

Ready-to-use UltraFemto™ ECL 2-in-1 Western Blotting Substrate

单组分 ECL 零污染 可检测低飞克级蛋白、光信号持久呈现、显影即刻可见

产品货号：P30307

产品规格：5 mL, 50 mL

储运条件：4 °C避光保存并以冰袋运输

产品简介：

Ready-to-use UltraFemto™ ECL 2-in-1 Western Blotting Substrate采用辣根过氧化物酶（HRP）催化化学反应，以检测蛋白质类生物大分子。UltraFemto™ ECL为单组分即用型试剂，打破了传统A/B液等体积混匀模式，使得配比更加精准、操作更便捷，还能减少因移液操作导致的试剂损失和潜在污染，保持实验结果的准确性和可重复性。

通过电泳实验，依据目标蛋白质特性，将其分离，随后转移到NC膜或PVDF膜上。利用抗原抗体间的特异性结合的原理检测蛋白质，使用目标蛋白质的特异性一抗孵育后，再结合HRP标记的二抗，形成具有级联放大效应的免疫反应体系。洗膜后取适量本产品室温孵育膜 15-30 s，利用化学发光成像系统或检测仪器显影。

注：效能等同Vazyme SuperFemto ECL Master Mix(E433)；

应用范围：基于 HRP 标记的核酸探针或抗体的免疫印迹实验

产品特点：

- **实验快速：**滴加孵育 15-30 s 即可成像，无需等待；
- **操作简便：**无需繁琐的 A/B 液配比混合，直接滴加，防止交叉污染；
- **适用性强：**适用于 X 光片曝光或 CCD 成像；
- **超高灵敏度：**能检测到低飞克级别的蛋白；
- **荧光持续性：**光信号最低可持续 5 h。

产品组分：

组分	规格	
A. Ready-to-use UltraFemto™ ECL 2-in-1 Western Blotting Substrate	5 mL	50 mL

注意事项：

- 本产品中含有氧化剂，使用后立即盖紧瓶盖，防止被还原失效。
- 本产品避免在强光直射，导致灵敏度降低。
- 叠氮化钠是HRP酶的抑制剂，会影响反应体系中酶的活性，抗体或探针回收时缓冲液中的防腐剂应避免使用叠氮化钠。
- 根据目的蛋白丰度不同，曝光时间可能是数秒至数小时。曝光时间短导致条带不清晰，曝光时间长导致背景黑。
- 保持膜的整洁避免膜污染，勿用生锈金属镊子或手直接接触膜，可用塑料镊子夹膜。
- 本产品只适用于HRP标记的核酸探针或抗体的免疫印迹实验。
- 利用预染Marker肉眼可见的彩色条带，结合荧光-放射自显影曝光标签，能精准确定胶片上条带的位置与大小。
- 选择保鲜膜包裹印迹膜时，请使用高质量保鲜膜，避免淬灭荧光或造成污染。
- 本产品仅限于科研用途并且不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请遵循您所在常规实验室安全规定。



使用说明：（仅供参考）

一、操作流程：

1. **洗涤二抗**：在 SDS-PAGE 电泳和转膜完成后，一抗室温孵育 1 h 或 4 °C 过夜孵育后，利用 TBST 洗膜，选择合适的二抗室温孵育 30 min-60 min，利用 TBST 洗膜。

注：清洗液可选择 PBST、PBS 或 TBS。

注：推荐抗体稀释比例为一抗 1:1,000 - 1:4,000，二抗 1:5,000 - 1:10,000，抗体稀释可按照抗体说明书进行。

2. **ECL 化学发光液与膜孵育**：有两种操作方法可供选择。

● **泡染法**：用平头塑料镊子取出膜后，沥干洗液，将膜浸泡到 ECL 发光液中，保持膜与发光液充分接触。室温孵育 2 min。

● **点染法**：用平头塑料镊子取出膜后，沥干洗液，将膜放到干净的器皿中，吸取 ECL 发光液确保发光液完全覆盖（50 μ L ECL 发光液/cm²膜），室温孵育 15-30 s。

