West Femto ECL 化学发光底物 说明书

保存： 室温运输，收到后在4度避光下储存试剂

重要提示： West Femto化学发光底物是一种高灵敏性底物，其灵敏度比其它化学发光产品（包括Thermo Scientifie，ECL）更高，为获得底物的最佳效果，抗体须比其他那些底物一起使用时浓度更低。如果你已经在使用上文所列的底物之一或另一种“入门级别”的化学发光底物，请将抗体再稀释至少五倍，例如：如果你使用ECL底物时将抗体按1:100稀释，那么使用West Femto底物时抗体应该按1:500稀释。下面列出了建议的稀释度范围。

一抗稀释度范围从1mg/ml储备液起1:1,000-1:5,000或0.2-0.1ug/ml

二抗稀释度范围从1mg/ml储备液起1:20,000-1:100,000或10-50ng/ml

产品简介

West Femto化学发光底物是一种用于检测免疫印迹膜上辣根过氧化物酶（HRP）的高灵敏的增强底物。该物底极强的信号输出能够使皮克量的抗原得到检测。信号的敏感度、强度和持续时间使利用照相或者其他成像方式检测成为可能。印迹膜可以反复在胶片上曝光以获得最佳效果，也可以先将膜上的免疫检测试剂进行剥离并重新检测。

产品重要信息

- 为获得最佳效果，必须优化该系统的全部组分，包括样品量、一抗和二抗浓度以及膜和封闭试剂的类型。由于该底物极其敏感，West Femto底物要求使用比大多数市售底物少得多的样品、一抗、二抗，通常低至少10-20倍。
- 使用该产品比使用沉淀比色HRP底物检测所需的抗体浓度低。为优化抗体浓度，请进行一次系统的点印迹分析。
- 没有一种封闭试剂对所有系统而言都是最佳的，所以为每一个免疫印迹检测系统找到最合适的封闭缓冲液非常必需。封闭试剂有可能与抗体产生交叉反应，导致出现非特异性信号。封闭缓冲液同时也会影响系统的灵敏性。当从一种底物转换为另一种底物时，有时会出现信号衰减或背景增加的现象，原因可能是封闭缓冲液不适合新的检测系统。
- 使用亲和素/生物素检测系统时，避免使用牛奶作为封闭试剂，因为牛奶中含有不定量的内源性生物素，会导致高背景信号。
- 保证洗涤缓冲液、封闭缓冲液、抗体溶液和底物工作液的使用体积，以确保在整个实验过程中印迹膜完全被液体覆盖，避免膜变干。增大封闭缓冲液及洗涤缓冲液的使用量可以降低非特异性的信号
- 为获得最佳效果，在孵育步骤请使用摇床。
- 将Tween20(终浓度0.05-0.1%)加入封闭缓冲液和稀释的抗体溶液，以降低非特异信号；用高品质的产品，如去污剂。它保存在安瓿中，过氧化物和其他杂质含量很低。
- 不要使用叠氮钠作为缓冲液的防腐剂。叠氮钠是HRP的抑制物
- 避免手与膜直接接触，实验过程应戴手套或使用干净的镊子
- 所有设备必须清洁且不沾染外来物质。金属器械（如剪刀）不得具有可见的锈迹。锈迹可能导致斑点形成和高背景。
- 底物工作液在室温下可稳定8小时。日光或任何其他强光下可能损害底物，为获得最佳结果，将底物工作液保存在琥珀色瓶中，并避免长期暴漏在任何强光下，短时间暴漏于实验室常规照明不会损害该工作液

操作概述

注：优化抗原和抗体的浓度。必须使用建议抗体稀释度，以保证阳性结果。建议的稀释度范围请参考其他所需材料。

1. 将一抗从1mg/ml储备液稀释到0.2～1.0ug/ml或1:1.000～1：5.000稀释度
2. 将二抗从1mg/ml储备液稀释到10～50ng/ml或1:20.000～1：100.000稀释度

北京富百科生物技术有限公司

3. 将两种底物组份按1:1比例混合，制备底物工作液。
   注：暴漏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，并避免长期暴漏于任何强光。短时间暴漏于实验室常规照明不会损害该工作液。
4. 将印迹膜在West Femto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。

其他所需材料

- 已完成转印的印迹膜：使用任何合适的电泳法分离蛋白质，并将这些蛋白质转移到硝酸纤维素膜上。也可使用其他类型的膜，但操作步骤可能需要进行优化。
- 稀释缓冲液：使用Tris或磷酸盐缓冲液。
- 洗涤缓冲液：将5mL 10%的Tween-20加入1.000mL稀释缓冲液（Tween-20的终浓度将为0.05%）。
- 封闭试剂：将0.5mL10%的Tween-20加入100mL的封闭缓冲液，选择一种与稀释缓冲液具有相同基本组分的封闭缓冲液。
- 一抗： 选择一种目标蛋白质特异性抗体。使用稀释缓冲液制备该抗体的1mg/ml储备液。使用封闭试剂将抗体从储备液稀释成抗体工作液。稀释度介于1:1.000和1:5.000之间或抗体工作液浓度为0.2-1ug/ml.最佳稀释度取决于一抗和膜上的抗原量。
- HRP标记的二抗：选择一种与二抗特异性结合的HRP标记二抗，使用稀释缓冲液制备该抗体的1mg/ml储备液。使用封闭试剂将抗体从储备液稀释成抗体工作液。稀释度介于1:20.000和1:100.000之间或抗体工作液浓度为10-50ug/ml。该浓度范围在使用链亲和素-HRP时也适用。二抗的最佳稀释度取决于HRP标记二抗和膜上的抗原量。
- 用于处理放射显影胶片的胶片暗盒、显影和定影试剂
- 用于孵育的旋转摇床。

