

Product manual

WESTAR



ECL-SUN



Enhanced chemiluminescent
substrates for Western Blot

CYANAGEN



Reagents for Genomics and Proteomics

Product manual

产品手册

WESTAR

ECL-SUN

Enhanced chemiluminescent
substrates for Western Blot

增强化学发光
免疫印迹底物

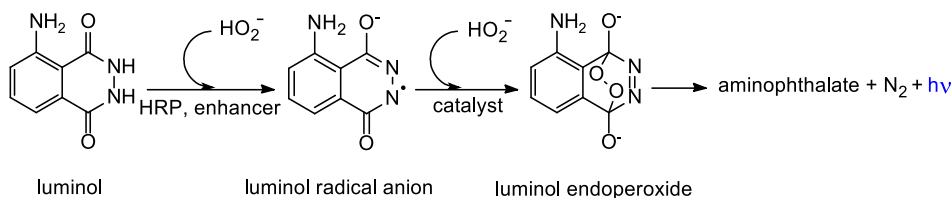
www.cyanagen.com

目录

1.	简介	5
	保存方式/有效期限	
	选型指南	
2.	组件和其它所需材料	6
	试剂盒组成	
	其它所需的溶液	
	兼容的成像设备	
3.	执行 SDS-PAGE	7
4.	准备转移膜	7
5.	转移膜	8
	转移过程中恒定的电压或电流?	
6.	染色膜（可选的）	9
7.	阻断膜	9
8.	抗体孵育	10
	抗体稀释建议	
9.	化学发光检测	11
	放射自显影胶片和成像设备	
10.	故障排除	12
	高膜背景	
	不规则的黑点	
	无条带或条带带弱	
	非特异性条带	
	白色条纹或“鬼带”	
	不均匀或锯齿状条带	
11.	订购讯息	15

1. 简介

鲁米诺的过氧化物酶催化的氧化反应产生 425 纳米的微弱闪光。电子转移介质到缓冲的掺入强制闪光信号转变为辉光, 大大提高了在增加的信号强度和持续时间^{1,2} 方面的反应的分析特性。最近的工作³⁻⁶ 表明, 通过加入合适的酰化催化剂, 进一步大量增加光输出观察。



WESTAR 检测试剂都是非同位素, 基于 luminol 鲁米诺化学发光底物, 设计用于化学发光检测固定化的蛋白质和偶联辣根过氧化物酶 (HRP) 固定化的核酸, WESTAR 仅用于研究用途, 并不能使用在任何临床程序, 或用于诊断目的。

参考文献:

1. Kricka, L.J. (2000) *Methods Enzymol.* 305, 370-390.
2. Heindl, D. and Josel, H.P. (1997) *Non-radioactive Analysis of Biomolecules*, 258-261. Springer, Berlin.
3. Marzocchi, E., Grilli, S., Della Ciana, L., Prodi, L., Roda, A. and Mirasoli, M., (2008) *Anal. Biochem.*, 377, 189-194.
4. Vdovenko, M. M., Della Ciana, L., Sakharov, I. Yu., (2009) *Anal. Biochemistry*, 392, 54-58.
5. Vdovenko, M. M., Della Ciana, L., Sakharov, I. Yu., (2010) *Biotechnology Journal*, 5(8),886-90.
6. Vdovenko, M.M., Zubkov, A.V., Kuznetsova, G.I., Della Ciana, L., Kuzmina, N.S., Sakharov, I. Yu., (2010) *J Immunol Methods*, 362 (1-2), 127-130.

