

ELISA 包被套餐 3 ELISA Construction Pack X 使用说明书

Version 2.0

(cat: EL-CPX-5)

(cat: EL-CPX-10)

(cat: EL-CPX-15)

试剂清单:

产品编号	产品名称	EL-CPX-5	EL-CPX-10	EL-CPX-15
EL-CPX01	coating buffer 包被缓冲液	15ml (10X)	30ml (10X)	50 ml (10X)
EL-CPX02	Nunc 单条可拆酶标板 maxisorp	5 个/包	10 个/包	15 个/包
EL-CPX03	酶标板稳定剂	100ml (即用型)	200ml (即用型)	300ml (即用型)
EL-CPX08	标准品稀释液和血清样品稀释液	50ml	50ml	50ml
EL-CPX04	生物素 (Biotin) 稀释液	25ml	50ml	75ml
EL-CPX05	HRP 耦联物保护剂/稳定稀释液	50ml	100ml	150ml
EL-CPX06	显色液 A, B (Substrate A, B)	30ml (各 1 瓶)	60ml (各 1 瓶)	100 (各 1 瓶)
EL-CPX07	终止液 (Stop Solution)	50ml (即用型)	100ml (即用型)	150ml (即用型)

其他需要使用但试剂盒并未提供的材料:

1. 一抗, 生物素二抗, 标准品, HRP-Streptavidin 浓缩液;
2. 封板膜 (Plate sealer), 有粘性, 贴在板上, 用于板的密封, 防止异物跌落在板孔内; 货号: EL-CPX08;
3. ELISA 洗涤液, 货号 EL-00402, 用于洗板;
4. PBS 缓冲液 (phosphate buffered solution) 即磷酸盐缓冲液, 能够提供相对稳定的离子环境和 pH 缓冲能力, 是生物学中经常使用的缓冲盐溶液。pH 为 7.2-7.4, 主要成分为磷酸二氢钠、磷酸氢二钠以及氯化钠, 常用于分子克隆及免疫组化等实验。可稀释成 1×PBS, 可以替代样品稀释液等组分; 也可加 tween-20 成为自配的洗涤液;
5. EL-CPI05-20, 自封铝箔袋, 干燥剂;

注意事项及说明:

- 上述试剂均可 2-8℃ 保存, 保质期为一年; 其中终止液可以室温或低温保存;
- 试剂如储存时间较长, 请在正式实验前进行预实验验证试剂质量;
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴防护手套操作。

试剂盒使用说明和包被实验示例：

一、包被液的配制：

coating buffer 包被缓冲液（EL-CPX01）：该试剂为 10X 浓缩液，使用前请根据实验用量，用蒸馏水稀释至 1X，即配即用，例：10ml coating buffer + 90ml 蒸馏水；

Coating buffer 用于抗体的包被；可替代以 PBS 为主的包被液体；请用 1* coating buffer 和适量一抗配成包被液，抗体浓度请参考抗体的说明。

二、包被实验示例：

在 **ELISA 酶标板（EL-CPX02）** 中每孔加入 100ul 包被液（包被液若有剩余可多包被一点，以条为单位），在板上贴膜（封板，plate sealer，），室温（控制室温在 25℃，板放置处旁放置温度计控温）温育过夜（下午 4 点到第二天早上 9 点，不宜缩短时间，会降低包板效率）；结束温育（也请参考抗体说明书的包被条件进行相应调整）。多余的配好的包被液不能保存。

三、洗板封闭：

- 1) 将洗液 **20xWash Buffer（EL-00402）**（可以用 PBS + Tween 20 代替）配制成 1xWash Buffer（实验前请合理计算用量，配制足够的量待用），用 1xWash Buffer 洗板 4 次（注：包被组分在加稳定剂前不能剧烈震荡或完全干燥，所以洗板过程需快速、温和，不要拼命拍板）；
- 2) 洗板后立即加入 200ul 每孔的酶标板稳定剂（EL-CPX03），37℃温育 1 小时；
- 3) 弃掉或吸取酶标板稳定剂（注：**拍干，千万不要洗板**）。

封闭好的酶标板可以有以下几种处理方式。

方式一：直接进行检测。

方式二：冻干（需有冻干机，长期保存）

- 1) 冻干成品：把酶标板放入冰箱，-20℃冰箱冷冻过夜。
- 2) 调试真空冻干机，立即将冷冻过夜的酶标板放入真空冻干机冻干 24 小时；
- 3) 取出冻干的酶标板，立即将酶标板放入一个装有干燥剂的铝箔袋内（EL-CPI05-20），贴上标签，放 4℃冰箱长期保存。（冻干同时可进行标准品冻干，标准品冻干需要购买标准品冻干液）。（干燥剂和铝箔袋可以单独订购）

