

鲁米诺化学发光试剂盒

产品货号信息

产品名称	货号	规格	价格	货期
Basic ECL Kits	TW000012	50 ml+50 ml	600	1-2 周
	TW000012L	250 ml+250 ml	1500	1-2 周
Enhanced ECL ECL Kits	TW000013	50 ml+50 ml	850	1-2 周
	TW000013L	250 ml+250 ml	2000	1-2 周
Super ECL ECL Kits	TW000014	50 ml+50 ml	1225	1-2 周
	TW000014L	250 ml+250 ml	4000	1-2 周

1. 产品介绍

本产品是基于鲁米诺 (Luminol) 底物的化学发光试剂盒, 能够被辣根过氧化物酶 (HRP) 催化发光。本试剂盒优化了底物组成, 使用了新型高效增强剂, 发光强度比传统 ECL 显色液提高了 30-100 倍, 并有效地降低了背景。试剂盒使用新的氧化剂代替不稳定的双氧水, 提高了试剂盒的稳定性, 室温可稳定放置 1 年。工作液被 HRP 催化后, 发出特定波长荧光 (400-450 nm), 可对 X 光胶片曝光, 也可直接使用荧光 CCD 扫描, 主要应用于 Western 检测以及化学发光免疫检测系统。

2. 缓冲液配制

一抗工作浓度: 0.2-1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$;

HRP 标记二抗工作浓度: 10-500 ng/mL, 根据二抗效价调整。

显色液的使用比例: Solution I: Solution II = 1: 1; 10 cm^2 转印膜使用 1-2 ml 工作液。

抗体去除液

- 基本型: 0.1 M 甘氨酸, HCl 调整 pH 至 2.7
- 传统型: 2% SDS, 0.1 M β -mercaptoethanol, 50 mM Tris-HCl, pH 7.0
- 高效型: 6 M Gu-HCl, 0.2% Nonidet P-40 (NP-40), 0.1 M β -mercaptoethanol, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5

3. 操作步骤

根据常规操作转印结束后, 进行封闭、一抗孵育、二抗孵育以及必要的洗膜步骤, 根据膜的大小, 按每 10 cm^2 膜使用 1-2ml 工作液, 按比例吸取等体积溶液 I 和溶液 II 混匀, 配制成发光检测工作液。用平头镊子将膜取出, 膜的下缘轻轻接触吸水纸, 去除膜上多余的液体。用移液器将工作液加到转印膜上, 使其均匀覆盖, 室温孵育 1-2 min, 此步骤可在洁净保鲜膜上或塑料盒中完成。

3.1 X 光胶片法

- 用平头镊子夹起转印膜, 膜的下缘轻轻接触吸水纸, 去除膜上多余的液体, 留下少量工作液, 不要让膜完全干燥。膜的蛋白面朝上, 包裹于洁净保鲜膜内。轻轻赶出其间的气泡, 用小块透明胶带粘住四角, 固定在 X 光片暗盒内。
- 在暗室中取一张 X 光胶片置于包裹的膜上, 合上暗盒, 曝光 30 s 至 1 min。立即定影、显影, 根据曝光强度, 调整下一张 X 光胶片的曝光时间。如果背景过高, 可以使用两张 X 光胶片同时压片。

3.2 荧光拍照法

- 如果需要使用 CCD 拍照, 可以将膜放置于工作液中, 开机后按照使用说明, 将转印膜取出, 进行拍照。
- 可以根据背景情况, 调整机器测量参数, 提高信噪比。

3.3 管式化学发光法

- 将鲁米诺的化学发光检测波长可设定在 425nm 左右, 可以选择单点测量, 或者取多次平均值。
- 按照机器要求, 将配制好的工作液加入到样品管中, 间隔一定时间测量发光强度, 注意鲁米诺系统的发光到达峰值有一定延迟 (30-300 s), 不同样本的测量时间间隔要固定。
- HRP 催化鲁米诺发光的体系还受到反应温度以及 pH 的强烈影响, 所以工作试剂准备以及发光测量需要考虑到此类

因素。

4. 注意事项

- 试剂盒 Solution I 为底物，保存于避光试剂瓶中，Solution II 为氧化剂。通常取样顺序是先取底物 Solution I，换枪头后再取氧化剂 Solution II。
- 本试剂盒较为稳定，室温（25℃）可以保存一年以上，长期不用建议保存在 2-8℃。
- 使用生物素-亲和素系统时，避免使用牛奶封闭，可能会造成背景过高。
- 金属氧化物颗粒可能会造成膜上出现颗粒状斑点，避免使用带有锈迹的剪刀以及镊子，可以使用平头塑料镊子。
- 叠氮化钠抑制 HRP 的催化能力，在缓冲液中尽量避免使用叠氮化钠作为防腐剂。
- 封闭、洗膜、孵育等步骤耗时较长，注意膜与塑料界面的摩擦不均匀可能造成部分位置条带消失，可以在保鲜膜中孵育以及封闭，洗膜的塑料盒底面不要有明显凸起，可以通过剪角的方法，区别转印膜有蛋白的一面。
- 不同转印膜对蛋白的吸附能力不同，硝酸纤维素较软，避免出现折痕。PVDF 膜使用前需要使用甲醇水化均匀。
- 勿将多张膜置于同一个洗膜盒中洗膜，相互吸附以及摩擦可能造成很深的背景。
- 转印、封闭、孵育都要避免气泡。

5. 使用问题及解决方案

问题	原因分析	推荐解决方案
胶片无条带/信号较弱	转膜的效率低	用预染色分子量标准来判断，提高转膜效率
	抗原/抗体量少或不匹配	增加抗原/抗体量或选择合适抗原/抗体
	X光胶片有问题	X光片洗片以后应当为透明的胶片，如果全黑则说明已经完全曝光了，应当废弃
	定显影液有问题	可以先曝光一张胶片来验证，若有问题及时更换新的定显影液
X光胶片背景脏	反应系统中HRP量过多	稀释HRP标记物
	一抗、二抗浓度太高	降低抗体浓度，延长封闭时间
	抗体未清洗干净	增加洗膜次数
条带有空斑	抗原以及二抗的浓度过高	稀释样品重新跑胶，也可以将混合好的显色液冰浴后，加入到膜上，立即快速显色
带型不规则	转膜时有气泡也有可能是转印膜没有水化均匀	转膜时尽量优化条件