

货号 S0C3017 – His tag 一步竞争法 ELISA（宽线性范围）试剂盒

用于真核或原核细胞培养上清或裂解液中 His tag 蛋白的定量测定
本产品仅用于科学研究，不能用于临床诊断

储存条件及有效期: 收到后请立即将试剂盒储存在 2-8℃。开封后试剂盒各组分建议有效期：酶标板 2～8℃为 1 个月（未使用的板条拆下来后请及时放回铝箔袋内并封好封口）；标准品溶解后当天有效；其它组分分开瓶后在 2-8℃ 保存不影响有效期。

试剂盒组分

Item	Quantity	Storage Condition
HRP conjugated anti-His tag Antibody 10X	600 μL	2-8℃
His tag protein Lyophilized Standards	2 vials	2-8℃
Assay Diluent #1	50 mL	2-8℃
Wash Buffer 10X	20 mL	2-8℃
TMB Solution	12 mL	2-8℃
Stop Solution	12 mL	2-8℃
Pre-Coated 96-Well His tag competitor -Microplate	12 x 8 well strips	2-8℃
Plate Seal	2	2-8℃

用户需自备材料，试剂盒未提供

能够测量吸光度 450nm 或 650nm 的酶标仪
酶标板恒温振荡器
多通道和单通道移液器
去离子水
离心管或稀释板

试剂配制

使用前请先将所有试剂恢复到室温。本试剂盒包含一个 96 孔板所需要的试剂量。

1X Wash Buffer:

用去离子水稀释 10X Wash Buffer，制备 1X Wash Buffer。将 10ml 10X Wash Buffer 与 90ml 去离子水混合制成 100ml 1X Wash Buffer，轻柔搅拌均匀。
注意：10X Wash Buffer 在 2-8℃ 储存时可能有结晶析出，为正常现象，恢复室温后结晶会完全溶解。请等至结晶完全溶解后在用去离子水稀释。

1X HRP conjugated anti-His tag Antibody:

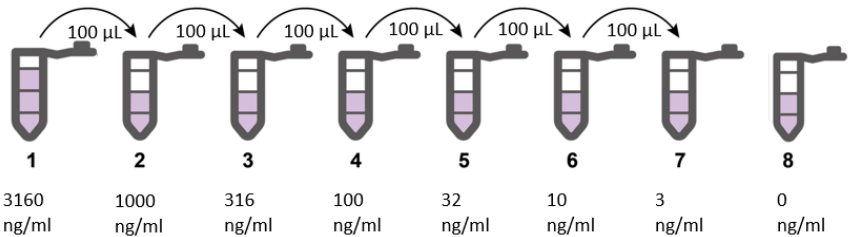
用 Assay Diluent #1 稀释 HRP conjugated anti-His tag Antibody 母液制备成 1X 工作液。例如将 500μL 10X HRP conjugated anti-His tag Antibody 和 4.5 mL Assay Diluent #1 混合均匀，即配制成 5ml 1X HRP conjugated anti-His tag Antibody。

标准品配制

每次实验都要配制一组新的标准品。
冻干的标准品粉末溶解后为标准品母液，仅限当天使用。
标准品工作液现配现用，建议工作液配好后一小时内使用，超过一小时需要重新配制。
下面描述了本试剂盒推荐的标准曲线的配制过程。

重要信息: 每管的标准品粉末的标识质量及重溶体积标注于标准品的标签上，开盖前短暂离心后加入管子标签所标识体积的 **Assay Diluent** 溶解即为 His tag protein 标准品首浓度溶液。在室温下充分溶解 10 分钟，并轻轻混合。

1. 用记号笔标记 8 个离心管或稀释板中的一列（8 孔），分别为标准品工作液 1–8。
2. 在 1 号管/孔中加入直接加入溶解好的标准品，在 2-8 号管/孔中加入 **216** μL Assay Diluent。
3. 按照下图配制标准品梯度。标准品 #8 为空白对照；



