

Amersham™ ECL™ Prime 蛋白印记试剂

自从1990年进入市场以来，增强化学发光（ECL）蛋白印记系统产品库不断丰富，以适应从常规蛋白检测到采用基于荧光Amersham ECL™ plex进行多道分析的各种应用。通过选择ECL检测系统，研究人员不仅可以避免对人有危害的放射性同位素操作，同时还拥有了另外的分析工具，正是由于这种分析具有一次性的特点，使得蛋白分析比以前变得更加快速，更加敏感，也更加地灵活。

Amersham ECL家族最近加入的成员是ECL prime，它至少具有ECL plus两倍的敏感性，其最低检测限（LOD）可达低皮克量级。该试剂的特点在于大幅增加了信号的稳定性，这使得反复曝光变成可能，并使其能在一个试验中轻松地进行多个印记处理。此外，ECL prime所发射的信号强度提高了3到5倍，这也就意味着ECL prime也采用比ECL plus低3倍的一抗和二抗进行检测，这不仅降低了背景，并使抗体试剂的费用得到降低。

ECL Prime保留并增强了Amersham ECL plus和Amersham ECL Advance™的优势，提供出一套敏感、稳定、在很宽蛋白动态水平范围内能精确定量并在节省昂贵的抗体试剂成本的检测系统：

- 信号强度高且灵敏，允许使用高度稀释的一抗和二抗而不降低灵敏度
- 信号稳定，可重复曝光，非常适合大量实验的开展，客户可以从容地安排实验和检测之间的时间



图1. Amersham ECL Prime：GE Healthcare的一种新的、高灵敏化学发光蛋白印记试剂。

- 最适合于ImageQuant™ LAS 4000（CCD成像）成像，也可与Amersham Hyperfilm匹配使用
- 可与Rainbow™分子量标准和Amersham ECL Dualvue™蛋白印记标准配合使用
- 最适合选用Amersham Hybond™-P（PVDF）膜，也可使用Amersham Hybond-ECL（硝酸纤维）膜





图2.ECL prime与偶联在二抗上的HRP之间的反应。HRP可催化ECL prime试剂向感光分子转化，感光分子被氧化产生受激产物，受激产物衰变时产生光信号。

化学发光蛋白检测

ECL prime可检测出蛋白印记实验中极微量的蛋白质。信号为发射光（化学发光，见图2），其信号强度与检测蛋白量成正比，可以给出单次印记在很宽蛋白水平范围的精确数据。

辣根过氧化物酶（HRP）可催化鲁米诺发生氧化，从而产生425 nm波长的化学发光。与其他化学发光试剂相比，ECL prime在实际中加入了增强剂，可以增加酶活力，从而大幅提高了信号强度和持续时间。通过加入催化剂可以进一步增强发光信号。

Amersham ECL Prime在蛋白免疫印迹中的应用

ECL Prime主要在蛋白免疫印迹流程的检测阶段发挥作用（图3），同时对上游的步骤也有一定的影响。比如，ECL Prime作为检测方法时可以采用高度稀释的一抗作为与免疫印迹膜杂交的探针。这不仅在经济上非常合适，也避免了背景信号下淹没的与目的蛋白之间的较弱特异结合。

