

超敏化学发光试剂(Affinity® ECL Reagent)(PG-level)

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：

辣根过氧化物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 I 液和 II 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，置膜片于二层保鲜膜之间，小心赶尽气泡。
- 2). 将膜片吸附蛋白面朝上，置于 X 光片盒中，于暗室中压上 X 光片。
- 3). 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。
- 4). 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℃振荡水浴 30 分钟。再用 TBST 或 PBST 缓冲液洗脱，最后用脱脂牛奶封闭。

四、操作注意：

1. 加入一抗后膜不能再干燥；
2. 适当地封闭和洗涤膜片至关重要；
3. 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；
4. 使用干净取样头取用每种试剂；
5. 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；
6. 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；
7. 膜片可经适当方法洗脱原有抗体，再次印迹使用，它不像生色物质需要从膜片上清除底物。
8. NaN₃ 能抑制 HRP 活性，应避免使用 NaN₃。

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：

室温密封避光保存一年。

组分	规格
Solution I	25 ml/50ml/250ml
Solution II	25 ml/50ml/250ml