保存方式/有效期限

当在 4°C 收放存储。

选型指南

WESTAR	Supernova	EtaC Ultra	EtaC	Nova 2011	ECL-SUN
信号强度	极端	非常高	高	中	标准
信号持续	短	温和	好	长	特长
蛋白定量	非常低丰度	低丰度	中等丰度	高丰度	高丰度

2. 组件和其它所需材料

试剂盒组成

- 溶液 A : 鲁米诺 /增强剂 溶液 (琥珀色瓶)
- 溶液 B : 过氧化氢溶液 (白色瓶)

其它所需的溶液

Solution 溶液	Preparation 准备	
Running Buffer 电泳缓冲液	对于 1L 公升的 10 倍电泳缓冲液 (存储): <ul style="list-style-type: none">• 30.3 g TRIS (250mM)• 144.0 g Glycine (1.9M)• 10.0 g SDS (1% w/v)• 稀释至 1L 公升蒸馏水	对于 1L 的电泳缓冲液: <ul style="list-style-type: none">• 100ml 毫升的 10 倍电泳缓冲液• 稀释至 1L 公升蒸馏水
Transfer Buffer 转印缓冲液	对于 1L 的 10 倍转印缓冲液 (存储): <ul style="list-style-type: none">• 30.3 g TRIS (250mM)• 144.0 g Glycine (1.9M)• 稀释至 1L 公升蒸馏水	对于 1L 的转印缓冲液: <ul style="list-style-type: none">• 100mL of 10x Transfer Buffer• 200mL of methanol• 稀释至 1L 公升蒸馏水
TBS-T Buffer TBS-T 缓冲液	对于 1L 的 10 TBS 缓冲液 (存储): <ul style="list-style-type: none">• 24.23 g TRIS-HCl (20mM)• 80.06 g NaCl (136mM)• 稀释至 800 毫升使用蒸馏水• 添加 NaOH(氢氧化钠) 1M 至 pH 约为 7.6• 稀释至 1L 使用 蒸馏水	对于 1L 的 TBS-T 缓冲液: <ul style="list-style-type: none">• 100 ml of 10x TBS Buffer• 100 毫升的 10 倍 TBS 缓冲液• 边搅拌边加入 1 毫升吐温 20• 稀释至 1L 使用 蒸馏水
Blocking Buffer 阻断缓冲液	使用 5% 脱脂干燥奶粉: <ul style="list-style-type: none">• 5 g 脱脂干燥奶粉• 溶解在 100ml 1 倍的 TBS-T 缓冲液	用 5% 的 BSA: <ul style="list-style-type: none">• 5 g BSA (Cohn 组分 V)• 溶解在 100ml 1 倍的 TBS-T 缓冲液
Ponceau staining solution 丽春红染色液	为 100 mL 毫升的 10 倍丽春红染色液 (存储): <ul style="list-style-type: none">• 溶解 0.5 克的丽春红 S 于 1.0ml 冰醋酸• 稀释至 100ml 毫升, 用蒸馏水• 用铝箔包裹瓶子, 以保护溶液防止光	对于 1L 的丽春红染色液: <ul style="list-style-type: none">• 100ml 的 10 倍丽春红 S 染色溶液• 稀释至 100 毫升, 用蒸馏水

兼容性的成像设备:

- ImageQuant™LAS-4000/Mini (GE Healthcare)
- DIAS-II (SERVA)
- ChemiDocXRS and VersaDoc (BIO-RAD)
- ChemiImager (Alpha Innotech)
- Image Station 2000/4000MM (Kodak)
- FOTO/Analyst Luminary/FX Systems (Fotodyne)
- LAS-3000 (Fujifilm)
- UViChem and UViProchemi (UVItec Ltd.)
- G:BOX/GeneGnome (Syngene)
- Odyssey FC (LI-COR)

3. 执行 SDS-PAGE

1. 准备新鲜的电泳缓冲液。
2. 加载凝胶是要确保凝胶和垫片之间的密封。
3. 倒入电泳缓冲液进入凝胶的中间，并检查是否有泄漏。
4. 倒入其余的电泳缓冲液进入运行槽的底部。
5. 取出梳子和用移液管清理掉任何未聚合的丙烯酰胺。
6. 在一个车道加载正确的预染色的 MW 标准。
7. 加载其余的样品进入并和填补所有空白及样品缓冲液。
8. 在 90÷130 的恒定电压运行，直到染料前沿到达凝胶的底部。如果电流太高通常会看到笑脸和污迹（扩散条带）的效果。

4. 准备转移膜

如果使用硝酸纤维素膜缓慢的放入蒸馏水中，在一个 45°角的边缘, 如果入水的速度放入太快了，空气被截留和蛋白质不会转移到这些地区。一旦湿了，平衡膜在转移缓冲液 15 分钟。

