

## SignalUp™ ELISA超敏检测试剂盒(HRP荧光法)

产品编号	产品名称	包装
P0205S	SignalUp™ ELISA超敏检测试剂盒(HRP荧光法)	100次
P0205M	SignalUp™ ELISA超敏检测试剂盒(HRP荧光法)	500次
P0205L	SignalUp™ ELISA超敏检测试剂盒(HRP荧光法)	2000次

### 产品简介:

- 碧云天研发的SignalUp™ ELISA超敏检测试剂盒(HRP荧光法) (SignalUp™ Super Sensitive ELISA Assay Kit with Fluorescent HRP Substrate)是基于在辣根过氧化物酶(HRP)存在的条件下,过氧化物酶荧光底物ADHP与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>反应生成试卤灵(Resorufin),从而对ELISA反应体系中的HRP进行超敏荧光检测的试剂盒。
- 本试剂盒的检测灵敏度比常规TMB作为底物时通常要提高10倍以上。这样可以大大减少珍贵样品的用量,并有可能检测一些因浓度过低而不能被TMB法检测的样品。在ELISA检测时,如果样品非常珍贵,或者待测目标分子因为浓度过低而不太容易被检测到时,强烈推荐使用时本试剂盒。本产品与Thermo的QuantaRed™ Enhanced Chemifluorescent HRP Substrate相近。
- 常见的用于ELISA测定中检测HRP活性的底物多为显色底物,如TMB、OPD和ABTS等,需要进行吸光度的检测。这些底物的性能如检测灵敏度、动态范围等的差别较大。其中,TMB是目前最灵敏的显色底物之一,较其它几种显色底物有更好的检测灵敏度,并在ELISA检测中广泛应用[1]。但吸光度检测法无法对超过四个光学密度单位(Optical density, OD)进行准确定量,限制了ELISA检测的上限,而荧光法则不受影响,在检测仪器允许的情况下能够准确检测极高的荧光强度。更为重要的是,相对于吸光度检测法,荧光检测法更为灵敏,检测限范围也更宽[2]。
- ADHP,即10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine,又名Amplex Red、Ampliflu™ Red、OxiRed Probe、Amplisyn Red或A6550,中文名为荧光红染料或10-乙酰基-3,7-二羟基吩嗪, CAS号为119171-73-2,是一种可以用于吸光度或荧光检测的过氧化物酶底物,更常用于荧光分析检测。ADHP是目前已知的用于辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase, HRP)和过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)的检测最灵敏、最稳定的荧光探针之一。在HRP存在的情况下,ADHP与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>以1:1的化学定量比反应,生成高荧光的试卤灵(Resorufin),其最大激发波长为571nm,最大发射波长为585nm,并且在激发波长处有很强的可见光吸收,也可在A570检测吸光度[3]。在免疫学分析中,ADHP已经广泛地用来检测HRP。与其它商品化的HRP底物相比,如二氢荧光素和二氢罗丹明等,ADHP的本底荧光水平更低,受空气氧化的影响也较小。本试剂盒的检测原理请参考图1。

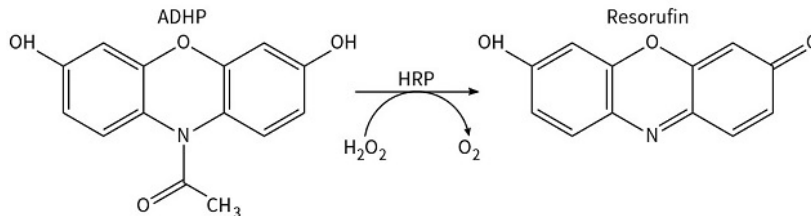


图1. 碧云天SignalUp™ ELISA超敏检测试剂盒(HRP荧光法)的检测原理图。

- 本试剂盒检测背景低。**反应生成的试卤灵的发射波长接近红光区,此波长下生物样品自发荧光(位于波长较短的蓝绿光区)的干扰较小,使ADHP成为对生物样品中目标分子进行检测的理想底物。
- 本试剂盒检测范围广,灵敏度高。**本试剂盒显著提升了普通ELISA实验的检测范围,灵敏度远远高于TMB底物,检测下限提升>10倍。本试剂盒与TMB检测信号对比参考图2。