ECL的高灵敏度要求其不仅能封闭非蛋白结合位点，并且能被清洗步骤彻底清除。

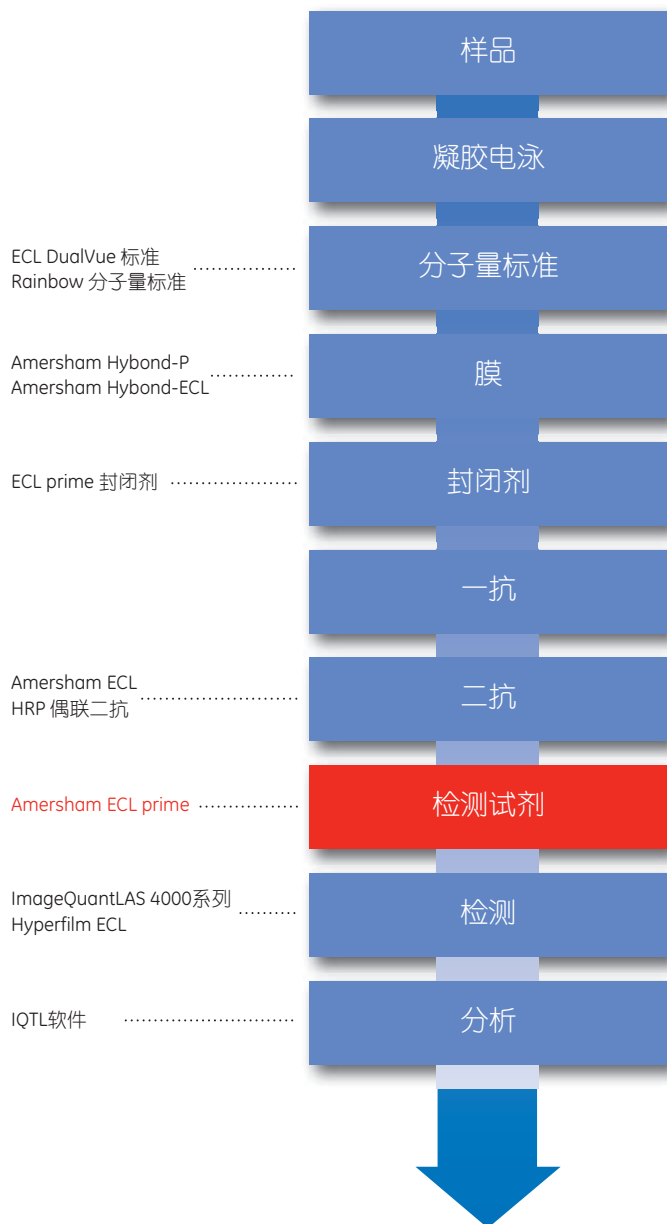


图3.蛋白印记流程中的ECL Prime。图中所列为最典型的蛋白印记实验。某些特定步骤附加的产品来自GE Healthcare产品库，提供整个蛋白印记流程的解决方案，所有产品都经过优化，可以配合使用。

Amersham ECL prime：性能特点

灵敏度和精确度

与ECL plus相比，ECL prime更加灵敏，且在很宽的蛋白水平范围内呈现线性信号响应。图4结果为加ECL prime 75秒后曝光以及加ECL Plus 3分钟后曝光。结果表明ECL prime在灵敏度方面增加了4倍（见图4的LOD），且线性动态范围有明显的改善，这使得同一印迹膜上无论高或低丰度的蛋白都能在单次曝光后被检测出来并精确定量。

- 样品：对2.5 ng转铁蛋白进行2倍梯度稀释
- 膜：Amersham Hybond-p
- 封闭：ECL prime封闭剂(ECL prime)和5%脱脂干奶粉(ECL plus)
- 一抗：兔抗转铁蛋白(1:3000)
- 二抗：HRP偶联的抗兔IgG(1:30000)
- 检测：Amersham ECL prime/ Amersham ECL plus
- 成像：ImageQuant LAS 4000 mini(其中Amersham ECL prime成像需要75秒， Amersham ECL plus成像需要3分钟)
- LOD：2.4 pg(ECL prime), 9.8 pg(ECL plus)
- 动态范围(DR)：3个数量级(ECL prime), 2.4个数量级(ECL plus)

