

用户指南

IMMOBILON® ECL ultra western 超敏HRP底物

目录号WBULS0100和WBULS0500

产品简介

作为一种超灵敏试剂, Immobilon® ECL Ultra Western HRP底物具有较长的信号持续时间, 可用于检测western免疫印迹上的辣根过氧化物酶 (HRP) 标记抗体。该试剂能够产生高强度信号, 使用X射线胶片或数字成像系统可在中等至低飞克级范围内实现灵敏的检测。Immobilon® ECL Ultra底物可兼容PVDF和硝酸纤维素印迹膜, 以及常用的缓冲液和封闭液。

Immobilon® ECL Ultra Western HRP底物仅供研究使用, 不用于诊断操作。

包装内容物

目录号	溶液体积	膜面积
WBULS0100	50 mL溶液A	至少1000 cm ²
	50 mL溶液B	
WBULS0500	250 mL溶液A	至少5000 cm ²
	250 mL溶液B	

保存条件/保质期

保存于2-8 °C。参见产品标签上标注的有效期限。

使用指南

- Immobilon® ECL Ultra底物是一种高度稳定的双组份化学发光底物。混合后的工作液应避光放置在2-8°C环境中, 可稳定保存长达1个月
- Immobilon® ECL Ultra底物极其灵敏。因此, 为获得最佳的信噪比, 应降低一抗和二抗的浓度
- 使用前, 应将Immobilon® ECL Ultra底物平衡至室温
- 使用封闭液稀释抗体, 可能会降低背景并提高灵敏度
- 为避免产生高背景, 应全程佩戴手套处理转印膜
- 使用平头镊子(目录号XX6200006P) 夹取转印膜, 避免膜撕裂或留下痕迹
- 切勿在任何封闭液或洗涤液中添加叠氮化钠, 叠氮化钠会抑制HRP活性
- 使用该产品前, 应阅读数据安全表(SDS), 参见www.millipore.com

化学发光检测操作步骤

每1 cm²的膜面积大约需要0.1 mL Immobilon® ECL Ultra底物。一些常用膜尺寸所需的底物体积如下所示:

印迹膜尺寸	Immobilon® ECL Ultra底物体积
7 × 8.4 cm	6 mL
10 × 10 cm	10 mL
8.5 × 13.5 cm	12 mL

1. 从冰箱中取出Immobilon® ECL Ultra底物, 在室温下平衡至少20分钟。
2. 将溶液A和B按1:1的比例轻轻混合, 制备工作液。避免剧烈搅拌。使用前, 应避光保存。未使用的工作液应避光冷藏, 可稳定保存长达1个月。
3. 将印迹膜放在干净的容器或干净的塑料保护板上(蛋白质一侧朝上), 并将Immobilon® ECL Ultra底物添加到印迹膜上。
4. 在室温下孵育印迹膜2-5分钟。
5. 吸干多余的底物, 将印迹膜转移到干净的塑料保护板上, 并用保鲜膜或等效物覆盖。
6. 使用CCD成像系统为印迹膜拍照, 或将印迹膜放到胶片暗盒中并在合适的X射线胶片下曝光一定时间。

效果

图1. 纯化GAPDH蛋白质的检测

将纯化的GAPDH蛋白(Sigma®目录号SRE0024)连续稀释并使用快速半干转印系统将蛋白转印到Immobilon®-P膜上。利用SNAP i.d.®2.0蛋白质检测系统, 使用0.5%脱脂奶粉封闭印迹膜并使用按1:100,000稀释的抗GAPDH一抗(目录号MAB374)和按1:10,000稀释的山羊抗小鼠二抗(目录号AP124P)探测印迹膜上的GAPDH蛋白。然后, 使用Immobilon® ECL Ultra底物孵育印迹膜5分钟, 并在数字成像仪下曝光30秒。

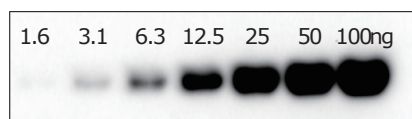
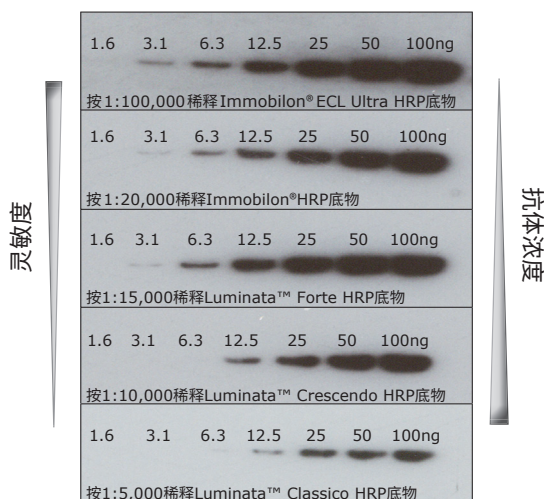