蛋白印迹法详细操作步骤

1. 将印记膜从蛋白转印设备中取出，加入合适的封闭液在温室下孵育20-60分钟，同时振荡。以封闭膜上非特异性蛋白结合位点。请注意：使用在前文其他所需材料章节中建议的抗体稀释度是非常重要的。
2. 将膜从封闭液中取出，与一抗工作液在温室孵育1小时，同时振荡；或在28℃孵育过夜，不振荡。
3. 将足量的洗涤缓冲液加至膜上，保证缓冲液将膜完全覆盖。振荡孵育≥5分钟，更换洗涤缓冲液并重复该步骤4-6次。增加洗涤缓冲液体积，洗涤次数和洗涤时间有助于降低背景信号。
   注：孵育前，膜在洗涤缓冲液中的短暂淋洗会提高洗涤效率。
   请注意：使用在前文其他所需材料章节中建议的HRP标记二抗稀释度是非常重要的。
4. 将HRP标记的二抗工作液与膜在温室孵育1小时，同时振荡。
5. 重复步骤3，以除去未结合的HRP标记二抗。注：膜与HRP标记二抗孵育后必须进行彻底洗涤。
6. 6将A溶液与B液等比例混合，制备成工作液。每cm2膜使用0.01～0.1ml工作液。工作液可以在温室下稳定8小时。
   注：暴漏雨日光或任何其他强光下可能损害工作液，为获得嘴角结果，将此工作液保存在琥珀色瓶中，并避免长期暴漏雨任何强光。实验室的常见照明不会损害工作液。
7. 将印记膜在工作液中孵育5分钟。
8. 从工作液中取出印记膜，并置于一个塑料片或清洁的塑料纸（膜）中，用一张吸水纸吸除多余的液体，并从印记和塑料纸之间小心地压出气泡。

北京富百科生物技术有限公司

9. 将包在塑料纸（膜）中的印记膜置于胶片暗盒中，蛋白质面朝上，除适用于胶片曝光的灯（如红色安全灯）之外，关闭所有的灯。
   注;胶片必须在曝光期间保持干燥，为获得最佳效果，才去一下措施：确保将多余的底物从膜和塑料纸上完全去除；在整个胶片处理期间，使用手套；切莫将印记膜置于已显影的胶片上，因为胶片上的化学物质会减弱信号。
10. 将X光胶片置于膜的上面。建议第一次曝光60秒。之后可调整曝光时间以达到最佳结果。化学发光反应在底物孵育后的前5-30分钟期间是最强烈的。这一反应可以持续几个小时，但强度会随时间下降，如有底物孵育后较长时间后曝光，曝光时间可能需要延长以获得较强信号。如果使用磷光存储成像设备（如Bio-Rad的分子成像仪系统）或CCD照相机可能需要较长的曝光时间。警告：胶片与膜之间的任何移动可能在胶片上造成人为的非特异信号。
11. 使用合适的显影剂和定影剂对胶片进行显影。如果信号太强，则缩短曝光时间或将印记膜进行剥离并降低抗体浓度重新检测。

常见问题及解决方案

问题	可能问题	解决方案
1）胶片上有反转像（即黑色背景，白色带） 2）膜上有褐色或黄色带 3）印记在暗室中发光 4）信号持续时间少于 8 小时	系统中 HRP 过多	将 HRP 标记二抗稀释至少 10 倍
信号弱或无信号	系统中过多的 HRP 耗尽了底物并导致信号迅速衰减	将 HRP 标记二抗稀释至少 10 倍
	抗原或抗体的量不足	增加抗体或抗原的量
	蛋白质转移率低	优化转印
	HRP 或底物活性低	4*见下文注释
高背景	系统中 HRP 过多	将 HRP 标记二抗稀释至少 10 倍
	封闭不充分	优化封闭条件
	封闭式机不合适	尝试一种不同的封闭试剂
	洗涤不充分	增加洗涤时间、次数或洗涤缓冲液体积
	胶片过度曝光	缩短曝光时间或使用背景消除剂
	抗原或抗体的浓度太高	减少抗体或抗原的量
蛋白质条内有斑点	蛋白质转膜效率低	优化转印流程
	膜的水化不均匀	按照制造商建议适度的使膜水化
	胶片与膜之间存在气泡	在胶片曝光前，去除气泡
胶片上背景有斑点	HRP 标记二抗中存在聚集物	使用 0.2um 的过滤器
非特异性条带	系统中 HRP 过多	将 HRP 标记二抗稀释至少 10 倍。
	SDS 导致的蛋白非特异性结合	在检测过程中不使用 SDS

* 为检测系统活性，在暗室中，在一个清洁试管中制备 1-2ml 底物工作液。关闭灯，添加 1ul 未稀释的 HRP 标记二抗工作液。该溶液应当立即发出蓝色光，蓝光信号在随后的几分钟渐淡。

北京富百科生物技术有限公司 杜池敏博士