Mouse CRP EZ-SET ELISA Kit

DIY Antibody Pairs

产品编号： EZ0977

规格： 96T×5

检测范围： 156pg/ml→10,000pg/ml

特异性： 系统和其它细胞因子无交叉反应。

有效期： 6 个月(4℃)；12 个月（-20℃）。

用途： 用于体外定量分析小鼠血清、血浆、细胞裂解液或细胞培养上清。

工作原理

博士德所提供的小鼠 CRP ELISA Kit 是典型的夹心法酶联免疫吸附测定试剂盒（Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay, ELISA）。检测抗体经生物素（biotin）标记。样品和生物素标记抗体先后加入已经包被抗体的酶标板孔反应后，PBS 或 TBS 洗涤。随后加入过氧化物酶标记的亲和素反应；经过 PBS 或 TBS 的彻底洗涤后用底物 TMB 显色。TMB 在过氧化物酶的催化下转化成蓝色，并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的小鼠 CRP 呈正相关。

试剂盒中内容

内容	规格	数量
重组小鼠 CRP 冻干标准品	10ng/管	3 管
抗小鼠 CRP 包被抗体(100X)	500ul	1 管
生物素标记抗小鼠 CRP(100X)	500ul	1 管
亲和素-过氧化物酶复合物（ABC）（100X）	500ul	1 管

注意：使用前请检查试剂盒中试剂的标签和数量与表格是否一致

需要而未提供的试剂和器材

1. 标准规格酶标仪。
2. 自动洗板机。
3. 恒温箱。
4. 系列可调节移液器及吸头，一次检测样品较多时，最好用多通道移液器。
5. 干净的试管和 Eppendof 管。
6. 酶标板（Cat# AR1100）。
7. 封板膜。
8. 包被抗体稀释液：PBS。
9. 蛋白样品稀释液、检测抗体稀释液、封闭液、ABC 稀释液：1% BSA in PBS, pH 7.2-7.4。
10. TMB 显色液（Cat# AR1104）。

11. 终止液（Cat# AR1105）。
12. 洗涤缓冲液(PBS and PBS-T)
PBS: 8g NaCl, 0.2g KCl, 1.15g Na2HPO4, 0.2g KH2PO4, 溶于 800ml 的蒸馏水中，混匀后定容至 1L，调节 pH 值为 7.2-7.4 。PBS-T: 0.1% Tween® 20 in PBS，调节 pH 值为 7.2-7.4。

试剂 6-12 在 EZA001 试剂盒中都有提供

注意事项

1. 用户在初次使用试剂盒时，应将各种试剂管离心数分钟，以便试剂集中到管底。
2. 要严格避免操作过程中酶标板干燥。干燥会使酶标板上生物成份迅速失活。
3. 为免交叉污染，要避免重复使用手中的吸头和试管。
4. 禁止混用不同批次试剂盒内的试剂。
5. 揭封板膜和覆盖封板膜时应避免用力过大导致液体溅出。

洗板方法

手工洗板方法：吸去（不可触及板壁）或甩掉酶标板内的液体；在实验台上铺垫几层吸水纸，酶标板朝下用力拍几次；将 1X 洗涤缓冲液至少 300ul 注入孔内，浸泡 1-2 分钟。根据需要，重复此过程数次。

自动洗板：如果有自动洗板机，应在熟练使用后再用到正式实验过程中。

酶标板的准备

使用前将所有试剂置于室温，工作稀释剂准备好并立即使用。

1. 确定检测所需的已包被抗体的酶标板孔数目，并增加 1 孔作为 TMB 空白显色孔。总数=样品数+9；做双份检测时×2。
2. 包被抗小鼠 CRP 抗体工作液：根据每孔需要 100ul 计算总的用量（实际配制时应多配制 100-200ul）。按 1ul 包被抗小鼠 CRP 抗体加 PBS 99ul 的比例配制工作液。轻轻混匀。将准备好的包被抗体工作液按每孔 100ul 依次加入酶标板中，加上封板膜，在 4 ℃ 下孵育过夜。
3. 吸去板内液体，按每孔 200ul 依次加入封闭液，室温封闭 2 小时。
4. 1X 洗涤缓冲液洗涤 3 次，每次浸泡 5s。
5. 吸去板内液体，即可进行后续实验。

