

## 超敏化学发光试剂盒

| Cat.#  | Product Name | Size  |
|--------|--------------|-------|
| RW0601 | Solution I   | 25 ml |
| RW0601 | Solution II  | 25 ml |

### 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 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 1:500-1:500. 抗 1:3000-1:1000)。

### 二、原理

辣根过氧化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SIS-PAGE 分离,并转移到固相膜上(如NC. PVDF)等,用于免疫学检测,经HP 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, 用平头镊钳住组住膜片,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 光片众中,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℃振落水浴 30 分钟。再用TBST 或 PEST 缓冲液洗脱,最后用脱脂牛奶封闭。

### 四、操作注意:

1. 加入抗后膜不能再干燥;

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 S,观察结果后判断最佳曝光时间可从1秒至 5 min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,它不像生色物质需从膜片上清除底物;

8. NaN<sub>3</sub> 能抑制 HRP 活性,应免传用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:

2~8℃时避光保存一年。