图2. 五种HRP检测试剂的灵敏度对比

将纯化GAPDH蛋白连续稀释(从100 ng到1.6 ng), 并通过SDS-PAGE电泳分离, 然后转印至Immobilon®-P膜上。分别使用不同浓度的抗GAPDH抗体(目录号MAB374), 然后使用五种不同检测试剂孵育。



废物处理

按照所有适用的国际、联邦、州和当地法规, 收集和处理使用过的材料。

可能的问题及改善建议

问题	可能原因	解决方案
高背景	HRP结合抗体的浓度太高	提高二抗稀释度
	封闭效率低	优化封闭条件
	洗涤不充分	增加洗涤液体积和/或增加洗涤次数
阴性染色(白色条带, 黑色背景)	高抗体浓度使底物耗尽	提高抗体稀释度和/或降低抗原浓度
背景上有很多斑点	抗体和/或蛋白质浓度过高	提高一抗和二抗稀释度
	HRP结合物形成聚集物	减少凝胶上的蛋白质上样量 使用0.2 μm Millex®针头式过滤器过滤结合物
非特异性条带	一抗浓度过高	提高一抗稀释度
印迹膜的初始信号非常高, 但信号迅速消失	HRP-抗体结合物浓度高, 使底物过早耗尽	大幅提高抗体稀释度和/或降低抗原浓度
信号弱或无信号	抗体浓度过低	延长曝光时间 降低抗体稀释度和/或提高抗原浓度
	蛋白质未转印到膜上	检查蛋白质转印
	抗体未与目标蛋白质结合	检查是否使用了目标蛋白质的特异性抗体
	底物已失效	使用新批次的底物

注意

内容如有变更, 恕不另行通知, 且不得视为MERCK Millipore Corporation("Millipore")或其子公司的承诺。MERCK Millipore Corporation及其子公司对于本文件中可能出现的任何错误不承担任何责任。

M商标、Millipore、Immobilon和SNAP i.d.均为德国达姆施塔特默克集团的注册商标。第三方的所有商标均为其各自所有者的财产。

©2016 MERCK Millipore Corporation, 保留所有权利。
WBULS0X00, Ver. 1.0, 03/18

安全数据表

安全数据表(SDS) 详见公司网站: 访问www.millipore.com, 并在搜索栏内输入目录号即可获取。

产品订购信息

名称	数量/包装	目录号
Immobilon® ECL Ultra Western HRP底物		
50 mL溶液A + 50 mL溶液B	100ml	WBULS0100
250 mL溶液A + 250 mL溶液B	500ml	WBULS0500
转印膜		
Immobilization®-E PVDF, 0.45 μm, 26.5 x 187 cm卷膜	1	IEVH00005
Immobilon®-P PVDF, 0.45 μm, 26.5 x 375 cm卷膜	1	IPVH00010
Immobilon®-P PVDF, 0.45 μm, 7 x 8.4 cm方形膜	50	IPVH07850
Immobilon®-P PVDF, 0.45 μm, 8.5 x 13.5 cm方形膜	10	IPVH08130
Immobilon®-PSQ PVDF, 0.2 μm, 26.5 x 375 cm卷膜	1	ISEQ00010
Immobilon®-PSQ PVDF, 0.2 μm, 7 x 8.4 cm方形膜	50	ISEQ07850
配件		
滤膜专用镊子, 平头	3	XX6200006P
抗体		
一抗和二抗	参见 www.millipore.com/antibodies	

技术支持

如需了解更多信息, 请联系就近办事处。中国地区用户, 请致电 **400-889-1988-2** 分机。其他地区用户, 可访问网站 www.millipore.com/offices 获取最新全球联系方式。您也可以发邮件至 asiatechserv@merckgroup.com 咨询。

质保

本出版物中所列产品的适用保修情况, 请见 www.millipore.com/terms (“销售条款”)。