

## 极敏化学发光试剂(Affinity® ECL Reagent)(FG-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 1-5fg。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 1-60s,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 5s,观察结果后判断最佳曝光时间可 1 秒至 1min 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. NaN<sub>3</sub> 能抑制 HRP 活性,应避免使用 NaN<sub>3</sub>。

### 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	25ml/50ml/250ml
Solution II	25ml/50ml/250ml