

Robust-Lumi™ ECL HRP Substrate

中文简易使用手册

Robust-Lumi™ ECL 是一款应用于 Western blotting 检测的超灵敏、低背景的化学发光辣根过氧化物酶底物。样品制备，转膜及抗体孵育等信号检测前环节操作与常规 Western blotting 步骤一致。GeneCodex 公司提供 3 种剂型：常规剂型 Robust-Lumi™ ECL（A 液和 B 液）以及检测灵敏度更高的 Robust-Lumi™ ECL Advanced（增强型）和 Robust-Lumi™ ECL Platinum（超敏型）。

一、Robust-Lumi™ ECL 使用步骤：

1. 常规 Western blotting 蛋白样品制备定量、电泳、转膜。
2. 将蛋白样品转移至 PVDF 或 NC 膜上，室温封闭 1 小时。
3. 室温下，一抗孵育转印膜 1 小时，摇床轻摇使抗体孵育均匀。
4. 洗膜 3 次，每次 5 分钟。
5. 室温下，二抗孵育转印膜 1 小时，摇床轻摇使抗体孵育均匀。
6. 洗膜 3 次，每次 5 分钟。
7. 将 Robust-Lumi™ ECL 试剂盒中的 A 液和 B 液以（1：1）等体积混匀，将混匀后的 ECL 检测工作液充分浸润完成抗体孵育的蛋白转印膜（约 0.1 mL/cm²），反应 2 分钟，吸出反应液，用保鲜膜覆盖湿润的转印膜，暗室内曝光压片或者使用 CCD 成像。

二、Western blotting 发光检测中的常见问题：

Western blotting 发光检测中的常见问题及解决办法		
现象	原因	解决办法
信号弱或无信号	ECL 发光底物检测灵敏度偏低	更换灵敏度更高的 ECL 发光底物
	抗体-抗原结合亲和度偏低	提高抗体浓度/蛋白样品上样量
	转膜不充分/过剩	优化转膜条件
	HRP 或底物活性降低	检查、测试底物活性或选择更高灵敏度发光底物
高背景	HRP 偏高(背景较高)	一抗稀释 10 倍/二抗稀释 5 倍
	封闭时间不足	延长封闭时间，室温 4 °C 过夜为佳
	抗体与封闭液产生交叉反应	更换封闭液(如含 3 % BSA 的 TBST)
	TBST 洗脱不充分	增加洗脱时间、次数、洗脱液用量

仅供科学研究使用，不可应用于临床诊断治疗。

	曝光时间过长	缩短曝光时间
	抗原-抗体复合物浓度偏高	降低抗体浓度或蛋白样品上样量
条带内无显影的白点	转膜失误（如在胶-膜之间产生气泡）	精细操作
	膜平衡不均/油脂污染	按照说明书平衡转印膜/佩戴手套，以洁净平头镊子持膜
	膜与 X 光片间有气泡	显影前驱赶消除气泡
非特异性条带	抗体交叉反应	提高一抗/二抗稀释比
散在小圆斑	封闭液中有杂质颗粒	静置牛奶，使大颗粒沉淀，取上层溶液使用
反影(白色条带，黑色背景)	HRP 过高(背景较深)	提高一抗/二抗稀释比
显影后，印迹膜上条带处泛黄	HRP 过高(灵敏度过高)	提高一抗/二抗稀释比

三、Robust-Lumi™ ECL 使用注意事项：

1. Robust-Lumi™ ECL 发光底物，除 Robust-Lumi™ ECL Advanced（增强型，4 °C 储存）外，其他款式建议室温储存，Robust-Lumi™ ECL(常规型)及 Robust-Lumi™ ECL Platinum（超敏型）发光底物中含特殊稳定剂，更适合室温存储，长期 4 °C 存放，反而易降低该检测试剂的灵敏度。
2. Robust-Lumi™ ECL(常规型)发光底物的信号检测灵敏度已高于目前市面上其他一般国产超敏 ECL 发光底物，当待测蛋白样品表达丰度较高时，可能会出现高背景现象，此时建议在原有抗体稀释比参数基础上，将一抗稀释 10 倍，二抗稀释 5 倍，若仍出现高背景结果，则需继续提高抗体稀释倍数为宜。

四、印迹膜面积与发光底物工作液用量参考表：

印迹膜大小	所需发光底物工作液用量
7.0 × 8.5 cm	6 mL (3 mL A 液 + 3 mL B 液)
10 × 10 cm	10 mL (5 mL A 液 + 5 mL B 液)
8.5 × 13.5 cm	12 mL (6 mL A 液 + 6 mL B 液)

仅供科学研究使用，不可应用于临床诊断治疗。