工作液保存在琥珀色瓶中，并避免长期暴漏雨任何强光。实验室的常见照明不会损害工作液。
- 7) 将印记膜在工作液中孵育 5 分钟。
- 8) 从工作液中取出印记膜，并置于一个塑料片或清洁的塑料纸 (膜) 中，用一张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) 中的印记膜置于胶片暗盒中，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：胶片必须在曝光期间保持干燥，为获得最佳效果，采取以下措施：

- * 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。
- * 切莫将印记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记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
胶片上有反转像（即黑色背景，白色带）	系统中 HRP 过多	将 HRP 标记二抗稀释至少 10 倍
膜上有褐色或黄色带		
印记在暗室中发光		
信号持续时间少于 8 小时		
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 10 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	见下文注释
高背景	系统中 HRP 过多	将 HRP 标记二抗稀释至少 10 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
蛋白质条内有斑点	抗原或抗体的浓度太高	减少抗体或抗原的量
	蛋白质转膜效率低	优化转印流程
	膜的水化不均匀	按照制造商建议适度的使膜水化
胶片上背景有斑点	胶片与膜之间存在气泡	在胶片曝光前，去除气泡
非特异性条带	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。