



说明书

SuperSignal® West Pico
化学发光底物

NCI5079 NCI5080

0636.7

编号
NCI5080

描述
SuperSignal West Pico 化学发光底物，
足够用于 5,000cm² 膜
试剂盒包括：
SuperSignal West Pico 鲁米诺 / 增强剂溶液，250ml
SuperSignal West Pico 稳定过氧化物溶液，250ml

NCI5079

SuperSignal West Pico 化学发光底物，
足够用于 500cm² 膜
试剂盒包括：
SuperSignal West Pico 鲁米诺 / 增强剂溶液，25ml
SuperSignal West Pico 稳定过氧化物溶液，25ml

保存：收到后在室温下储存试剂。

目录

产品简介1

产品重要信息1

操作概述1

其他所需材料.....1

蛋白印迹法详细操作步骤1

参考文献2

常见问题及解决方案2

重要提示: Thermo Scientific 品牌的 SuperSignal West Pico 化学发光底物是一种高灵敏性底物，其灵敏度比大多数化学发光产品（包括 ECL、LumiGLO®、Renaissance® 和 Western Lightning™底物）更高。为获得 SuperSignal 底物的最佳效果，抗体须比与其它那些底物一起使用时浓度更低。如果你已经在使用上文所列的底物之一或另一种“入门级别”的化学发光底物，请将一、二抗再稀释至少 5 倍。例如：如果你使用 ECL 底物时将抗体按 1:100 稀释，那么使用 SuperSignal West Pico 底物时抗体应按 1:500 稀释。表 1 中列出了建议的稀释度范围。

一抗稀释度范围从 1mg/ml 储备液起
1:1,000–1:5,000 或 0.2–1.0 µg/ml
二抗稀释度范围从 1mg/ml 储备液起
1:20,000–1:100,000 或 10–50 ng/ml

表 1: 与 SuperSignal West Pico 化学发光底物一起使用的抗体稀释度范围。

产品简介
SuperSignal West Pico 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。该底物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、强度和持续时间使利用照相或其它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结果，也可以先将膜上的免疫检测试剂进行剥离并重新检测。

产品重要信息

- 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，SuperSignal West Pico 底物要求使用比大多数市售底物少得多的样品和一抗、二抗，通常低至少 10–20 倍。
- 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。
- 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 Tween®-20（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 Surfact-Amps®-20（产品编号：28320）。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 的抑制剂。
- 避免手直接与膜接触，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，并避免长期暴露于任何强光。短时间暴露于实验室常规照明不会损害该工作液。
- 我们提供各种蛋白质转移膜、封闭缓冲液、一抗、酶标记二抗、缓冲液和去垢剂。有关产品和订货信息，请访问我们的网站或参考产品名录。

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，请参见其他所需材料一节。

1. 将一抗从 1mg/ml 储备液稀释到 0.2–1.0µg/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. 将两种底物组分按 1:1 比例混合，制备底物工作液。
注：暴露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，并避免长期暴露于任何强光。短时间暴露于实验室常规照明不会损害该工

- 作液。
- 4. 将印迹膜在 SuperSignal West Pico 底物工作液中孵育 5 分钟。
- 5. 吸干多余试剂。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。

* 见第 1 页上的重要提示。

- 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，并将这些蛋白质转移到硝酸纤维素膜上。也可使用其它类型的膜，但操作步骤可能需要进行优化。
 - 稀释缓冲液：使用 Tris 缓冲液（TBS，产品编号：28376）或磷酸盐缓冲液（PBS，产品编号：28374）
 - 洗涤缓冲液：将 5ml 10% 的 Tween-20（Surfact-Amps 20，产品编号：28320）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，如 Thermo Scientific 品牌的 SuperBlock（PBS）封闭缓冲液（产品编号：37515）或 SuperBlock®（TBS）封闭缓冲液（产品编号：37535）。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 0.2–1µg/ml。最佳稀释度取决于一抗和膜上的抗原量。
 - HRP 标记的二抗：选择一种与一抗特异性结合的 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 10–50 ng/ml。该浓度范围在使用链亲和素–HRP（产品编号：21124）或 NeutrAvidin™–HRP（产品编号：31001）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。
 - 用于处理放射自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。

* 见第 1 页上的重要提示。

如产品文件、说明书和 / 或附带的包装说明（“文件”）中所述，保证本产品（“产品”）基本上可按照在销售时生效的所发布产品的说明书操作或使用，并且在材料和工艺方面无瑕疵。除非以书面形式另外明确地授权，本产品仅作参考之用。FDA 未在申请方面提出适用性要求。这里提供的质量保证仅当适当受训的人员使用时才有效。除非在本文件中另外说明，本产品在正常、正确和预期的使用下，本质质量保证仅限于从发货日起一年。本质质量保证不得扩展至非本产品最初购买人（“买方”）以外的任何人。不提供其他明确或暗示的质量保证，这包括，而不限于，对商品性、针对任何具体目的适宜性或无侵权的暗示质量保证。在质保期间，买方对不合格产品的独家权利仅限于就不合格产品进行更换或退款。因 (i) 事故、灾难或不可抗力事件、(ii) 买方错误使用、过错或疏忽、(iii) 以不同于建议使用方式使用本产品或 (iv) 不正确地储存和操作本产品所致的问题，我方概不负责。