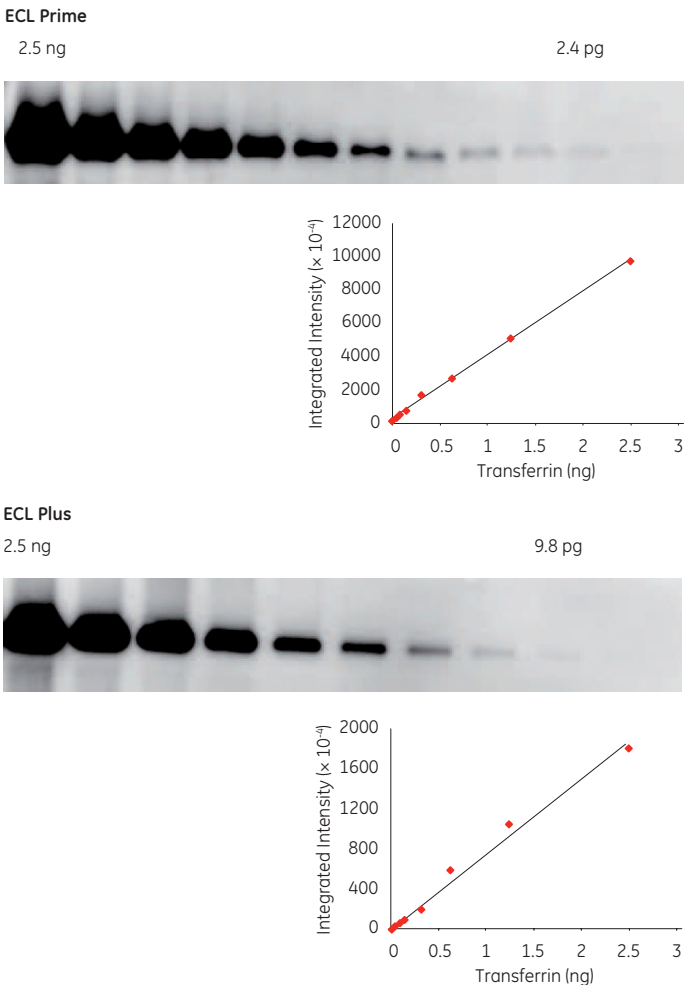


图4.分别用ECL prime（上栏）和ECL Plus（下栏）对2倍梯度稀释的转铁蛋白进行蛋白免疫印迹检测。样品印迹在Amersham Hybond-p（PVDF）膜上，并通过ImageQuant LAS 4000 mini系统进行成像。

信号稳定性

ECL prime产生的化学发光信号非常稳定，即使对于所检测的最小量的蛋白质，其信号依然能在加入试剂后三小时内维持足够强度，这使得重复曝光成为可能，并且能在每次实验和分析之间轻松地安排时间（图5和表1）。

经过ECL prime处理1小时后，大约还剩下60%的信号，而ECL plus处理则只剩下15%。

- 样品：对2.5 ng转铁蛋白进行2倍梯度稀释
- 膜：Amersham Hybond-p
- 封闭：5%牛血清白蛋白，溶解在PBS-T溶液中
- 一抗：兔抗转铁蛋白(1:3000)
- 二抗：HRP偶联的抗兔IgG(1:30000)
- 检测：Amersham ECL prime/ Amersham ECL plus
- 成像：ImageQuant LAS 4000 mini(所有时间点都进行3分钟成像)

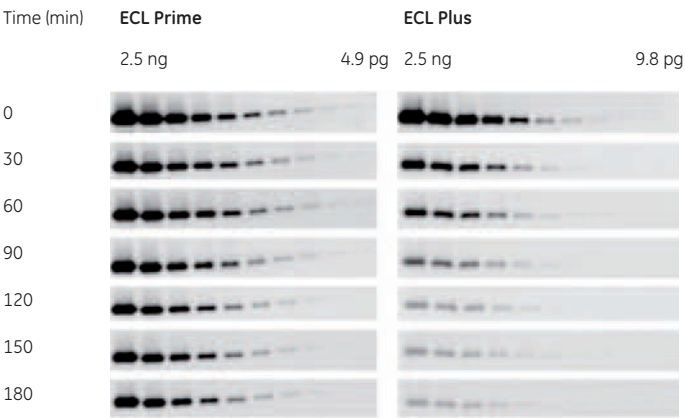


图5.加入ECL prime 3小时内各个时间点的信号强度进行并排比较。同时对ECL试剂处理相同时间的效果进行比较。

表1.试剂加入后3小时内各个时间点的残留信号强度。对每组中第4条带（0.312 ng转铁蛋白）进行分析，每个时间点曝光时间为3分钟。

时间点（min）	残留信号强度（%0时间点）	
	Amersham ECL Prime	Amersham ECL Plus
0	100	100
30	76	29
60	61	15
90	42	7
120	32	5
150	24	3
180	19	2