方式三：室温晾干（无需冻干机）

按照以下方法晾干长期保存：

- 1) 室温或者 37℃ ；
- 2) 湿度：最好在一个湿盒中(小于 15% 湿度)；
- 3) 时间：2-24 小时，晾干；确认干燥
- 4) 立即将经过酶标板稳定剂处理的产品封装在一个含有干燥剂（EL-CPI05-20）的密闭防潮容器中，正确使用干燥剂包装是长期保存的关键。干燥密封的酶标板可以放置半年以上。

注意：如果酶标板不直接进行检测，必须采用方式二或者方式三，进行干燥。干燥后的酶标板才可以稳定保存。

方式四：短期使用：

如果短期内使用，可以把酶标板放入冰箱，-20℃冰箱冷冻。在使用前一直冷冻在-20 度，可以短期保存（酶标板上包被的抗体效价降低很慢）（半个月使用可以采用本方法）。冷冻后的酶标板放入含干燥剂的酶标板自封袋中，短期保存（半个月使用）

四、检测方法示例

(请参考抗体说明, 安排相应的检测方法, 根据您的实验路线, 如果是双抗夹心法, 可以选择酶标二抗, 也可以选择生物素二抗, 采用生物素-亲和素的放大系统):

实验示例: 下面是双抗夹心法的实验示例:

- 1) 以上的酶标板已经预包被了抗体, 选取相应的板条;
- 2) 标准品请用相应的稀释液稀释; 如检测的是血清, 标准品用 EL-CPX08 稀释; 如果检测的是细胞上清样品或其他非血清样品, 请用 EL-CPV03 稀释; (本套餐中仅提供一种稀释液, 如需另外一种, 请单独订购)
- 3) 酶标板中加入适量稀释好的标准品和样品, 各 100ul;
- 4) 37 度温育 1 到 2 小时;
- 5) 洗板四次 (洗液同上);
- 6) 生物素二抗请根据说明书, 用生物素 (Biotin) 稀释液 (EL-CPX04) 进行稀释;
- 7) 37 度温育 30 分钟;
- 8) 洗板四次;
- 9) HRP 酶联物, 请用 (EL-CPX05) 稀释;
- 10) 每孔加入 100ul 稀释好的 HRP 酶联物, 37 度温育 1 小时或其他时间;
- 11) 洗板四次;
- 12) 加入显色液: 显色液 A, B (Substrate A, B) (EL-CPX06); 使用前请按照 A 液和 B 液 1: 1 比例充分混匀, 方可使用, 使用前 15 分钟配置; 每孔加入 50ul-100ul 混合后的显色液; 室温温育 10-30 分钟: 显色时间根据目测最高浓度标准品的颜色, 应为深蓝色, 630 读数, OD 值应在 0.7 以上;
- 13) 加入终止液 (Stop Solution) (EL-CPX07) 100ul 每孔。

加入终止液 50ul-100ul, 显色从蓝色转为黄色。建议采用 450-630 的双波读数。

注: 根据实验设计不同的包被浓度, 酶标二抗浓度, HRP 浓度, 反应时间等变量, 找到最优化的实验条件。确定试剂盒定量范围、灵敏度等试剂盒特性。

双抗夹心法可以回归为线性、二次曲线, 或者四参数曲线;

竞争法可以回归为 log-logit, 或者四参数曲线;

您可能会用到的其他包被产品: 见网页

品名	货号	品牌	规格	用途
封板膜 (plate sealer)	EL-CPX08-01	BioTNT	1 大张	可以剪裁后用于板的密封
酶标板自封铝箔袋+干燥剂	EL-CPI05-20	BioTNT	20 个自封袋 +40 个干燥剂	包被板的密封, 干燥, 稳定
样品稀释液: 非血清样品	EL-CPV03-100	BioTNT	100ml	用来稀释细胞上清样品或其他非血清样品
ELISA 洗涤液 (20X)	EL-00402-250	BioTNT	250ml	包被过程和实验过程中用于洗板; 如果对实验要求不高, 可以用 PBS (EL-00402) 代替;
PBS 缓冲液干粉	P1010-2L	BioTNT	2L	可用来配制 2L PBS 的干粉