



ECL 化学发光 HRP 底物 (超敏)

货号: QS05007

简介

ECL 化学发光 HRP 底物 (超敏) 是一种预混即用型试剂, 专为在聚偏二氟乙烯 (PVDF) 和硝酸纤维素转印膜上的化学发光检测设计, 适用于 Western blot、点/槽/斑点印迹等应用。该底物与所有常用缓冲液和封闭剂兼容。HRP 底物由鲁米诺试剂和过氧化物溶液组成, 通过等体积混合两种试剂即可配制工作液。

内容

鲁米诺试剂: 25 mL; 50 mL; 125 mL; 250 mL

过氧化物溶液: 25 mL; 50 mL; 125 mL; 250 mL

详细 Western blot 操作步骤

1. 封闭: 将转印膜从转移装置中取出, 用封闭剂在室温 (RT) 下振荡封闭 20-60 分钟 (建议 1 小时)。
2. 一抗孵育: 弃去封闭剂, 加入适当稀释的一抗, 在室温振荡孵育 1 小时, 或 4-8°C 过夜。
3. 洗涤: 将膜浸入洗涤缓冲液中振荡 5 分钟, 更换缓冲液 4-6 次。增加洗涤液体积或次数可降低背景。孵育前用洗涤液短暂冲洗膜可提高洗涤效率。
4. 二抗孵育: 加入适当稀释的 HRP 标记二抗, 室温振荡孵育 1 小时。
5. 重复洗涤: 重复步骤 3 以彻底去除未结合的 HRP 标记物。
6. 终末洗涤: 最后用超纯水室温振荡洗涤膜 5 分钟。
7. 配制工作液: 等体积混合稳定过氧化物溶液与鲁米诺/增强剂溶液。按每平方厘米膜使用 0.1 mL 工作液计算用量。工作液在室温下稳定 8 小时, 需避光保存 (建议使用琥珀色瓶)。实验室常规照明不会影响工作液, 但强光直射会破坏其活性。
8. 化学发光反应: 将膜与工作液孵育 5 分钟。
9. 膜保护: 取出膜, 置于塑料膜保护袋 (如文件袋或保鲜膜) 中, 用吸水纸吸去多余液体, 并小心挤出膜与保护袋之间的气泡。
10. 曝光: 将保护好的膜放入暗盒 (蛋白面朝上), 仅保留适用于胶片曝光的光源 (如红色安全灯)。确保胶片干燥, 操作全程戴手套。切勿将膜接触已显影胶片, 残留化学物质可能减弱信号。
11. 曝光时间: 推荐首次曝光时间为 60 秒, 可根据需要调整。光发射在底物孵育后 5-30 分钟内最强, 可持续数小时。若信号过强, 可缩短曝光时间或降低抗原/抗体浓度。注意膜与胶片间避免移动以防伪影。



12. 显影定影：使用显影液和定影液处理胶片。如需复染，可剥离膜并重新孵育。

故障排除

表格

问题	可能原因	解决方案
高背景	系统中 HRP 过量	将 HRP 偶联物稀释至少 10 倍
	封闭不充分	优化封闭条件
	封闭剂不当	更换封闭剂
	洗涤不充分	延长洗涤时间、增加次数或体积
	抗原/抗体浓度过高	降低抗原或抗体浓度
	蛋白相互作用	在洗涤液和检测液中添加 0.05–0.1% Tween-20 表面活性剂以减少非特异性结合
信号弱或无信号	胶片过度曝光	缩短曝光时间（建议首次曝光 30 秒）
	HRP 过量消耗底物导致信号衰减	将 HRP 偶联物稀释至少 10 倍
	抗原/抗体浓度过低	增加抗原或抗体浓度
	蛋白质转移效率低	优化转移条件
	叠氮化物抑制 HRP	在印迹溶液中避免使用叠氮化物
	斑点状背景	HRP 偶联物形成聚集
非特异性条带	HRP 过量	将 HRP 偶联物稀释至少 10 倍
	SDS 导致非特异性结合	免疫检测过程中避免使用 SDS
胶片反转像	HRP 标记二抗浓度过高	降低 HRP 标记二抗浓度