有效利用抗体

使用ECL prime可以检测到ECL plus检测不到的更低的蛋白量，即使一抗经过高度稀释，这种可能性仍然存在（图6）。ECL prime中采用1:10000（一抗）和1:50000（二抗）的抗体稀释与ECL plus采用1:3000和1:30000的抗体稀释所得到的信号强度和LOD类似。

样品： 对10 μg的NIH 3T3细胞裂解总蛋白进行2倍梯度稀释
膜： Amersham Hybond-P
封闭： 5%牛血清白蛋白，溶解在PBS-T溶液中
一抗： 兔抗β-catenin(1:3000到1:10000)
二抗： HRP偶联的抗兔IgG(1:30000到1:50000)
检测： Amersham ECL prime/ Amersham ECL plus
成像： ImageQuant LAS 4000 mini(一抗1:3000或1:5000稀释时需5分钟，一抗1:7000或1:10000稀释时需7分钟)

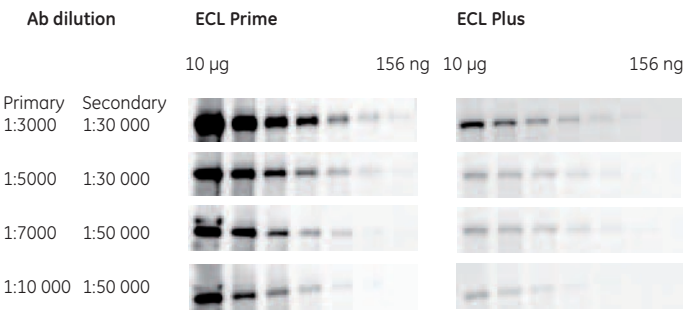


图6.对ECL prime和ECL plus在NIH 3T3全细胞裂解物来源的2倍梯度稀释样品，采用不同稀释倍数的兔抗β-catenin和HRP偶联的抗兔IgG进行免疫印迹检测时的效果进行比较。

产品兼容性

Amersham ECL Prime经过改良，配合GE Healthcare的蛋白印记套餐产品使用，可发挥出最佳的性能，例如Amersham Hybond-p膜。当然，Amersham ECL prime也能与其他蛋白免疫印迹试验中常用的试剂匹配使用。例如，使用硝酸纤维Amersham Hybond-ECL膜同样能获得不错的效果，此外对于ECL prime使用，不需要特殊推荐某种分子量标准或封闭试剂。

细胞裂解物中不同靶蛋白水平的相对定量

具有高度灵敏的ECL prime试剂配合具有极宽动态范围的CCD成像仪如ImageQuant LAS 4000 mini，在同一次印记中通过非调节管家蛋白进行标化，可以对目标蛋白进行可信度极高的相对定量（图7）。通过检测管家蛋白的表达水平，可以判断每一泳道是否加入了相似量的总细胞裂解物。

样品： 10 μg的NIH 3T3细胞裂解物(IIFNa处理/不处理细胞以一定比例混合)或Hela细胞裂解物(茴香霉素处理/不处理细胞以一定比例混合)总蛋白
膜： Amersham Hybond-p
封闭： 5%牛血清白蛋白，溶解在PBS-T溶液中
一抗： 兔抗β-catenin(1:3000)，小鼠抗pSTAT3(1:3000)或小鼠抗肌动蛋白(1:3000)
二抗： HRP偶联的抗兔IgG(1:30000)或HRP偶联的抗小鼠IgG(1:30000)
检测： Amersham ECL prime
成像： ImageQuant LAS 4000 mini(3分钟，β-catenin；1分钟，肌动蛋白)