如果使用 PVDF 膜用甲醇进行 30 秒将其激活. 用蒸馏水冲洗并平衡在转移缓冲液 15 分钟。

- 对于蛋白质 >15 kDa 使用膜孔径 0.45 mm 毫米.
- 对于蛋白质 <15 kDa 使用膜孔径 0.2 mm 毫米

备注：低分子量蛋白质 (<15kDa) 有时通过硝酸纤维素薄膜转移，因此在印迹上不可见的。PVDF膜具有比硝酸纤维素薄膜更高的蛋白质结合能力，建议用于最佳检测灵敏度。

5. 转移膜

1. 湿润滤纸 4 张在转移缓冲液。
2. 组装转移三明治在一个托盘大到足以容纳塑料转移盒, 填充转移缓冲液, 使得盒被覆盖。
3. 放置第一泡沫垫在转印盒的黑边, 然后将两个预先湿润的滤纸在它的顶部上面。
4. 放凝胶用转移缓冲液润湿其表面。
5. 将预先湿润的膜直接放在凝胶的顶部, 然后轻轻去除所有气泡. 一旦凝胶放置于膜时蛋白质将转移, 其重新定位可能产生模糊图象。
6. 放置另外两张预先湿润的滤纸在膜的上面, 并去除所有气泡。
7. 完成组装将最后一个泡沫垫和固定上半部分的转移盒。
8. 用缓冲液填充转移槽, 然后放置转移盒。
9. 放入一个冷冻冷却装置在转移槽内和用冰块环绕它在保丽龙盒里.
10. 执行转移用以下设置：
 - 湿转移：80 ÷ 100 V 30 ÷ 60 min 分钟。**
 - 半干转移：15 ÷ 25 V 20 ÷ 30 min 分钟。**
11. 当转移完成后, 除去膜和切割角标记它的方向。
12. 用蒸馏水清洗膜两次。

转移过程中恒定的电压或电流？

该缓冲组合物改变的盐是从凝胶中洗脱, 从而导致增加的电流和电阻下降。采用恒电流引线的转移, 以降低电压和电阻 ($I = V/R$)。因此, 采用恒定电压的转移过程中提供了最佳的驱动力。然而, 当电流达到 500mA 以上的恒定电压设置冷却该凝胶是用于防止在油箱焦耳加热是至关重要的。

6. 膜染色（可选）

1. 使用丽春红染色溶液染蛋白和膜面朝上,在室温 RT 5 分钟以检查转印效率。
2. 用蒸馏水冲洗膜直到蛋白质条带是不同的。
3. 如果需要扫描该膜。
4. 用大量的蒸馏水中浸渍 10 分钟,膜可完全脱色。
5. 重新激活 PVDF 膜用甲醇,然后在 TBS-T 缓冲液清洗。



注意:

- 背景染色有些染料往往较高,而丽春红染色液是一种非常干净的模式。
- 染色后重新激活 PVDF 膜。
- 该 LOD 的丽春红染色液是 250ng 的蛋白质。

7. 阻断膜

1. 放置膜和蛋白质朝上于新鲜托盘和您选择的阻断缓冲液。
2. 孵育该膜在阻断缓冲液进行 30~60 分钟,在一个摇杆/摇床轻轻搅拌。最长阻断时间在室温不应超过 2 个小时。阻断时间过长会导致抗原掩膜和蛋白质的损失。
3. 用 TBS-T 缓冲液冲洗该膜两次。

