Mouse CRP Quick ELISA Kit

产品编号： FEK0977

规格： 96T

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。

敏感性： ＜5pg/ml

有效期： 6 个月(4℃)。

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 Quick ELISA Kit，标准品、样品分别加入抗标签酶标板孔，再加入抗体混合物，抗体混合物由标签标记的包被抗体和辣根过氧化物酶连结的检测抗体组成。反应后，形成抗体-抗原-酶连结抗体的复合物，经过洗液洗涤掉未结合到酶标板孔的物质后用底物 TMB 显色。TMB 在辣根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 CRP 呈正相关。

试剂盒中内容(96 孔)

内容	规格	数量
Anti-tag coated 96 孔板	96T	1 板
重组小鼠 CRP 冻干标准品(Standard)	10ng/管	2 管
抗小鼠 CRP 抗体 A(Antibody A)	3ml	1 瓶
抗小鼠 CRP 抗体 B(Antibody B)	3ml	1 瓶
样品稀释液(Sample Diluent)	15ml	1 瓶
TMB 显色液(Color Developing Reagent)	10ml	1 瓶
终止液(Stop Solution)	10ml	1 瓶
TBS-T 洗涤缓冲液(25×TBS-T Wash Buffer)	12ml	1 瓶
封板膜		2 张

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. 振荡器。
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. 去离子水或者双蒸水。

注意事项

1. 使用前 TMB 显色液应为无色透明溶液，若发现颜色异常，请及时与厂家联系。
2. 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。
3 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。
4. 为免交叉污染，要避免重复使用手中的吸头和试管。
5. 禁止混用不同批次试剂盒内的试剂。
6. 本公司提供的 96 孔酶标板是单条可拆型酶标板，用户可按需求使用；剩余的酶标板请按保存条件贮存。
7. 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 1×TBS-T 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。

样品的准备和保存

样品如果不立即分析，应分装后冷冻保存，且避免反复冻融。
细胞培养上清——离心去除沉淀，立即分析或分装后-20℃冷冻保存。
血清——用干净试管收集血液，室温凝固 30 分钟，离心 2000×g 20 分钟，收集血清。立即分析或分装后-20℃冷冻保存。
血浆——采用肝素、柠檬酸盐或 EDTA 抗凝，抽血后 30 分钟内在 2-8℃离心 2000×g 20 分钟。为消除血小板的影响，建议在 2-8℃进一步离心 10000×g 10 分钟。立即分析或分装后-20℃冷冻保存。
细胞裂解液——对于贴壁细胞，去除培养液，用 PBS、生理盐水或无血清培养液洗一遍。加入适量裂解液，用枪吹打数下，使裂解液和细胞充分接触。通常 10 秒后，细胞就会被裂解。对于悬浮细胞，离心收集细胞，用 PBS、生理盐水或无血清培养液洗一遍。加入适量裂解液，用枪吹打把细胞吹散，用手指轻弹以充分裂解细胞。充分裂解后，10000—14000×g 离心 3-5 分钟，取上清。立即分析或分装后-20℃冷冻保存。

样品稀释的一般原则

用户须估计样品待测因子的含量，决定适当的稀释倍数，以使稀释后样品中待测因子的浓度处于 ELISA 试剂盒的最佳检测范围。根据待测因子含量高、中、低的不同，分别采取不同的稀释方案：
高——指待测因子在 100-1000ng/ml。按 1：100 稀释。297ul 样品稀释液加 3ul 样品。
中——指待测因子在 10-100ng/ml。按 1：10 稀释。225ul 样品稀释液加 25ul 样品。
低——指待测因子在 156 –10,000pg/ml。1：2 稀释。100ul 样品稀释液加 100ul 样品。
特低——指待测因子≤156pg/ml。样品一般不做稀释，或按 1：2 稀释。
以上方案仅供参考，样品的稀释应有详细记录。

试剂的准备和保存

A. CRP 标准品的稀释和使用：在使用前 1 小时内准备。

试剂盒提供 2 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. 抗小鼠 CRP 抗体混合物的准备：在使用前 1 小时内准备。

1．根据每孔需要 50ul 计算总的用量（实际配制时应多配制 50-100ul）。

2．抗体 A 和抗体 B 按 1:1 的比例制备抗体混合物。例如 50ul 抗体 A 加 50ul 抗体 B，轻轻混匀。

C．1X 洗涤缓冲液的准备：在使用前 1 小时内准备。

1．根据每孔需要 1.5ml 计算总的用量（每孔每次加 350ul 洗液）。使用洗板机洗板应根据实际情况多配制一些洗液。

2．按 12ml25×洗液加 288ml 去离子水或蒸馏水的比例配制工作液，混匀。

操作程序

所有工作液在加入酶标板孔前都应平衡至室温。试剂或样品稀释时，**切不可忘记混匀**。**每次检测都应该做标准曲线**。用户须估计样品待测因子的含量，决定适当的稀释倍数。

1. 确定本次检测所需的预包被的酶标板孔数目，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。其余重包装好放入冰箱中。
2. 每孔分别加入 50ul 10,000pg/ml ，5000pg/ml，2500pg/ml，1250pg/ml，625pg/ml，312pg/ml，156pg/ml, 0pg/ml（样品稀释液）的标准品，准备好的样本 50ul。再将抗小鼠 CRP 抗体混合物每孔 50ul 依次加入（TMB 空白显色孔除外）。
3. 酶标板加上封板膜，室温振荡孵育 60 分钟，速度 500rpm，振幅 3mm。
4. 1×TBS-T 洗涤缓冲液洗涤 4 次，每次浸泡 90 秒（每孔洗液至少 300ul）。
5. 按每孔 90ul 依次加入已平衡至室温的 TMB 显色液，室温避光反应 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）。
6. 按每孔 100ul 依次加入终止液，此时蓝色立转黄色。
7. 用酶标仪在 450nm 测定 O.D.值。

   有两种设定空白对照的方案：

   （1）将 TMB 空白显色孔(**只加 TMB 显色液和终止液**)设为对照。所有的标准品和样品的吸光值减去 TMB 空白显色孔的吸光值后，在坐标纸上画出曲线，以吸光值作为纵坐标，以浓度作为横坐标。

   （2）将零孔设为对照。所有的标准品和样品的吸光值减去零孔的吸光值后，得到的数据可以直接在坐标纸上画出曲线。
8. 根据样品的吸光值在坐标上找出对应的浓度。用户也可以使用各种应用软件来计算。**应记住**

由于样品稀释了 N 倍，其实际浓度应该×N。

操作程序总结：

1. 加样品和标准品，抗体混合物室温振荡反应 60 分钟，速度 500rpm，振幅 3mm。
2. 1×TBS-T 洗涤缓冲液洗涤 4 次。
3. 加 TMB 室温反应 15-20 分钟。
4. 加入终止液，读数。

典型数据

（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.	0.090	0.173	0.233	0.394	0.677	0.973	1.596	2.325