



ECL 化学发光液说明书（PG 级）

货号	规格	温度保存
C1006-100	50ML*2 瓶	4℃
C1006-500ml	250ML*2 瓶	4℃

一. 产品描述：

ECL Plus 超敏发光液用于检测直接或间接标记辣根过氧化物酶 HRP 的抗体及其关联的抗原。可通 HRP 实现低皮克级的免疫印迹检测，其灵敏度，发光时间和背景均明显优于 T 公司。

- (1) 可使用更高的抗体稀释倍数 (1:2000~1:10000)，极其节省抗体。
- (2) 简单易用— 可替代其它公司的 ECL 发光底物，操作步骤无需进行特别优化
- (3) 灵敏度更高— 可检测低皮克级的蛋白
- (4) 信号持续时间更长— 光信号持续时间长达 5 小时
- (5) 更多成像方法— 适用于 X 射线胶片、CCD 或激光成像仪
- (6) 价格更经济— 相比其他品牌的类似产品，不仅具有高品质和高性能，同时价格也更低

二. 用途：用于 HRP 标记抗体的 Western Blot 和 HRP 标记探针的核酸杂交。

三. 使用方法：

1. 执行常规 SDS-PAGE、转膜和 Western Blot 步骤。注意用 HRP 标记 IgG 或用一抗-链亲和素-生物素-HRP 夹法。

操作概述

注：优化抗原和抗体的浓度。必须使用建议的抗体稀释度，以保证阳性结果。

- 1) 将一抗浓度稀释到 0.05~1ug/ml
- 2) 将二抗浓度稀释到 0.005~0.04ug/mL
- 3) 将两种底物组份按 1:1 比例混合，制备底物工作液。

注：暴露于日光或任何其他强光可能损害工作液，为获得最佳结果，将此工作液保存在琥珀色瓶中，并避免长期暴露于任何强光。短时间暴露于实验室常规照明不会损害该工作液。

- 4) 将印迹膜在 ECL 底物工作液中孵育 5 分钟。
- 5) 吸出多余试剂。用清洁的塑料膜盖住该印迹膜。
- 6) 使印迹膜在 X 光胶片上曝光。



2. Western Blot 最后一次洗膜的同时新鲜配制发光工作液：分别取等体积的溶液 A 和 B，放入干净容器中混合。建议立即使用工作液，室温放置数小时后仍可使用但灵敏度略有降低。

3. 用镊子取出膜，搭在滤纸上沥干洗液但勿使膜完全干燥。将膜完全浸入发光工作液（0.125mL 发光工作液/cm² 膜）中，与发光工作液充分接触。室温孵育 3 分钟，准备立即压片曝光。孵育时间过长不会增加灵敏度，有时还会导致曝光条带异常。发光过程的本质是酶促反应，使用过少的发光工作液不利反应进行，也会导致膜上条带曝光不均和明显降低灵敏度。为达节约目的可将膜剪小但勿降低发光液用量。

4. 用镊子夹起膜，搭在滤纸上沥干发光工作液。但勿洗去发光液。

5. 打开 X 光胶片暗盒，在暗盒内表面铺一张面积大于膜的保鲜膜。将 Western Blot 膜贴在保鲜膜上，将保鲜膜折起来完全包裹 Western Blot 膜，去除气泡和皱褶，可剪去边缘部多余的保鲜膜。用滤纸吸去多余的发光工作液。用胶带将覆盖 Western Blot 膜的保鲜膜固定在暗盒内，蛋白带面向上。

6. 暗房内压 X 光胶片，分别曝光不同的时间如数秒到数分钟。显影冲洗。

四. 储存：4 °C 密封避光保存一年以上。短期可放置室温。

五. 安全性：无特殊毒性，按普通化学品处理。

六. 注意事项：

（1）步骤 1~5 可在日光灯下操作；但发光液暴露于强光下时间过久灵敏度可能略有降低，移到暗房操作可避免之。戴手套可以避免在膜上留下手印。

（2）长时间曝光或蛋白过量，将加深背景并使条带强弱变化失去线性关系。曝光不足则条带模糊。

（3）发光工作液孵育约 3 分钟后膜上的条带发光。强条带发光在暗房中肉眼可见，低丰度蛋白条带发光较弱甚至肉眼不可见但可使 X 光胶片曝光。不能简单以肉眼观察判断条带发光时间。肉眼不可见的荧光实际上可持续数小时并使 X 光胶片感光，因而弱带可曝光 1-10 小时。如果曝光后条带不佳，可用洗膜缓冲液洗膜，重新孵育二抗，然后重新用 ECL 发光和曝光。

（4）由于超敏发光液极其灵敏，强烈推荐大多数进口抗体起始浓度为一抗 1:1000~1:4000，二抗 1:2000~1:5000。抗体浓度过高将造成高背景或没有条带，导致失败。

（5）某些保鲜膜包裹印迹膜时可能会淬灭荧光，应选择高质量保鲜膜。



(6) 使用肉眼可见的预染色蛋白 Marker 和荧光-放射自显影曝光标签可精确确定胶片上条带的位置和大小。

(7) NaN₃ 能抑制 HRP 活性，回收第二抗体应避免使用 NaN₃，如必需使用勿超过 0.01%。

附表

问题	可能原因	解决方法
胶片反相（白色条带，黑色背景）	系统中 HRP 过量	稀释 HRP 标记物至少 10 倍以上
膜上出现棕色或黄色条带		
暗室中看到强烈发光		
发光信号持续时间过短		
信号较弱或者无信号	发光反应系统中 HRP 过多，消耗底物过快，引起信号迅速降低	稀释 HRP 标记物至少 10 倍以上
	抗原/抗体量不够	增加抗原/抗体使用量
	蛋白转移率低	优化转移系统
高背景	系统中 HRP 过量	稀释 HRP 标记物至少 10 倍以上
	封闭不足	优化封闭程序
	封闭试剂选择不当	选择另一种封闭试剂
	冲洗不充分	增加冲洗时间，次数
	曝光过度	减少曝光时间
	抗原/抗体浓度过高	降低抗原/抗体使用浓度
蛋白条带为点状	蛋白转移失败	优化转移过程
	膜未平衡	按照说明书处理膜
	胶片与膜之间有气泡	曝光前去除所有气泡
出现非特异条带 （高背景、信号维持时间较短）	系统中 HRP 过多	稀释 HRP 标记物
出现非特异条带 （背景干净信号维持时间正常）	一抗用量过多	进一步稀释一抗
	SDS 导致非特异结合	在实验过程中避免使用 SDS