注：沥干洗液时，不是完全干透，要保持膜的湿润。

3. **成像系统显影**：用平头塑料镊子取出膜后，沥干 ECL 发光液，同样保持膜湿润，确保有蛋白的一面的膜朝上放到成像系统中的检测板上，按照仪器说明书进行显影操作。

4. **压片检测**：用平头镊子夹起膜，沥干多余的 ECL 工作液，但同样要保持湿润，确保蛋白的一面的膜朝上平稳地放置于保鲜膜上，用吸水纸吸去多余的 ECL 工作液，将膜小心的包在两层保鲜膜中间，用片夹固定。将固定好的膜在暗室环境中压片 1 min，随后立即显影，定影初步结果，根据初步结果进行适当调整后续压片时间。

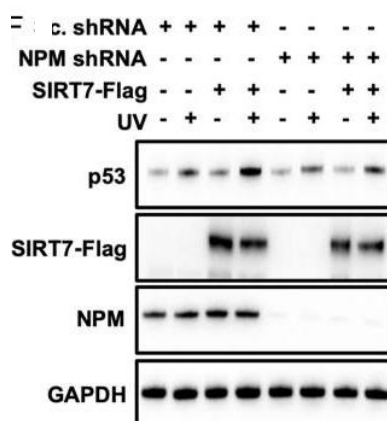
注：吸水纸吸去多余的 ECL 工作液时，吸水纸不能接触到膜。根据蛋白不同，压片时间不同，根据初步定影结果压片时间可调整为 0.5、1、3、5 min。

注：具体成像显影仪器按照实验室的仪器说明书进行。

二、结果判读：

● 以下图为例进行结果判读

示例



- 为研究在紫外照射下 SIRT7 蛋白是否通过 NPM 蛋白对 P53 蛋白有调控作用？
- 研究者首先对细胞进行系列处理，涵盖紫外照射、NPM 基因干扰、SIRT7 基因过表达及干扰操作。
- 经蛋白提取后，以管家基因编码的 GAPDH 蛋白作为内参，进行蛋白上样量的标准化标定。
- 随后通过 Western Blot，检测 NPM、SIRT7 蛋白的表达水平，以确认其敲低或过表达效率是否符合实验设计预期。
- 在上述实验条件均达预期后，最终对 P53 蛋白的表达水平进行检测。
- 研究结果表明，NPM 是紫外照射后 SIRT7 介导 P53 蛋白稳定的必需分子。

注：在经过 ECL 显影后，对于敲低样本的条带是很弱或者是不存在，对于过表达样本的条带是要高于对照组。

注：一定要保证内参蛋白（细胞质内参蛋白如 GAPDH、 β -actin、 β -tubulin 等，细胞核内参蛋白如组蛋白 H3 等）是齐的，再进行后续检测。

注：示例图片摘自《SIRT7-dependent deacetylation of NPM promotes p53 stabilization following UV-induced genotoxic stress》（DOI:10.1073/pnas.2015339118）