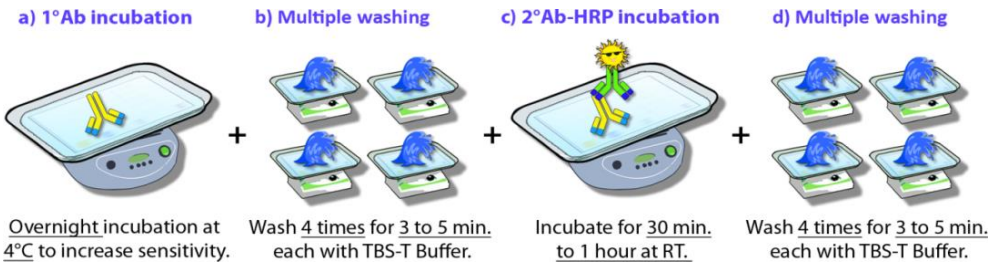


注意: 加入 3%脱脂干牛奶于 TBS-T 缓冲液稀释时抗体以减少非特异性结合。牛奶中含有许多的蛋白质其结合膜。所以,转印后,所含蛋白质在牛奶中结合膜和很多潜在的非特异性位点。在此之后,当孵育您的抗体,其结合抗原,并具有较少可能性的非特异性结合。 如果您使用抗磷酸化蛋白或生物素化抗体,添加牛奶是不合适的。

需用 5%BSA 代替。

8. 抗体孵育

1. 稀释的第一抗体在新鲜的 TBS 缓冲液，建议的第一抗体稀释液（参见下表）。
2. 孵育膜和蛋白质朝上于第一抗体稀释液在室温 1 到 2 小时。为了增加灵敏度，尝试孵育过夜，在 4°C 于一个摇杆搅拌下. 确保膜被完全覆盖于 TBS 缓冲液第一抗体。
3. 清洗膜和蛋白质朝上用 TBS-T 缓冲液与在振荡器上轻轻摇动 4 次每次 3 至 5 分钟。在每次清洗膜之后，放在一个干净的托盘和新鲜的 TBS-T 缓冲液。
4. 稀释第二抗体在新鲜的 TBS 缓冲液，建议的第二抗体稀释液（参见下表）。
5. 孵育膜和蛋白质朝上在室温进行 30 分钟至 1 小时。增加第二抗体的孵育时间通常会导致较高的背景。
6. 清洗膜和蛋白质朝上用 TBS-T 缓冲液与在振荡器上轻轻摇动 4 次每次 3 至 5 分钟。在每次清洗膜之后，放在一个干净的托盘和新鲜的 TBS-T 缓冲液。



重要：优化抗体稀释液可在不同应用之间有所不同，取决于质量和亲和力的靶蛋白。重要的是要优化第一和第二抗体稀释液为具有高信号和低背景最好的结果。最佳抗体稀释液可以用 Dot-Blot 点印迹法确定。

推荐抗体稀释液 WESTAR ECL-SUN

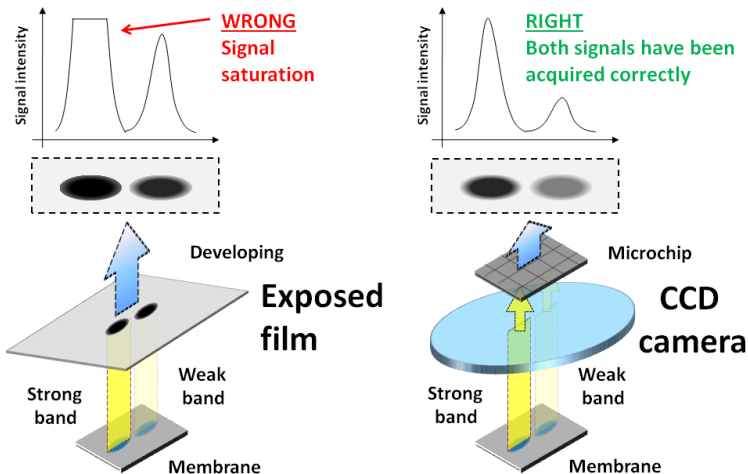
- 第一抗体 from 1:100 to 1:5,000
- 第二抗体 from 1:1,000 to 1:15,000

9. 化学发光检测

1. 为了重现性允许使检测稀释液在使用前平衡至室温。
2. 准备工作稀释液各试剂混合适当的比例 1: 1. westar ECL-Sun 工作稀释液的稳定至少要 5 天的时间并保存在 +4°C 的温度。不要污染稀释液和相同的移液吸管。
3. 从 TBS-T 缓冲液的托盘中取出膜，让多余的缓冲液，从一个角落里流出。不要让膜干燥。
4. 使用 0.1ml 的 **Westar WS** 于每 cm^2 平方厘米的膜。
5. 只要移液吸管吸取所需的量直接在朝上的膜和蛋白质和孵育 1 分钟，以确保整个表面覆盖
6. 取得与放射自显影胶片或成像设备的信号。对于一个未知的信号，试图暴露 15 秒，30 秒，1 分钟，5 分钟开始。

