

鲁米诺化学发光试剂盒

1. 产品说明

2. 本产品是基于鲁米诺底物的化学发光试剂盒,能够被辣根过氧化物酶(HRP)催化发光。

本试剂盒优化了底物组成,使用了新型高效增强剂,发光强度比传统 ECL 显色液提高了 30-100 倍,并有效地降低了背景。试剂盒使用新的氧化剂代替不稳定的双氧水,提高了试剂盒的稳定性,室温可稳定放置 1 年。工作液被 HRP 催化后,发出特定波长荧光(400-450 nm),可对 X 光胶片曝光,也可直接使用荧光 CCD 扫描,主要应用于 Western 检测以及化学发光免疫检测系统。

	货号	Solution I	Solution II	备注
Smart-ECL Basic	30100	50 mL	50 mL	基本型
	30500	250 mL	250 mL	
Smart-ECL Enhanced	H31100	50 mL	50 mL	增强型
	H31500	250 mL	250 mL	
Smart-ECL Super	S32100	50 mL	50 mL	超敏型
	S32500	250 mL	250 mL	

3. 缓冲液配制

一抗工作浓度: 0.2-1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$;

HRP 标记二抗工作浓度: 10-500 ng/mL , 根据二抗效价调整。

显色液的使用比例: Solution I : Solution II = 1:1 ; 10 cm^2 转印膜使用 1-2 mL 工作液。

抗体去除液

基本型: 0.1M 甘氨酸, HCl 调整 pH 至 2.7

传统型: 2% SDS, 0.1M mercaptoethanol, 50mM Tris-HCl, pH 7.0

高效型: 6M GuHCl, 0.2% Nonidet P-40 (NP-40), 0.1M β -mercaptoethanol, 20mM

Tris-HCl, pH7.5

4. 操作步骤

根据常规操作转印结束后，进行封闭、一抗孵育、二抗孵育以及必要的洗膜步骤，根据膜的大小，按每 10cm² 膜使用 1-2mL 工作液，按比例吸取等体积溶液 I 和溶液 II 混匀，配制成发光检测工作液。用平头镊子将膜取出，膜的下缘轻轻接触吸水纸，去除膜上多余的液体。用移液器将工作液加到转印膜上，使其均匀覆盖，室温孵育 1-2 分钟，此步骤可在洁净保鲜膜上或塑料盒中完成。

4.1 X 光胶片法

- 1) 用平头镊子夹起转印膜，膜的下缘轻轻接触吸水纸，去除膜上多余的液体，留下少量工作液，不要让膜完全干燥。膜的蛋白面朝上，包裹于洁净保鲜膜内。轻轻赶出其间的气泡，用小块透明胶带粘住四角，固定在 X 光片暗盒内。
- 2) 在暗室中取一张 X 光胶片置于包裹的膜上，合上暗盒，曝光 30 秒至 1 分钟。立即定影、显影，根据曝光强度，调整下一张 X 光胶片的曝光时间。如果背景过高，可以使用两张 X 光胶片同时压片。

4.2 荧光拍照法

- 1) 如果需要使用 CCD 拍照，可以将膜放置于工作液中，开机后按照使用说明，将转印膜取出，进行拍照。
- 2) 可以根据背景情况，调整机器测量参数，提高信噪比。

4.3 管式化学发光法

- 1) 将鲁米诺的化学发光检测波长可设定在 425nm 左右，可以选择单点测量，或者取多次平均值。
- 2) 按照机器要求，将配制好的工作液加入到样品管中，间隔一定时间测量发光强度，注意

鲁米诺系统的发光到达峰值有一定延迟 (30-300 秒) , 不同样本的测量时间间隔要固定。

3) HRP 催化鲁米诺发光的体系还受到反应温度以及 pH 的强烈影响, 所以工作试剂准备以及发光测量需要考虑到此类因素。

5. 问题及解决方案

问题	原因分析	推荐解决方案
胶片无条带显现 或者信号较弱	转膜的效率低	用预染色分子量标准来判断, 提高转膜效率
	抗原/抗体量少或不匹配	增加抗原/抗体量或选择合适抗原/抗体
	X光胶片有问题	X光片洗片以后应当为透明的胶片, 如果全黑则说明已经完全曝光了, 应当废弃
	定显影液有问题	可以先曝光一张胶片来验证, 弱有问题及时更换新的定显影液
	反应系统中HRP量过多	稀释HRP标记物
X 光胶片背景脏	一抗、二抗浓度太高	降低抗体浓度, 延长封闭时间
	抗体未清洗干净	增加洗膜次数
条带有空斑,	抗原以及二抗的浓度过高	稀释样品重新跑胶, 也可以将混合好的显色液冰浴后, 加入到膜上, 立即快速显色
带型不规则	转膜时有气泡也有可能是	转膜时尽量优化条件
	转印膜没有水化均匀	

6. 注意事项

- Ø 试剂盒 Solution I 为底物, 保存于避光试剂瓶中, Solution II 为氧化剂。通常取样顺序是先取底物 Solution I, 换枪头后再取氧化剂 Solution II。
- Ø 本试剂盒较为稳定, 室温 (25°C) 可以保存一年以上, 长期不用建议保存在 2-8°C。
- Ø 使用生物素-亲和素系统时, 避免使用牛奶封闭, 可能会造成背景过高。

- Ø 金属氧化物颗粒可能会造成膜上出现颗粒状斑点，避免使用带有锈迹的剪刀以及镊子，可以使用平头塑料镊子。
- Ø 叠氮化钠抑制 HRP 的催化能力，在缓冲液中尽量避免使用叠氮化钠作为防腐剂。
- Ø 封闭、洗膜、孵育等步骤耗时较长，注意膜与塑料界面的摩擦不均匀可能造成部分位置条带消失，可以在保鲜膜中孵育以及封闭，洗膜的塑料盒底面不要有明显凸起，可以通过剪角的方法，区别转印膜有蛋白的一面。
- Ø 不同转印膜对蛋白的吸附能力不同，硝酸纤维素较软，避免出现折痕。PVDF 膜使用前需要使用甲醇水化均匀。
- Ø 勿将多张膜置于同一个洗膜盒中洗膜，相互吸附以及摩擦可能造成很深的背景。
- Ø 转印、封闭、孵育都要避免气泡。