

产品名称&产品编码

产品名称: HyGlo HRP ECL Detection Kit
产品编码: KT059

包装清单

| | |
|---------------------|-------|
| Detection Reagent 1 | 100ml |
| Detection Reagent 2 | 100ml |

产品介绍

本系统用化学发光方法检测 HRP 标记蛋白质。高灵敏度, 非放射性。本系统灵敏度可达到飞克级, 可用于摄像技术或其他成像技术检测 HRP。HRP 水解底物溶液中产生很强的光信号, 使和它接触的 X-光片感光, 进而确定蛋白质的表达情况和分布。

注意事项

- 首次使用, 可先做一个 dot blot 来摸索抗原或者抗体的最佳使用浓度。
- 与 HRP 底物沉淀比色相较, 本系统一般要求将抗体做更大倍数的稀释。
- 封闭缓冲液对于本系统也会有影响。当使用 avidin/biotin 系统时, 不能使用奶粉作为封闭缓冲液, 否则会产生较高的背景。
- 使用足量的清洗液, 封闭液, 抗体稀释液和显色液, 使膜在整个过程中保持湿润。使用大量的封闭液和清洗液, 使非特异性信号降到最低。
- 为达到更佳效果, 孵育时请使用脱色摇床。
- 在封闭液和抗体稀释液中加入 Tween-20(终浓度 0.05-0.1%), 以使非特异性信号降到最低。请使用低过氧化物, 高纯度, 高品质的试剂产品。
- 不能使用叠氮钠作为防腐剂。否则会抑制 HRP, 并且干扰本系统。
- 不要用手直接接触膜, 请佩戴手套, 或使用干净的手术钳。

- 所有的设备应保持洁净, 无外源污染。金属制品不能有明显锈迹, 否则可能会留下斑点或产生高背景。
- 阳光或强光都会对底物有影响, 要得到好的实验结果, 需将底物工作液保存在棕色瓶中, 避免长时间暴露在强光下。短时间暴露在实验室环境下, 对底物不会有影响。

操作概述

注意: 抗原和抗体的使用量需要摸索优化。

1. 将一抗(1mg/mL)稀释到1: 1000-50000倍。
2. 将二抗(1mg/mL)稀释到1:50,000 -200,000 倍。
3. 按照1:1的比例将Detection Reagent 1 和 2 混合, 加到blot上面。室温孵育1-2分钟。
推荐使用剂量: 0.1ml工作液/cm²膜
4. 将多余的液体去除。将blot用干净的塑料膜或保鲜膜盖好。
5. 将blot用X-光片曝光。

用户需自行准备的材料

- 稀释液: Tris Buffered Saline (TBS) 或 Phosphate Buffered Saline (PBS)。
- 清洗液: 将5-10mL 10% Tween-20 加入到1000mL 稀释液中, 使Tween-20的终浓度为0.05-0.1%。
- 封闭液: 将0.5-1mL 10% Tween-20 加入到100mL 封闭缓冲液里面, 如PBS Blocking Buffer或TBS Blocking Buffer。请选择与稀释液基本成分相同的封闭液。
- 一抗: 选择针对目的蛋白的一抗。用稀释液或清洗液制备一抗储备液。用封闭液或清洗液将一抗储备液稀释到10.0-0.2 μ g/mL工作液浓度, 或将1mg/mL储备液, 做1:100-1:5000 稀释。最佳的稀释液依WB系统, 包括目的蛋白, 一抗类型, 二抗以及膜类型来确定。

- HRP 标记二抗: 选择针对一抗的 HRP 标记二抗。用稀释液或清洗液制备二抗储备液。用封闭液或清洗液将二抗储备液稀释到 1.0-0.067 μ g/mL 工作液浓度, 或将 1mg/mL 储备液, 做 1:1000-1:15,000 稀释。最佳的稀释液依 WB 系统, 包括目的蛋白, 一抗类型, 二抗以及膜类型来确定。
- 暗盒, 定影液, 显影液。
- 脱色摇床。

WB 操作详述

1. 将膜放入合适的容器, 加入封闭液, 使封闭液充分覆盖膜, 盖上盖子, 放到摇床上, 室温封闭 60 分钟。如有必要, 可 2-8 $^{\circ}$ C 过夜封闭, 不需要震荡。
2. 倒出封闭液, 加入稀释好的一抗, 室温摇床上孵育 1 小时, 或者 2-8 $^{\circ}$ C 过夜封闭, 不需要震荡。
3. 用清洗液清洗膜两次。
4. 用清洗液将膜悬浮, 摇床上清洗 5 分钟以上。更换清洗液至少 4-6 次。加大清洗液体积, 增加清洗次数以及加长清洗时间, 都有助于将背景值降低。
5. 加入稀释好的 HRP 标记的二抗工作液, 室温振荡 60 分钟。
6. 重复步骤 3 和 4 以去除未结合的二抗。
注意: 二抗孵育后, 膜需彻底清洗。
7. 按每平方厘米膜面积用 0.125ml 配置发光液: 根据发光液的需要量, 取等体积 Detection Reagent 1 和 Detection Reagent 2, 混匀备用。
注意: 工作液配完需尽快使用, 工作液室温 1 小时稳定。
8. 在 blot 中央加适量的发光液。室温孵育 1 分钟。
9. 将 blot 从工作液中取出, 放在一张干净的塑料膜或保鲜膜上面。用吸水纸将多余的液体吸走, 除去保鲜膜与 blot 之间的气泡。

10. 在暗房中, 将膜的正面对 X-光片, 放入暗盒。将所有光源关闭, 只打开用于 X-光片的灯, 如红色暗室安全灯。

注意: 光片在曝光过程中需保持干燥。为得到理想结果, 可采取如下措施:

- 确保多余的底物已经被全部去除。
 - 在接触光片时佩戴手套。
 - 不要用已显影过的光片, 否则光片上的化学药品将减弱信号。
11. 小心将 X-光片放在膜上面。第一次曝光时间定 1 分钟。调整曝光时间以达到最佳效果。最开始的 5-30 分钟, 发光最强。发光会持续几个小时, 但会随时间慢慢减弱。随着时间的流逝, 长的曝光时间是有必要的。
 12. 洗片需要合适的显影液和定影液。如果信号太强, 可以缩短曝光时间, 或者降低抗体浓度。