试剂的准备和保存

A．小鼠 CRP 标准品的稀释和使用：在使用前 2 小时内准备。

试剂盒提供 3 管标准品，每管 10ng，每次使用 1 管。

1. 配制 10,000pg/ml 标准品：取 1ml 样品稀释液加入标准品管内，盖好后静置 10 分钟以上，然后反复颠倒/搓动以助溶解。
2. 配制 5000pg/ml→156pg/ml 标准品：准备 6 只 Eppendorf 管，每管加 300ul 样品稀释液，分别标记上 5000pg/ml，2500pg/ml，1250pg/ml，625pg/ml，312pg/ml，156pg/ml。取 300ul 10,000pg/ml 的标准品加入标记 5000pg/ml 的管中，混匀后同样取出 300ul，加入下一只管中。余同此类推，直到最后一只样品管。

注意：已经稀释的标准品（10,000pg/ml）应在 12 小时内使用。-20℃冷冻保存条件下，2 天内可以使用,但不得反复冻融。

B．生物素标记抗小鼠 CRP 抗体工作液：在使用前 2 小时内准备。

1． 根据每孔需要 100ul 计算总的用量（实际配制时应多配制 100-200ul）。
2． 按 1ul 生物素标记抗小鼠 CRP 加抗体稀释液 99ul 的比例配制工作液。轻轻**混匀**。

C．亲和素-过氧化物酶复合物（ABC）工作液的准备：**在使用前 1 小时内准备**。

1． 根据每孔需要 100ul 计算总的用量（实配时应多配制 100-200ul）。
2． 按 1ul 亲和素-过氧化物酶复合物（ABC）加 ABC 稀释液 99ul 的比例配制工作液。轻轻**混匀**。

操作程序

1． 确定本次检测所需的已包被抗体的酶标板孔数目，取出后其余重新包装好放入冰箱中。
2． 将 10,000pg/ml，5000pg/ml，2500pg/ml，1250pg/ml，625pg/ml，312pg/ml，156pg/ml 的标准品各 100ul 依次加入一排 7 孔中，1 孔只加样品稀释液的作为零孔。对于血清、血浆、细胞裂解液或细胞培养上清，每孔加 100ul 已用样品稀释液稀释的样品。
3． 酶标板加上封板膜，37℃反应 90 分钟。
4． 反应后用自动洗板机吸去酶标板内的液体（将自动洗板机的洗涤次数设为零再开始即可）；或甩去酶标板内液体，再对着吸水纸拍几下。**不洗**。
5． 将准备好的生物素抗小鼠 CRP 抗体工作液按每孔 100ul 依次加入（TMB 空白显色孔除外）。酶标板加上封板膜，37℃反应 60 分钟。
6． 1X PBS 洗涤缓冲液洗涤 3 次，每次浸泡 1 分钟左右（每孔洗液至少 300ul）。
7． 将准备好的 ABC 工作液按每孔 100ul 依次加入（TMB 空白显色孔除外）。酶标板加上封板膜，37℃反应 30 分钟。
8． 1X PBS-T 洗涤缓冲液洗涤 5 次，每次浸泡 1-2 分钟左右（每孔洗液至少 300ul）。
9． 按每孔 90ul 依次加入 TMB 显色液，37℃避光反应 15-20 分钟。（**注意：**显色时间供参考，因用户实验室条件差异，最佳显色时间会有所不同。此时肉眼可见标准品的前 3-4 孔有明显的梯度蓝色，后 3-4 孔差别不明显）。
10． 按每孔 100ul 依次加入终止液，此时蓝色立转黄色。
11． 用酶标仪在 450nm 测定 O.D.值。

结果分析

a. 所有的标准品和样品的吸光值减去 TMB 空白显色孔或者零孔的吸光值。
b. 以标准品浓度作为横坐标，吸光值作为纵坐标，手工绘制或用软件绘图并选取最佳拟合曲线，推荐使用四参数方程拟合。ELISA 绘图软件可以在博士德公司官网技术支持下载。
c. 根据样品的吸光值在坐标上找出对应的浓度。若标本 OD 值高于标准曲线上限，应适当稀释后重测，**应记住由于样品稀释了 N 倍，其实际浓度应该×N**。

典型数据

TMB37℃反应 15 分钟。

（数据供参考，不同用户最佳显色时间会有所不同）

浓度	0.0pg/ml	156pg/ml	313pg/ml	625pg/ml	1250pg/ml	2500pg/ml	5ng/ml	10ng/ml
O.D.	0.087	0.290	0.424	0.775	1.140	1.445	1.886	2.190