



# 超敏型ECL Plus 化学发光检测试剂盒

## IM101

### 产品概述

Product Overview

本试剂盒基于辣根过氧化物酶 (HRP) 催化化学发光反应原理, 通过电泳依据电荷和分子量差异分离目标蛋白, 并转移至印迹膜 (如 NC 膜或 PVDF 膜) 上, 适用于高飞克到低皮克级水平蛋白分子检测。检测蛋白时, 利用一抗和 HRP 标记二抗进行特异性免疫结合; 检测核酸则采用 HRP 标记探针杂交目标序列。加入发光底物后, HRP 催化反应生成激发态中间体, 其退激时释放光子, 产生化学发光信号。通过成像系统捕获光信号, 可定性及定量分析目标分子。

### 产品组成

Product Composition

组 分	IM101 100mL
超敏型 ECL Plus 化学发光检测 A 液	50 mL
超敏型 ECL Plus 化学发光检测 B 液	50 mL

### 注意事项

Precautions

1. ECL 底物和发光液应避免暴露于强光下, 长时间照射会造成灵敏度降低。
2. 金属离子被氧化会使膜上产生颗粒状斑点, 可使用塑料平头镊子, 避免使用生锈的金属工具。
3. ECL 两种组分使用过程中为避免交叉污染导致失效, 请务必更换枪头。
4. 长时间曝光会加深背景; 蛋白过量, 会使条带强弱变化失去线性关系; 曝光不足, 则条带模糊或较浅。
5. 选择保鲜膜包裹印迹膜时, 请使用高质量保鲜膜, 避免淬灭荧光或造成污染。
6. 利用预染 Marker 肉眼可见的彩色条带, 结合荧光-放射自显影曝光标签, 能精准确定胶片上条带位置与大小。
7. 叠氮化钠是 HRP 酶抑制剂, 会影响反应体系中酶活性, 抗体或探针回收时缓冲液中防腐剂应避免使用叠氮化钠。
8. 曝光后条带不够清晰, 可将膜进行清洗, 重新孵育二抗, 用 ECL 再次曝光。
9. 印迹膜要保持湿润状态, 适量的封闭液和洗涤液可以降低非特异性信号的产生。
10. ECL 工作液避免隔天使用, 否则会降低实验结果准确性。
11. 本产品仅限于科研用途并且不得存放于普通住宅内。
12. 为了您的安全和健康, 请遵循您所在常规实验室安全规定。

## 操作流程

Operation Process

1. 抗体孵育：进行常规的 SDS - PAGE 电泳和转膜步骤，一抗浓度控制在 0.25 ~ 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，室温孵育 1 h 或 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜，孵育后进行洗膜，二抗浓度为 0.1 ~ 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，孵育时间 30 ~ 60 min (检测体系必须基于 HRP 酶标抗体)。
2. 制备 ECL 工作液：孵育后最后一次洗膜时，临用现配 ECL 工作液，分别量取等体积 A 液和 B 液，混合均匀。  
注：室温放置将导致发光工作液灵敏度降低，建议临用现配。
3. ECL 工作液与膜共孵育：有两种操作方式可供选择。
  - 1) 泡染法：用镊子取出膜，沥干洗液，但要保持膜的湿润。将膜完全浸入发光液工作液中，与发光工作液充分接触，室温孵育 3 min。(推荐采用此操作方式)
  - 2). 点染法：用镊子取出膜，沥干洗液，但要保持膜的湿润。将发光工作液缓慢滴加在膜上 (125  $\mu\text{l}$  ECL 工作液/ $\text{cm}^2$  膜)，要求 ECL 工作液完全覆盖膜且分布均匀，室温孵育 3 min。
4. 成像仪检测：用平头镊子夹起膜，沥干多余的 ECL 工作液，但同样要保持湿润，然后确保含蛋白的一面朝上平稳地放置在成像仪的检测板上，即可使用成像仪按照仪器的操作说明进行检测。
5. 压片检测：用平头镊子夹起膜，沥干多余的 ECL 工作液，但同样要保持湿润，然后确保含蛋白的一面朝上平稳地放置于保鲜膜上，用吸水纸吸去多余的 ECL 工作液 (过程中不能碰触到膜)，将膜小心的包在两层保鲜膜中间，用片夹固定。将固定好的膜在暗室环境中先压片 1 min，随后立即显影，定影初步结果，根据初步结果进行适当调整后续压片时间。或分别压片 0.5、1、3、5 min，然后一起显影观察结果。