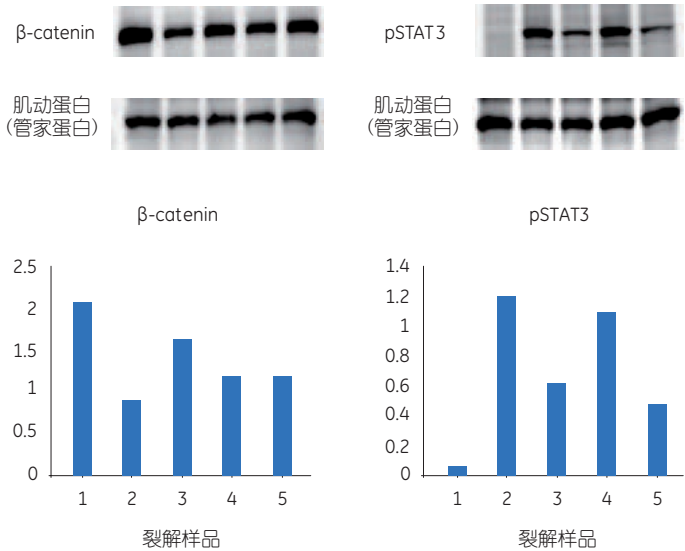


图7.免疫蛋白印记法检测（A）5种不同NIH 3T3细胞裂解物中β-catenin和（B）5种不同Hela细胞裂解物中Tyr705磷酸化STAT3（pSTAT3）的表达水平。每个实例都对同一次免疫印迹中目标蛋白以肌动蛋白水平进行标化和相对定量。值得注意的是，虽然β-catenin的水平在印记的视觉检测上非常相似，但通过ECL prime和ImageQuant LAS 4000 mini分析仍能找到之间明显的差异。

低丰度磷酸化蛋白的检测

STAT3是一种转录活化因子，参与黑色素瘤的发生发展和宿主免疫。通过对细胞添加某种细胞因子如IFNα进行处理可使蛋白上某个特异地酪氨酸残基发生磷酸化活化。

对起始量为12.5 μg IFNα处理的Hela细胞总蛋白进行两倍梯度稀释，经过聚丙烯酰胺凝胶分离并印记在Amersham Hybond-P膜上。通过特异的抗体和ECL prime对磷酸化的STAT3进行检测（图8）。

样品： 对12.5 μg的IFNα处理的Hela细胞裂解物总蛋白进行2倍梯度稀释
膜： Amersham Hybond-P
封闭： 5%牛血清白蛋白，溶解在PBS-T溶液中
一抗： 小鼠抗pSTAT3（Tyr705）（1:3000）
二抗： HRP偶联的抗小鼠IgG（1:30000）
检测： Amersham ECL prime/ Amersham ECL plus
成像： ImageQuant LAS 4000 mini（5分钟）

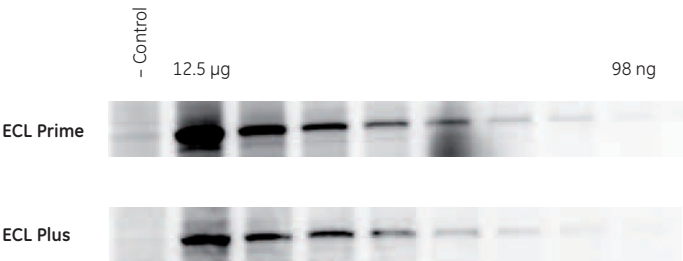


图8. 使用ECL prime和ECL plus对IFNα处理的Hela细胞中的pSTAT3进行免疫印迹检测。与ECL plus相比，ECL prime能产生更高强度的信号，这使得蛋白检测的质量即灵敏度得到改善。对照条带为6.25 μg非处理细胞总蛋白。

订购信息

Product	Code no.
Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagents for 1000 cm ² membrane ¹	RPN2232

¹ Includes Solution A (luminol solution, 50 ml) and Solution B (peroxide solution, 50 ml), sufficient for 1000 cm² membrane.