常见疑问与解答：

● 问：出现白色条带黑色背景的反向图像、膜上有黄色或棕色条带、在暗室有强烈发光、发光持续时间很短？

答：原因可能是底物显色反应过度，需要 10 倍以上的倍数稀释 HRP 结合物。



● 问：没有信号或仅有微弱信号？

答：具体原因如下：

- 抗体浓度过低、效价下降、特异性差或孵育条件不当，都可能影响信号的产生，此情况优化抗体浓度，通过预实验确定最佳稀释度；检查抗体的保存条件和有效期，使用新鲜的抗体；确保孵育过程中温度、时间和缓冲液等条件合适，一般 4℃ 过夜或室温孵育 1-2 h。
- 目标蛋白表达量低或上样量不足，需要增加上样量，但要注意不要超过凝胶的最大上样量；在提蛋白时可以少加一点裂解液，提高目标蛋白的浓度。
- 转膜效率低，蛋白没有有效转移到膜上；转膜过程中膜与凝胶之间有气泡，阻碍蛋白转移；转膜时间或条件不合适，需要优化转膜条件，根据蛋白分子量大小选择合适的转膜时间和电流；转膜前排除膜与凝胶间的气泡；转膜后根据多色 Marker 的情况判断转膜效果，如有问题调整转膜参数。
- 成像设备灵敏度低、曝光时间过短或设备故障，导致信号检测不到或微弱；解决方向有以下几个可供参考，选择灵敏度高的成像设备；适当延长曝光时间，通过预实验确定最佳曝光时间；定期维护和校准成像设备，确保其正常运行。

● 问：曝光后结果显示高背景？

答：具体原因如下：

- 封闭不充分，膜上未结合蛋白的位点没有被封闭剂完全覆盖，导致抗体非特异性结合，从而产生高背景。延长封闭时间，一般封闭 1-2 h，也可 4℃ 封闭过夜；更换封闭剂，如从 5% 脱脂奶粉换成 5% BSA，或反之；确保封闭剂的浓度和质量，按照说明书配制。
- 抗体浓度过高或孵育时间过长，过量的抗体容易与膜上的非特异性位点结合，增加背景信号。优化抗体浓度，通过预实验确定最佳稀释度；缩短抗体孵育时间，一般室温孵育 1-2 h 或 4℃ 过夜，可根据实际情况调整。
- 洗膜不充分，未结合的抗体没有被充分洗脱，残留的抗体导致背景升高。加洗膜次数，一般洗膜 3-5 次，每次 5-10 分钟；提高洗膜液的严谨性，如适当增加洗膜液中 Tween-20 的浓度，但要注意过高浓度可能影响蛋白与膜的结合。
- 膜被污染，实验过程中膜接触到了杂质、灰尘或其他蛋白，导致非特异性反应。实验操作在洁净的环境中进行，使用干净的镊子和容器处理膜；避免膜与皮肤直接接触，防止汗液中的蛋白污染膜。
- 底物显色过度，底物反应时间过长，使得非特异性信号也被放大。严格控制底物显色时间，在出现清晰条带且背景较低时及时终止反应；可以先进行预实验，确定合适的显色时间范围。

● 问：曝光后蛋白条带显示为点状或有很多斑点是什么原因，如何优化解决？

答：具体原因如下：

- 样品问题，样品中蛋白存在聚集现象，可能是由于蛋白浓度过高、保存不当或含有杂质等原因，使得蛋白在电泳过程中不能均匀分离，从而出现点状条带。对样品进行适当稀释，降低蛋白浓度；确保样品在低温下保存，并避免反复冻融；可对样品进行离心或过滤处理，去除杂质。
- 凝胶问题，凝胶制备不均匀，如胶浓度不一致、聚合不完全或有气泡，会导致蛋白在凝胶中迁移不规律，形成点状条带。重新制备凝胶，确保试剂准确称量和充分混合；在灌胶过程中避免产生气泡，如有气泡需及时排除；保证凝胶聚合时间充足，可通过观察凝胶边缘是否清晰来判断聚合情况。
- 转膜问题，转膜时膜与凝胶之间接触不紧密，存在局部空隙，使蛋白不能均匀转移到膜上，出现点状分布。转膜前将膜和凝胶充分浸泡在转膜缓冲液中，排除气泡；在转膜装置中正确放置膜和凝胶，确保二者紧密贴合；可适当增加转膜压力或延长转膜时间，但要注意避免过度转膜导致蛋白丢失。
- 抗体问题，抗体质量不佳或存在聚集，与抗原结合不均匀，导致条带呈点状。更换质量可靠的抗体；对抗体进行离心处理，去除可能存在的聚集物；优化抗体孵育条件，如适当降低孵育温度、延长孵育时间，以提高抗体与抗原的结合效率。

