

West Femto ECL 化学发光底物说明书

货号：PE0030

规格：2*12.5ml/ 2*25ml

保存：保存：室温运输，收到后在 4℃ 避光下储存试剂

产品说明：

West Femto 最高灵敏度底物是用于辣根过氧化物酶(HRP)的增强型化学发光底物，有以下特点：

- 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—试剂盒组分能够在 4℃ 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 West 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：

- 1、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。
- 2、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。
- 3、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性。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。
- 4、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。
- 5、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。
- 6、为获得最佳效果，在孵育步骤请使用摇床。
- 7、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。
- 8、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。
- 9、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。
- 10、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。
- 11、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 µg/mL (以 1 µg/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 µg/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 West 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。

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℃ 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 A 溶液与 B 液等比例混合，制备成工作液。每 cm² 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：暴漏于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，并避免长期暴漏于任何强光。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。

注意：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。

注意：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。