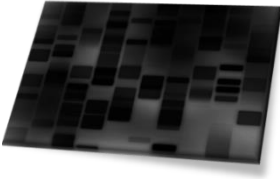
放射自显影胶片和成像设备

如今，Western Blot 印迹被用于无论是绝对定量（在与已知浓度的重组蛋白的校正曲线的组合），或相对于对照样品的样品的定量。通过新技术的发展，大部分成像器提供了一个宽的动态范围（数量级为 3÷5）产生一个高质量的图像与胶片的有限的线性动态范围（数量级为 1.5）进行比较。这意味着，有可能在相同的印迹与可靠的结果定量既强和弱的信号。相反，在胶片上的强信号得到饱和和导致错误的定量。



10.故障排除

高膜背景



高浓度的抗体.进一步稀释第一和第二抗体。按照建议的抗体稀释液。

低效的阻断.增加吐温Tween-20 的TBST缓冲液 (0.1% ÷ 0.5% v/v)。使用 5%的脱脂奶粉阻断缓冲液如果可能的。

洗涤不充分.同时增加了体积，长度和洗涤步骤的次数。一定要使用足够的量将膜浸没。

第一抗体是不特定感兴趣的蛋白质.使用单特异性或抗原亲和纯化抗体。第一抗体总是孵育在 4°C下过夜，而不是在室温下进行。减少NaCl盐的TBS-T缓冲液 (100mM ÷ 350mM)。使用单特异性抗原或亲和纯化抗体。

非特异性第二抗体的结合.确认第二次是具体通过省略第一和只运行第二印迹BLOT。如果条带发展选择其它第二抗体。

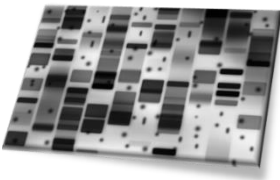
不相容的阻断剂.无脂干牛奶中含有的内源性生物素，并与抗生物素蛋白/链霉抗生物体系是不相容的。使用 5%BSA 替代。

抗体的质量差.质量与第一和第二抗体的年龄可能导致背景问题。

膜处理不佳.膜的处理一定只能用干净的塑料镊子和无粉手套。

被污染的缓冲溶液。检查缓冲液颗粒或细菌不纯物。更换旧的缓冲液。

不规则的黑点



气泡被困在膜上.轻轻滚动消除气泡用一个干净的移液管或试管在组装三明治时。

不均匀水合膜.确保膜在清洗和抗体孵育时完全的浸没。

被污染的设备.蛋白质或残留在单元上的凝胶块可能会粘到膜上。抗体被困在凝胶，然后被洗涤不佳，造成

强烈的局部信号。

凝聚阻断剂.当阻断剂是粉搅拌它过夜，在 4°C，以确保它完全溶解。

与样品盘膜相互作用.始终使用干净的塑料托盘，以避免任何类型的交叉反应。

形成聚集在酶标.通过 0.2µm 微米的过滤器过滤第二抗体溶液。使用新鲜的抗体。

无条带或条带弱



过多的信号产生. 在系统中的酶耗尽基底和引起信号迅速消失。进一步稀释二次抗体。

低效的转移. 确保膜和凝胶在组装三明治时良好的接触。高MW的蛋白质，可能需要更多的时间进行传输。降

低电压传输或时间给蛋白质低分子量（ $<10\text{kDa}$ ）。

抗体可具有失去活性. 执行Dot Blot点印迹。按照厂家推荐的储存，避免冻结/解冻循环。

不正确的第二抗体使用. 确认宿主物种/免疫球蛋白类型的第一抗体。

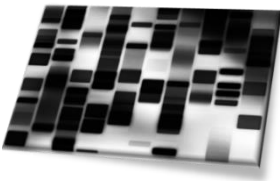
低蛋白 - 抗体结合. 减少洗涤到最小的数量。减少盐的TBS-T缓冲液（ $100\text{mM} \div 350\text{mM}$ ）。