样品准备

将细胞培养上清或裂解后的细胞匀浆上清在 2000 x g 下离心 10 分钟，去除碎片。收集上清液后可直接上样或用 Assay Diluent 稀释后进行上样。在 -20℃ 或以下保存未稀释的样品。避免重复冻融循环。

Reagent Compatibility

Reagent	Recommended Use
Imidazole	≤ 125 mM
Guanidine HCl	≤ 30 mM
Urea	≤ 0.5 M
SDS	≤ 0.02%
EDTA	≤ 2 mM
Tris (pH=7)	≤ 6.5 mM
CHAPS	≤ 5%
Tween-20	≤ 2%
Glycerol	≤ 0.2%
RIPA Lysis Buffer	≤ 0.4%
PBS	Fully compatible
TBS	Fully compatible

酶标板准备

96 孔可拆卸的酶标板为即用型，可以直接上样，不需要其他处理。板型为 12 条 1 x 8 板条。
未使用的板条应立即返回到含有干燥剂包装的箔袋中，重新密封并在 2-8°C 下保存。

实验步骤

使用前将需要所有材料和试剂平衡至室温。

建议所有标准品、对照品和样品一式两份做平行孔测试。

- 1) 按照上页的说明准备所有试剂、工作标准品和样品。
- 2) 从可拆卸的板框上去除多余的酶标板条，将其放回含有干燥剂包装的箔袋中，重新密封并返回 2-8°C 储存。
- 3) 取 50μL 样品或标准品加到相应的孔中。
- 4) 每孔中在加入 50μL 1X HRP conjugated anti-His tag Antibody。
- 5) 贴上封板膜，在设置条件为“转速 500 转/分钟和温度 25°C”的酶标板恒温振荡器上孵育 45 分钟。
- 6) 用 300μL 1X Wash Buffer 清洗每个孔，清洗三次。最后一次洗涤后，把板子倒过来，在干净的纸巾上轻轻拍打数次，以去除多余的液体。
- 7) 每孔加入 100μL TMB 底物，在 500 转/分的酶标板恒温振荡器上避光显色 10 分钟。
鉴于实验室环境条件的可变性，最佳显色时间可能在 5 至 15 分钟之间变化。注:加入终止液后，颜色由蓝色变为黄色，信号强度增强约 3 倍。为避免信号饱和，加入终止液前可以预读一下酶标板，在标准品的高浓度达到蓝色 O.D.650 = 1.0 之前进行下一步操作。
- 8) 每孔加入 100μL 终止液，充分混匀后在 30 分钟内测定每个孔的 OD450，使用设置为 450 nm 的酶标仪。如果有波长校正，请设置为 540nm 或 570nm，校准后的 OD 值为 450 nm 的测定值减去 540 nm 或 570 nm 的测定值。

结果计算

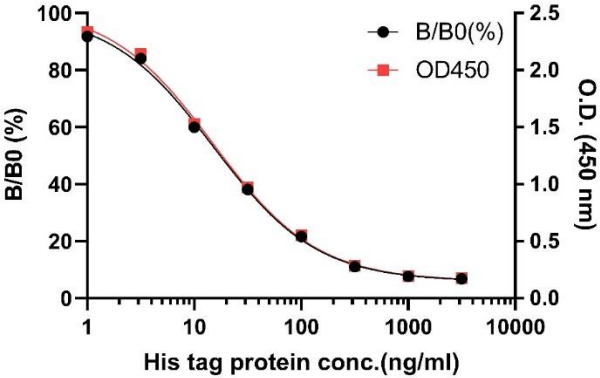
取每个标准品和样品的重复读数的平均值，记为该标准品或样品的 B 值，标准曲线列的零的重复读数平均值记为本次实验的 B0 值。

将 OD 值转化为 Percent Bound (B/B0)，即 $(B/B0) \times 100\%$

通过使用能够生成四参数逻辑(4-PL)曲线拟合的计算机软件创建标准曲线和换算样本浓度。

如果样品被稀释后再上样，从标准曲线上换算出的浓度必须在乘以稀释倍数才是样本的实际浓度。

标准曲线式例



酶标板布局 可以使用此图布局和记录标准品和分析样品