For a more comprehensive list of related products, please refer to www.gelifesciences.com/ecl.

Related products	Code no.
Amersham Hybond-P (20 × 20 cm), 10 sheets	RPN2020F
ECL Prime Blocking Agent, 20 g	RPN418
ECL Human IgG, HRP-Linked Whole Ab (from sheep), 1 ml	NA931-1ML
ECL Rabbit IgG, HRP-Linked Whole Ab (from donkey), 1 ml	NA934-1ML
Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers 250 μl	RPN800E
ECL DualVue Western Blotting Markers (25 loadings)	RPN810

Imaging systems	Code no.
ImageQuant LAS 4000	28-9558-10

Software and accessories	Code no.
ImageQuant TL 7.0 and IQTL SecurITy 8.0 Software packages (with Getting Started guide)	28-9380-94
ImageQuant TL 7.01 and ImageQuant TL SecurITy 8.0 (single user)	28-9332-73

通用电气（中国）医疗集团

网址: www.gelifesciences.com.cn

邮箱: lifesciences@ge.com

免费咨询热线: 800-810-9118

详情请与通用电气(中国)医疗集团各办事处联系:

香港

香港九龙旺角亚皆老街8号
朗豪坊办公大楼12楼
电话: (852)2100 6314
传真: (852)2100 6338

北京

北京经济技术开发区永昌北路1号
电话: (010)5806 8888
传真: (010)6787 3597
邮编: 100176

上海

上海市浦东新区张江高科技园区
华佗路1号
电话: (021)3877-7888
传真: (021)3877-7449
邮编: 201203

广州

广州市建设六马路33号
宜安广场1212室
电话: (020)8363 3828 转 67961
传真: (020)8363 3291
邮编: 510060

厦门

厦门市厦禾路189号
银行中心1815-1816室
电话: (0592)2681280
传真: (0592)2681283
邮编: 361003

昆明

昆明市三市街6号
柏联广场写字楼1005室
电话: (86871)3157017
传真: (86871)3157289
邮编: 650021

南宁

广西省南宁市桃园路67号
石油大厦1508室
电话: (0771)2521666 转 115
传真: (0771)2521555
邮编: 530022

沈阳

沈阳市和平区和平北大街69号
总统大厦C座907室
电话: (024)22812468
传真: (024)22812121
邮编: 110003

青岛

青岛市香港中路61号
阳光大厦2208室
电话: (0532)85729111
传真: (0532)85719153
邮编: 266071

南京

南京市汉中中路2号
金陵饭店世界贸易中心1258/1259室
电话: (025)84509386
传真: (025)84723600
邮编: 210005

济南

济南市乐源大街150号
中信广场618房间
电话: (0531)86116900 转 67555
传真: (0531)86907134
邮编: 250011

武汉

武汉市建设大道568号
新世界国贸大厦1座3115、3116室
电话: (027)6885 5731
传真: (027)8577 4677
邮编: 430022

杭州

浙江省杭州市曙光路122号
世界贸易中心世贸大厦906室
电话: (0571)87970862
传真: (0571)87970860
邮编: 310007

长沙

长沙市韶山北路139号
湖南文化大厦1905室
电话: (0731)412 9178-72427
传真: (0731)413 4257
邮编: 410011

成都

四川省成都市新华大道文武路42号
新时代广场12层A-C座
电话: (028)86782581
传真: (028)86782582
邮编: 610017

西安

西安市南大街30号
中大国际商务会馆606号
电话: (029)87203288
传真: (029)87203289
邮编: 710002

天津

天津市河西区马场道59号增1号
平安大厦B座16层A
电话: (022)5819 2830
传真: (022)8558 9060
邮编: 300302

重庆

重庆市渝中区青年路38号
国贸中心30楼3001室
电话: (023)6310 7006-72750
传真: (023)6374 9398
邮编: 400010

哈尔滨

哈尔滨市南岗区红军街15号
奥威斯发展大厦25层A座
电话: (0451)53009566 转 72300
邮编: 150001



imagination at work