蛋白印迹法详细操作步骤

- 将印迹膜从蛋白转印设备中取出，加入合适的封闭液在室温下孵育 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：使用在前文其他所需材料章节中建议的抗体稀释度是非常重要的。
- 将膜从封闭液中取出，与一抗工作液在室温孵育 1 小时，同时振荡；或在 2–8℃ 孵育过夜，不振荡。
- 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至少 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：使用在前文其他所需材料章节中建议 HRP 标记二抗稀释度是非常重要的。
- 将 HRP 标记的二抗工作液与膜在室温孵育 1 小时，同时振荡。
- 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。
- 将稳定过氧化物溶液与鲁米诺 / 增强剂溶液等比例混合，制备成工作液。每 cm² 膜使用 0.1ml 工作液。工作液可以在室温下稳定 8 小时。
注：暴露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，并避免长期暴露于任何强光。实验室的常见照明不会损害工作液。
- 将印迹膜在工作液中孵育 5 分钟。
- 从工作液中取出印迹膜，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，并从印迹膜和塑料纸之间小心地压出气泡。
- 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：胶片必须在曝光期间保持干燥。为获得最佳效果，采取下列预防措施：
 - 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。
- 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小时，但强度会随时间下降。如在底物孵育后较长

时间后曝光，曝光时间可能需要延长以获得较强的信号。

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（如 Alpha-Innotech 公司的 ChemiImager[™] 系统），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。

注：Pierce 背景消除剂（产品编号：21065）可以用来降低 X 光胶片上的背景。

- 使用合适的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。为获得最佳效果，使用 Restore[™] 蛋白质印迹剥离缓冲液（产品编号：21059）。

附加信息

有关本产品的附加信息，包括下列内容，请访问我们的网站：

- 技术提示 #67：化学发光蛋白印迹技术指南和方案
- 技术提示 #21：从 ECL 底物转换为 SuperSignal West Pico 底物
- 技术提示 #23：剥离并重新检测蛋白印迹
- 技术提示 #24：蛋白质印迹法抗原和抗体浓度的优化
- 技术提示 #32：蛋白质印迹法酶底物指南
- 技术提示 #43：蛋白质稳定性和储存
- 蛋白质印迹法手册和问题排除指南

参考文献

CRC 蛋白质免疫印迹手册：第 1 卷技术描述。编者：Ole J. Bjerrum，博士和 Niels H.H. Heegaard，硕士。CRC 出版公司：Boca Raton, FL, 1988.

Kaufmann, S.H., 等人（1987）. 可擦除的蛋白质印迹 Anal. Biochem. 161:89–95.

Mattson, D.L. 和 Bellehumeur, T.G.（1996）. 用于免疫印迹的三种化学发光辣根过氧化物酶底物的比较。 Anal. Biochem. 240:306–308.

Kaufmann, S.H., 等人（1995）. SuperSignal[™] CL–HRP：一种在蛋白质印迹应用中检测辣根过氧化物酶的新的增强型化学发光底物。J. of NIH 研究 7:76。

常见问题及解决方案

问题	可能原因	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		
印迹在暗室中发光		
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
	封闭试剂不合适	尝试一种不同的封闭试剂
	洗涤不充分	增加洗涤的时间、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 Pierce 背景消除剂（产品编号 21065）
	抗原或抗体的浓度太高	减少抗体或抗原的量
蛋白质条带内有斑点	蛋白质转膜效率低	优化转印流程
	膜的水化不均匀	按制造商建议适度地使膜水化
	胶片与膜之间存在气泡	在胶片曝光前，去除气泡
胶片上背景有斑纹	HRP 标记二抗中存在聚集物	使用 0.2µm 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 1 µl 未稀释的 HRP 标记二抗工作液。该溶液应当立即发出蓝色光，蓝光信号在之后的几分钟渐淡。

Thermo Scientific 品牌的相关产品

- 34090 CL–XPosure[™] 胶片，5” × 7” ，100 片 / 包
- 34075 SuperSignal West Dura 长持续时间型底物，100 ml
- 34095 SuperSignal West Femto 最大灵敏度底物，100 ml
- 21059 Restore[™] 蛋白质印迹剥离缓冲液，500 ml
- 21065 Pierce 背景消除试剂盒，用于从 X 光胶片上消除背景
- 37515 SuperBlock[®]（PBS）封闭缓冲液，1 L
- 37535 SuperBlock[®]（TBS）封闭缓冲液，1 L
- 32110 抗体延长剂，500 ml，使用三分之一的一抗量，保证同样的信号强度
- 88018 硝酸纤维素膜，0.45 µm、33 cm × 3 m、1 卷
- 77010 硝酸纤维素膜，0.45 µm、8 × 12 m、25/ 包
- 88025 硝酸纤维素膜，0.45 µm、8 × 8 cm、15/ 包。
- 88600 蛋白质印迹法滤纸，8 cm × 10.5 cm，100 张
- 24580 用于硝酸纤维素膜的 Pierce 可逆性蛋白质染色试剂盒
- 24585 用于 PVDF 膜的 Pierce 可逆性蛋白质染色试剂盒

SuperSignal 技术受美国 专利号 6,432,662 保护。

ECL[™]是 Amersham Pharmacia Biotech. 公司的商标。

LumiGlo[®] 是 KPL 公司的注册商标。

Western Lightning[™]是 PerkinElmer Life Sciences 公司的商标。

Renaissance[®] 是 NEN Life Science 公司产品的商标。

Tween[®] 是 ICI Americas 公司的注册商标。

Molecular Imager[®] 是 Bio-Rad Laboratories 公司的注册商标。

ChemiImager[™]是 Alpha-Innotech 公司的商标。

通过以下网址可获得最新版产品说明书：www.thermo.com/pierce. 要获得传真副本，请致电 800-874-3723 或联系您当地的分销商。

© 2009 Thermo Fisher Scientific 公司保留全部权利。除非另外说明，全部商标均为 Thermo Fisher Scientific Inc. 和其子公司专有。

Pierce Biotechnology PO Box 117 (815) 968–0747 www.thermo.com/pierce
3747 N. Meridian Road Rockford, IL 61105 USA 传真（815）968–7316