

LumiPico® ECL Kit

User Manual

For Western Blot

Cat.Nos.ZK00901(12.5ml×2) ¥200.00

ZK00902(50.0ml×2) ¥800.00

Published 24 Feb 2007

超敏化学发光试剂(LumiPico® ECL Reagent)

一、用途：

本试剂是非放射性发光系统，用于检测固定在膜上的蛋白，其敏感性达 1-5pg。用 X 光片可快速地获得永久的硬拷贝结果。所含独特的底物足以维持 12 小时以上的发光，便于反复曝光操作，免疫印迹膜经抗体脱卸处理后可供再次抗体探查使用。适用于痕量蛋白或核酸检测。特别节省抗体(一抗 1:500-1:5000，二抗 1:3000-1:10000)。

二、原理：

辣根过氧化酶使试剂中的发光物 (Luminol) 氧化并发光，而试剂中含有增强剂这使得发光增强了 1000 倍。在免疫印迹中，将复杂的蛋白混合物经 SDS-PAGE 分离，并转移到固相膜上 (如 NC、PVDF) 等，用于免疫学检测，经 HRP 标记的抗体与膜上的蛋白直接 (标记一抗) 或间接 (标记二抗) 反应。当加入免疫印迹化学发光试剂后，Luminol 发生氧化降解，并发射波长为 428nm 的光，此光可经 X 光胶片(放射自显影片)感光记录下来。

三、使用方法：

1. 印迹膜制备 按常规方法完成 SDS-PAGE 和电转膜操作，适当的封闭非常重要。可以通过标记一抗或二抗的手段引入 HRP，一般采用市售的 HRP 二抗交联物。仔细地淋洗对于降低背景非常重要，在与 HRP 交联物温育后，膜片更需仔细洗涤，所有步骤均在室温下完成。

2. 化学发光试剂的配置 在使用前等量混合 A 液和 B 液，混合后尽快使用。将膜片置混合液中于室温下振荡温育 2 分钟，每平方厘米膜片至少使用 0.1-0.2ml 以覆盖全膜片。

3. 蛋白信号显现

- 1). 用平头镊钳住膜片，垂直置于吸水纸以吸去过量试剂。
- 2). 置膜片于二层保鲜膜之间，小心赶尽气泡。
- 3). 将膜片吸附蛋白面朝上，置于 X 光片盒中。

- 4). 于暗室中压上 X 光片。
- 5). 根据信号的强弱适当调整曝光时间，一般为 1min 或 5min，也可选择不同时间多次压片，以达最佳效果。显影冲洗。
- 6). 调节曝光时间，再次曝光显影。

4、膜的重复使用：

配置 62.5mM Tris-HCl, PH6.7, 2%SDS, 7ml/100ml 的巯基乙醇的溶液，膜放入后，70°C 振荡水浴 30 分钟。再用 TBST 或 PBST 缓冲液洗脱，最后用 BSA（牛血清白蛋白）或牛奶封闭。