## 保存条件

Storage Conditions

4  $^{\circ}\text{C}$  避光冷藏，有效期见外包装；冰袋运输。

## 常见答疑

Frequent Asked Questions

1. 问：出现白色条带黑色背景的反向图像、膜上有黄色或棕色条带、在暗室有强烈发光、发光持续时间很短？  
答：原因可能是底物显色反应过度，需要 10 倍以上的倍数稀释 HRP 结合物。
2. 问：没有信号或仅有微弱信号？  
答：(1) 抗体浓度过低、效价下降、特异性差或孵育条件不当，都可能影响信号的产生，此情况优化抗体浓度，通过预实验确定最佳稀释度；检查抗体的保存条件和有效期，使用新鲜的抗体；确保孵育过程中温度、时间和缓冲液等条件合适，一般 4 $^{\circ}\text{C}$  过夜或室温孵育 1 ~ 2 小时。  
(2) 目标蛋白表达量低或上样量不足，会使信号微弱甚至检测不到，需要增加上样量，但要注意不要超过凝胶的承载能力；对样品进行浓缩或采用更高效的蛋白提取方法，提高目标蛋白的浓度。  
(3) 转膜效率低，蛋白没有有效转移到膜上；转膜过程中膜与凝胶之间有气泡，阻碍蛋白转移；转膜时间或条件不合适，需要优化转膜条件，根据蛋白分子量大小选择合适的转膜时间和电流；转膜前排除膜与凝胶间的气泡；转膜后根据多色 Marker 的情况判断转膜效果，如有问题调整转膜参数。

(4) 成像设备灵敏度低、曝光时间过短或设备故障，会导致信号检测不到或微弱；解决方向有以下几个可供参考，选择灵敏度高的成像设备；适当延长曝光时间，通过预实验确定最佳曝光时间；定期维护和校准成像设备，确保其正常运行。

### 3. 问：曝光后结果显示高背景？

答：(1) 封闭不充分，膜上未结合蛋白的位点没有被封闭剂完全覆盖，导致抗体非特异性结合，从而产生高背景。延长封闭时间，一般封闭 1 ~ 2 小时，也可 4°C 封闭过夜；更换封闭剂，如从 5% 脱脂奶粉换成 5% BSA，或反之；确保封闭剂的浓度和质量，按照说明书配制。

(2) 抗体浓度过高或孵育时间过长，过量的抗体容易与膜上的非特异性位点结合，增加背景信号。优化抗体浓度，通过预实验确定最佳稀释度；缩短抗体孵育时间，一般室温孵育 1 ~ 2 小时或 4°C 过夜，可根据实际情况调整。

(3) 洗膜不充分，未结合的抗体没有被充分洗脱，残留的抗体导致背景升高。加洗膜次数，一般洗膜 3 ~ 5 次，每次 5 ~ 10 分钟；提高洗膜液的严谨性，如适当增加洗膜液中 Tween-20 的浓度，但要注意过高浓度可能影响蛋白与膜的结合。

(4) 膜被污染，实验过程中膜接触到了杂质、灰尘或其他蛋白，导致非特异性反应。实验操作在洁净的环境中进行，使用干净的镊子和容器处理膜；避免膜与皮肤直接接触，防止汗液中的蛋白污染膜。

(5) 底物显色过度，底物反应时间过长，使得非特异性信号也被放大。严格控制底物显色时间，在出现清晰条带且背景较低时及时终止反应；可以先进行预实验，确定合适的显色时间范围。

### 4. 问：曝光后蛋白条带显示为点状或有很多斑点是什么原因，如何优化解决？

答：(1) 样品问题，样品中蛋白存在聚集现象，可能是由于蛋白浓度过高、保存不当或含有杂质等原因，使得蛋白在电泳过程中不能均匀分离，从而出现点状条带。对样品进行适当稀释，降低蛋白浓度；确保样品在低温下保存，并避免反复冻融；可对样品进行离心或过滤处理，去除杂质。

(2) 凝胶问题，凝胶制备不均匀，如胶浓度不一致、聚合不完全或有气泡，会导致蛋白在凝胶中迁移不规律，形成点状条带。重新制备凝胶，确保试剂准确称量和充分混合；在灌胶过程中避免产生气泡，如有气泡需及时排除；保证凝胶聚合时间充足，可通过观察凝胶边缘是否清晰来判断聚合情况。

(3) 转膜问题，转膜时膜与凝胶之间接触不紧密，存在局部空隙，使蛋白不能均匀转移到膜上，出现点状分布。转膜前将膜和凝胶充分浸泡在转膜缓冲液中，排除气泡；在转膜装置中正确放置膜和凝胶，确保二者紧密贴合；可适当增加转膜压力或延长转膜时间，但要注意避免过度转膜导致蛋白丢失。

(4) 抗体问题，抗体质量不佳或存在聚集，与抗原结合不均匀，导致条带呈点状。更换质量可靠的抗体；对抗体进行离心处理，去除可能存在的聚集物；优化抗体孵育条件，如适当降低孵育温度、延长孵育时间，以提高抗体与抗原的结合效率。