无脂干奶可能掩盖某些抗原. 减少阻断时间。降低牛奶的百分比在阻断缓冲或替代用5%BSA阻断缓冲液。

叠氮化钠的污染. 确保缓冲液不包含叠氮化钠，因为这将淬灭HRP的信号。

污染的原液. 用相同的移液管尖污染化学发光底物储备溶液。使用新的试剂。

非特异性条带



聚析物. 增加还原剂的量，以确保完全还原的二硫键。

DS干扰. SDS的存在下，可能会导致引起抗体结合到与蛋白质有关的SDS分子非特异性条带的发展。转移后用清水彻底冲洗膜。

高蛋白质浓度. 一般似乎效果是蛋白质带的扩散。降低蛋白质的最初加入的量。

第一抗体是不特定感兴趣的蛋白质. 使用单特异性或抗原亲和纯化抗体。第一抗体总是孵育在 4°C 下过夜，而不是在室温下进行。减少NaCl盐的TBS-T缓冲液（ $100\text{mM} \div 350\text{mM}$ ）。使用单特异性抗原或亲和纯化抗体。

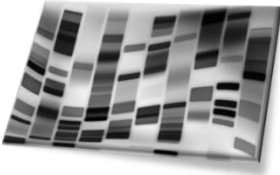
非特异性第二抗体的结合. 确认第二次是具体通过省略第一和只运行第二印迹BLOT。如果条带发展选择其它第二抗体。

白色条纹或“鬼带”



过多的信号产生.过多的抗体或蛋白质加载可能会导致高浓度的局部信号。在这一点上导致基底片的快速消耗.因此在完成此反应后就没有光的产生，白色条带就是其结果。先尝试以进一步稀释第二抗体。

不均匀或锯齿状条带



凝胶不均匀的运行.加载所有可用的水井。空孔可加载样品缓冲液。

电压或电流分别为电泳过程中过高。电泳期间降低电压或电流。

高盐影响样品.减少 NaCl 盐的浓度在 TBS-T 缓冲

(100mM÷350mM) .

11. 订购讯息

Product description 产品描述	Quantity 产品数量	Sufficient for 足够	Order-No 订单号
WESTAR ECL-SUN	50mL kit	500 cm ² of membrane	XLS063,0050
	250mL kit	2,500 cm ² of membrane	XLS063,0250
	500mL kit	5,000 cm ² of membrane	XLS063,0500
WESTAR Nova 2011	50mL kit	500 cm ² of membrane	XLS10,0050
	100mL kit	1,000 cm ² of membrane	XLS10,0100
	250mL kit	2,500 cm ² of membrane	XLS10,0250
	500mL kit	5,000 cm ² of membrane	XLS10,0500
WESTAR EtaC	50mL kit	500 cm ² of membrane	XLS100,0050
	100mL kit	1,000 cm ² of membrane	XLS100,0250
	500mL kit	5,000 cm ² of membrane	XLS100,0500
WESTAR EtaC Ultra	20mL kit	200 cm ² of membrane	XLS4,0020
	100mL kit	1,000 cm ² of membrane	XLS4,0100
	200mL kit	2,000 cm ² of membrane	XLS4,0200
WESTAR Supernova	20mL kit	200 cm ² of membrane	XLS3,0020
	100mL kit	1,000 cm ² of membrane	XLS3,0100
	200mL kit	2,000 cm ² of membrane	XLS3,0200
WESTAR Starter Kit	WESTAR ECL-SUN - 50mL kit		XLS025,0000
	WESTAR Nova 2011 - 50mL kit		
	WESTAR EtaC - 50mL kit		
	WESTAR EtaC Ultra - 20mL kit		
	WESTAR Supernova - 20mL kit		

欲了解更多信息 MSDS 或下载产品说明书,

请浏览: www.cyanagen.com

如需订购, 请致电: +39 051.534063

或邮寄至: sales@cyanagen.it