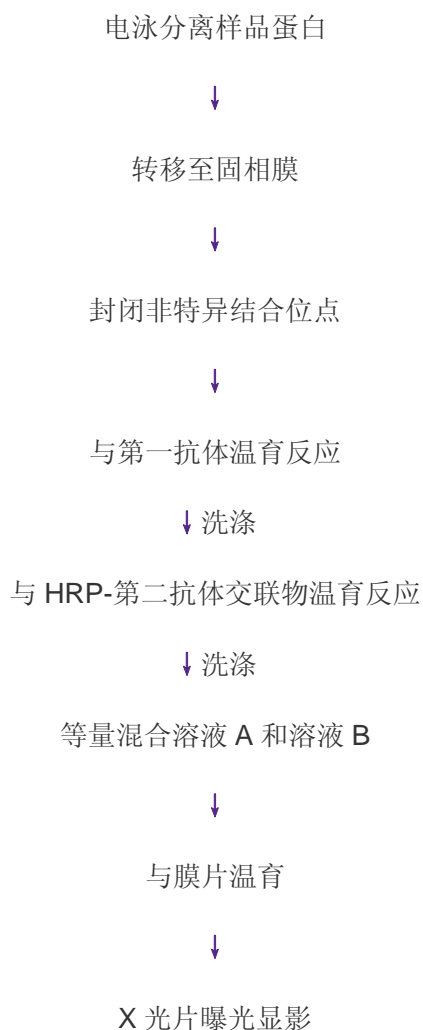
四、操作注意：

1. 本试剂每个批号均独立优化，请不要混用或稀释本试剂以免降低敏感性；
2. 加入一抗后膜不能再干燥；
3. 适当地封闭和洗涤膜片至关重要；
4. 使用前配置化学发光试剂，配置足够覆盖膜片即可，弃去使用过的混合试剂；
5. 使用干净取样头取用每种试剂；
6. 第一张片子建议曝光 1 分钟，观察结果后判断最佳曝光时间可从 30 秒至 2 小时不等；
7. 除了放射自显影片曝光和洗片处理外，所有步骤均不必在暗室中操作；
8. 膜片可经适当方法洗脱原有抗体，再次印迹使用，在此情况下，此试剂更为理想；
9. 因为它不象生色物质需要从膜片上清除底物。
10. NaN_3 能抑制 HRP 活性，应避免使用 NaN_3 。

五、安全性：无特殊毒性，按普通化学品处理。如果不慎与眼、皮肤和衣物接触，请立刻用大量清水冲洗。

六、储存：2-8°C 密封避光保存一年。

七、免疫印迹化学发光检测流程



八、常用的缓冲液

Buffers for Western blot

RIPA（蛋白提取液）

Tris.HCl, 50 mmol/L, pH 7.5;

NaCl, 150 mmol/L;

NP-40, 1%;

脱氧胆酸钠, 5%;

SDS, 0.1%;

EDTA, 1 mmol/L;

PMSF, 1 mmol/L;

Leupeptin, 2 µg/ml

1xSample buffer（上样缓冲液）：

50mM	Tris-Cl	pH 6.8
2%	SDS	
10%	glycerol	
0.02%	Bromophenol blue	
0.7%	2-mercaptoethanol	

Running buffer（电泳缓冲液）：

Tris-base	3.g
glycine	14.4g
10%SDS	10ml

add ddH₂O to 1000ml, Do not adjust the pH!!

Transfer buffer（转移缓冲液）：

Tris-base	3.g
Glycine	14.4g
methanol	200ml

add ddH₂O to 1000ml, Do not adjust the pH!!

Blocking Solution（封闭液）

For 2 blots, prepare 100 ml:

Weigh 5 g skim milk powder into a beaker.

Add 100 ml TBS-T and stir to suspend completely.

TBST buffer（洗涤液）：

20mM	Tris-Cl	pH 7.4
0.15M	NaCl	
0.5%Tween-20	1~5ml	

add ddH₂O to 1000ml, Do not adjust the pH!!

Ponceau Stain（丽春红染液）

Dissolve 0.5 g Ponceau S in 1.0 ml glacial acetic acid. Bring volume to 100 ml with MQ water. Final solution is 0.5% Ponceau/1% acetic acid. Wrap bottle in foil to protect from light. Reuse the solution until staining is no longer as good.

Stripping buffer（膜再生液）

- 1) In graduated cylinder, add 50ml of 10x Tris Buffer, pH 6.8 (500mM), to 300ml ddH₂O.
- 2) Add 100ml 10% SDS
- 3) Add 3.5ml BME
- 4) Bring up to 500ml with ddH₂O.

STRIP DEVELOPED BLOTS:

- 1) Place blot in a 50ml conical tube filled with strip buffer.
- 2) Seal with parafilm and put in water bath set at 50°C for 30 minutes. Shake gently every

10 min.

3) Decant Strip Buffer. Rinse with TBST approximately 5 minutes.

4) Repeat 3 times (4 rinses total).

5) Store in TBS at 4°C or proceed to standard immunoblotting protocol.

九、常见的问题

1) 为什么我的细胞提取液中没有目标蛋白?

答: 原因有很多, 1 你的细胞中不表达这种蛋白质, 换一种细胞; 2 你的细胞中的蛋白质被降解掉了, 你必需加入 PMST, 抑制蛋白酶活性; 3 你的抗体不能识别目标蛋白, 多看看说明, 看是否有问题。

2) 我的细胞提取液有的有沉淀, 有的很清亮, 为什么呢?

答: 1 有沉淀可能是因为你的蛋白没有变性完全, 可以适当提高 SDS 浓度, 同时将样品煮沸时间延长, 2 也不排除你的抗原浓度过高, 这时再加入适量 sample buffer 即可。

3) 我做的蛋白质分子量很小 (10KD), 请问怎么做 WB?

