

货号 S0C3031 – *E. coli* HCP 一步法 ELISA 试剂盒

用于原核表达的重组蛋白中 HCP 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°C。开封后试剂盒各组分建议有效期：酶标板 2~8°C 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°C 保存不影响有效期。

试剂盒组分

Item	Quantity	Storage Condition
<i>E. coli</i> HCP Capture Antibody 10X	600 µL	2-8°C
<i>E. coli</i> HCP Detector Antibody 10X	600 µL	2-8°C
<i>E. coli</i> HCP Lyophilized Recombinant Protein	2 Vials	2-8°C
PTL Buffer (100 X)	1500µL	2-8°C
Assay Diluent #8	30 mL	2-8°C
Assay Diluent #1	30 mL	2-8°C
Wash Buffer 10X	20 mL	2-8°C
TMB Solution	12 mL	2-8°C
Stop Solution	12 mL	2-8°C
OneStep Pre-Coated 96-Well H-Microplate	12 x 8 well strips	2-8°C
Plate Seal	2	2-8°C

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°C 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。

PTL Buffer (100 X) 在 2-8°C 储存时有结晶析出，为正常现象，请先恢复室温后结晶会完全溶解。请等至结晶完全溶解后在使用。拆封后可以将该试剂室温保存

Antibody Cocktail:

用 Assay Diluent #1 稀释 Capture Antibody 和 Detector Antibody，制备抗体对混合液。将 500µL 10X Capture Antibody 和 500µL 10X Detector Antibody 与 4 mL Assay Diluent #1 混合均匀，即配制成 5ml 抗体对混合液。

标准品配制

每次实验都要配制一组新的标准品。

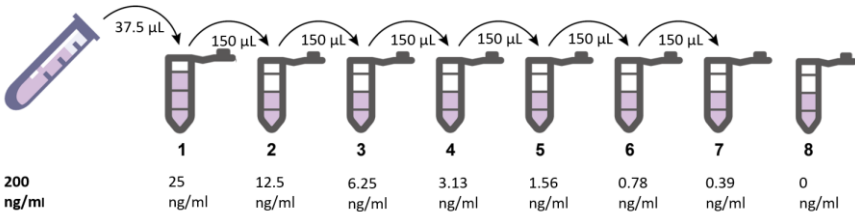
冻干的标准品粉末溶解后为标准品母液，仅限当天使用。

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去离子水溶解即为 *E. coli* HCP 标准品母液。在室温下充分溶解 10 分钟，并轻轻混合。这是 200 ng/mL 标准品母液。

- 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。
- 在 1 号管/孔中加入 262.5 µL Assay Diluent #8，在 2-8 号管/孔中加入 150 µL Assay Diluent #8。
- 使用标准品母液按照下图配制标准品梯度。标准品 #8 为空白对照；



样品准备

原核表达的重组蛋白样品:

待检测样本需要添加等体积 100 X PTL 缓冲液到终浓度 50 X，振荡混匀后室温静置 5min，样本上样前在用 Assay Diluent #1 稀释 50 倍后进行上样。推荐的样本上样前处理如下表：

待检测样品	5µL
PTL Buffer (100 X)	5µL
振荡混匀后室温静置 5min	
Assay Diluent #1	490µL

充分混匀后取 50µL 上样，注意此时上样时待检测样本浓度已经稀释 100 倍。

注意：若待检测样本 HCP 值过低，推荐用去离子水稀释 PTL Buffer (100X)，可在 10X – 100X 范围内，选择合适的 PTL Buffer 倍数去处理样品，确保上样时 PTL 的终浓度是 1X 即可；若待检测样本 HCP 过高，推荐先使用 Assay Diluent #1 将待检测样本稀释到蛋白浓度 100 µg/ml 后再按照上表推荐的方法进行预处理。

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℃ 储存。
- 3) 取 50μL 样品或标准品加到相应的孔中。
- 4) 每孔中加入 50μL 抗体对混合液。
- 5) 贴上封板膜，在设置条件为“转速 500 转/分钟和温度 25℃”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。

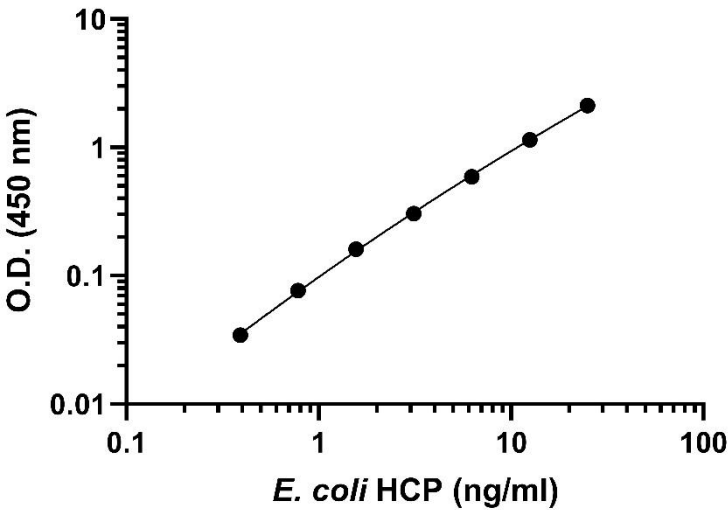
结果计算

取每个标准品和样品的重复读数的平均值，然后减去空白对照平均读值。

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

