SuperStar 超敏 ECL 化学发光试剂盒使用说明书

【包装规格】

产品编号	产品名称	包装
EK-5008-100ml	Super Star ECL Solution A	50ml
	Super Star ECL Solution B	50ml
	使用说明书	1 份

【保存条件】

4℃避光保存 12 月

【概述】

超敏发光液用于检测直接或间接标记辣根过氧化物酶 HRP 的抗体及其关联的抗原。 用于 HRP 标记抗体的 Western Blot 和 HRP 标记探针的核酸杂交。由于采用了独特的发光底物系统，SuperStar ECL 超敏发光液是目前最灵敏的商业化荧光 ECL 检测试剂（具有极高灵敏度和高信噪比）；可在日光灯下进行发光操作；发光迅速，荧光可使 X 光胶片感光达 12 小时以上，特别适用于痕量蛋白或核酸检测；可使用更高的抗体稀释倍数(1:2000～1:10000)，极其节省抗体。

【特点】

- 飞克级灵敏度 - 在硝酸纤维素或 PVDF 膜上检测低至飞克量的目标蛋白量
- 高信号稳定性 - 孵育印迹在关键的 4 小时时间内提供稳定的信号持续时间，在最佳条件下可产生长达 24 小时的光输出
- 稳定的试剂 - 8 小时工作溶液稳定性; 在 4℃下 1 年的试剂盒稳定性
- 更经济的抗体用量：

  0.2 至 1.0μg/ mL 一抗（从 1 mg / mL 原液中 1：1000 至 1：5000 稀释）

  10 至 50 ng / mL 二级抗体（从 1 mg / mL 原液中 1：20,000 至 1：100,000 稀释）

【操作方法】

1. 执行常规 SDS-PAGE、转膜和 Western Blot 步骤。注意用 HRP 标记 lgG 或用一抗-链亲和素-生物素-HRP 夹法。

2. Western Blot 最后一次洗膜的同时新鲜配制发光工作液：分别取 A:B=1:1 混合（如需要 1ml 发光液则取 500ul ECL A 液和 500ul ECL B 液混合），放入干净容器中混合。建议立即使用工作液，室温放置数小时后仍可使用但灵敏度略有降低。

3. 用镊子取出膜，搭在滤纸上沥干洗液但勿使膜完全干燥。将膜完全浸入发光工作液 (0.125ml 发光工作液/cm^2 膜)中，与发光工作液充分接触。室温孵育 2 分钟，准备立即压片曝光。孵育时间过长不会增加灵敏度，有时还会导致曝光条带异常。发光过程的本质是酶促反应，使用过少的发光工作液不利反应进行，也会导致膜上条带曝光不均和明显降低灵敏度。为达节约目的可将 膜剪小但勿降低发光液用量。

4. 用镊子夹起膜，搭在滤纸上沥干发光工作液。但勿洗去发光液。

5. 打开 X 光胶片暗盒，在暗盒内表面铺一张面积大于膜的保鲜膜。将 Western Blot 膜贴在保鲜膜上，将保鲜膜折起来完全包裹 Western Blot 膜，去除气泡和皱褶，可剪去边缘部多余的保鲜膜。用滤纸吸去多余的发光工作液。用胶带将覆盖 Western Blot 膜的保鲜膜固定在暗盒内，蛋白带面向上。

6. 暗房内压 X 光胶片，分别曝光不同的时间如数秒到数分钟。显影冲洗。

【注意事项】

1. 步骤 1～5 可在日光灯下操作;但发光液曝露于强光下时间过久灵敏度可能略有降低，移到暗房操作可避免之。戴手套可以避免在膜上留下手印。

2. 长时间曝光或蛋白过量，将加深背景并使条带强弱变化失去线性关系。曝光不足则条带模糊。

3. 发光工作液孵育约 2 分钟后膜上的条带发光。强条带发光在暗房中肉眼可见，低丰度蛋白条带 发光较弱甚至肉眼不可见但可使 X 光胶片曝光。不能简单以肉眼观察判断条带发光时间。肉眼不可见的荧光实际上可持续数小时并使 X 光胶片感光，因而弱带可曝光 1-10 小时。如果曝光后条带不佳，可用洗膜缓冲液洗膜，重新孵育二抗，然后重新用 ECL 发光和曝光。

4. 由于超敏发光液极其灵敏，强烈推荐大多数进口抗体起始浓度为一抗 1:1000～1:4000，二抗 1:2000～1:5000。抗体浓度过高将造成高背景或没有条带，导致失败。

5. 某些保鲜膜包裹印迹膜时可能会淬灭荧光，应选择高质量保鲜膜。

6. 使用肉眼可见的预染色蛋白 Marker 和荧光-放射自显影曝光标签可精确确定胶片上条带的位置和大小。

7. NaN_3 能抑制 HRP 活性，回收第二抗体应避免使用 NaN_3，如必需使用勿超过 0.01%。