答: 可以选择 PSQ 膜, 同时缩短转移时间。也可以将两张膜叠在一起, 再转移。其他按步骤即可。

4) 我的目的带很弱, 怎么加强?

答: 可以加大抗原上样量。这是最主要的。同时也可以将一抗稀释比例降低。

5) 胶片背景很脏, 有什么解决方法?

答: 减少抗原上样量, 降低一抗浓度, 改变一抗孵育时间, 牛奶浓度提高。

6) 目标带是空白, 周围有背景, 是为什么?

答: 你的一抗浓度较高, 二抗上 HRP 催化活力太强, 同时你的显色底物处于一个临界点, 反应时间不长, 将周围底物催化完, 形成了空白。将一抗和二抗浓度降低, 或更换新底物。

7) 我的胶片是一片空白, 是怎么回事?

答: 如果能够排除下面的几个问题那么问题多半出现在一抗和抗原制备上。

1 二抗的 HRP 活性太强, 将底物消耗光; 2 ECL 底物中 H₂O₂, 不稳定, 失活; 3 ECL 底物没覆盖到相应位置; 4 二抗失活。

8) 我显影液显影 1 分钟, 和 5 分钟后, 底片漆黑一片, 是什么原因呢?

答: 1 可能是红灯造成的, 可以在完全黑暗的情况下操作. 看是否有改善. 胶片本来就被曝光了 2 显影时间过长.

9) DAB 好还是 ECL 好?

答: DAB 有毒, 但是比较灵敏, 是 HRP 最敏感的底物;

ECL 结果容易控制, 但被催化时灵敏度差一点, 但如果达到阈值, 就特别灵敏, 可以检测 pg 级抗原. 要看你实验的情况.

10) 抗原分子量是资料上的两倍, 是怎么回事?

答: 抗原形成了二聚体. 增加巯基乙醇量, 煮沸变性时间延长, 可以打开二聚体. 在上层胶中加入尿素至 8M 也可以打开.

11) 半干转是否要求膜, 滤纸, 胶同样大小? 因为胶大小不一定规则, 膜和滤纸会大一点, 那样会不会短路? 什么是短路? 如何控制和发现短路呢?

答: 一般参照膜>= 滤纸> 胶, 就行, 你转移前和转移过程中看看电压就行, 正常的半干是慢慢变高的, 最后结束时一般是开始的 1.5-3 倍都是正常的. 一般 Buffer 和滤纸选的对就不会短路.

12) 电泳时 Marker 按说明加 5ul, 但电泳中看不见, 是失活了吗?

答: 增加上样量, 比如 10ul 即可.

13) 蛋白转移不到膜上, 但胶上有, 同时 Marker 转上去了, 为什么了?

答: 可能是 1 样品浓度过低 2 转移时间不够 3 转移缓冲液无效.

14) 我的一抗量较少, 同时我也不知道一抗的最佳稀释比例是多少, 怎么做呢?

答: 确定实验过程无污染后, 将含抗体的稀释液回收, 保存于-70℃. 最好第一次的浓度做高一点, 这样, 如果结果不好, 可以尝试再稀释.

十、参考文献

Blake, M.S., et al. A Rapid, Sensitive Method for Detection of Alkaline Phosphatase Conjugated Antibody on Western Blots. **Anal. Biochem.**, 136:175-178, 1984.

Bittner, M., P. Kupferer, and C. F. Morris. 1980. Electrophoretic Transfer of Proteins and Nucleic Acids from Slab Gels to Diazobenzoyloxymethyl Cellulose or Nitrocellulose Sheets. **Anal. Biochem.**, 102:459-471.

Burnette, W.N. 1980. Western Blotting: Electrophoretic Transfer of Proteins from Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gels to Unmodified Nitrocellulose or Nitrocellulose Sheets. **Anal. Biochem.**, 112:195-203.

更详细的内容请访问如下网址:

<http://www.shinegene.org.cn/tools/sg045.pdf>



上海闪晶分子生物科技有限公司

地址: 上海市吴河路328号A座2楼

邮编: 201109

联系: 市场部

电话: 5446 0832 800-988-1995

E-mail: master@shinegene.org.cn

网址: www.shinegene.org.cn