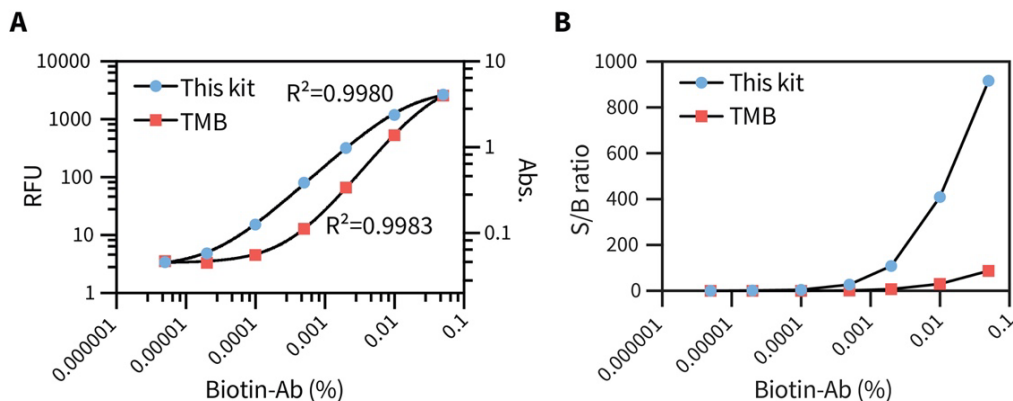


图2. 碧云天SignalUp™ ELISA超敏检测试剂盒(HRP荧光法)与TMB法对96孔板中包被的不同浓度生物素标记二抗(Biotin-Ab)检测效果对比图。生物素标记山羊抗小鼠IgG(H+L) (A0286)稀释至图中所示各浓度,对96孔板进行包被;辣根过氧化物酶标记Streptavidin (A0303)用PBS按1:10,000稀释后加入各反应孔中室温孵育30分钟;洗板后,分别加入100μl ADHP工作液或TMB显色液(ELISA HRP显色用) (P0209),室温避光孵育15分钟。对使用本试剂盒的反应孔进行荧光检测,激发和发射波长分别设置为558nm和590nm;对TMB反应孔中加入TMB显色终止液(450nm,不含硫酸) (P0215)并在450nm检测吸光度。图A为使用本试剂盒和TMB检测的标准曲线,生物素标记二抗浓度为横坐标,荧光强度(本试剂盒,左纵轴)或A450 (TMB,右纵轴)为纵坐标。对曲线分别进行ELISA中常用到的四参数拟合(Four Parameter Logistic Regression, 4PL),并用空白缓冲液信号均值加上三倍标准偏差对检测限(Limit of detection, LOD)进行计算,得出本试剂盒检测限相比TMB显色体系提升>10倍。图B为本试剂盒和TMB在各浓度的信号与背景信号比值,从图中可以看出荧光检测不受信号读取上限的限制,极大增加了信号-背景比(Signal-to-Background ratio, S/B ratio),可使检测灵敏度得到提升。实测数据会因试剂、检测仪器等的不同而存在差异,图中数据仅供参考。

- **本试剂盒组分齐全,使用便捷。**本试剂盒全套提供试剂,包括过氧化物酶底物ADHP (ADHP Substrate Solution)、稳定过氧化物溶液(Stable Peroxide Solution)、反应缓冲液(Assay Buffer)和终止液(Stop Solution)。用户只需简单混合并使用,无需额外准备缓冲液或溶解试剂。
- **本试剂盒反应可控。**本试剂盒提供的反应终止液,可有效终止HRP催化荧光产物的生成,可至少获得1小时的稳定信号。本试剂盒终止液使用效果参考图3。

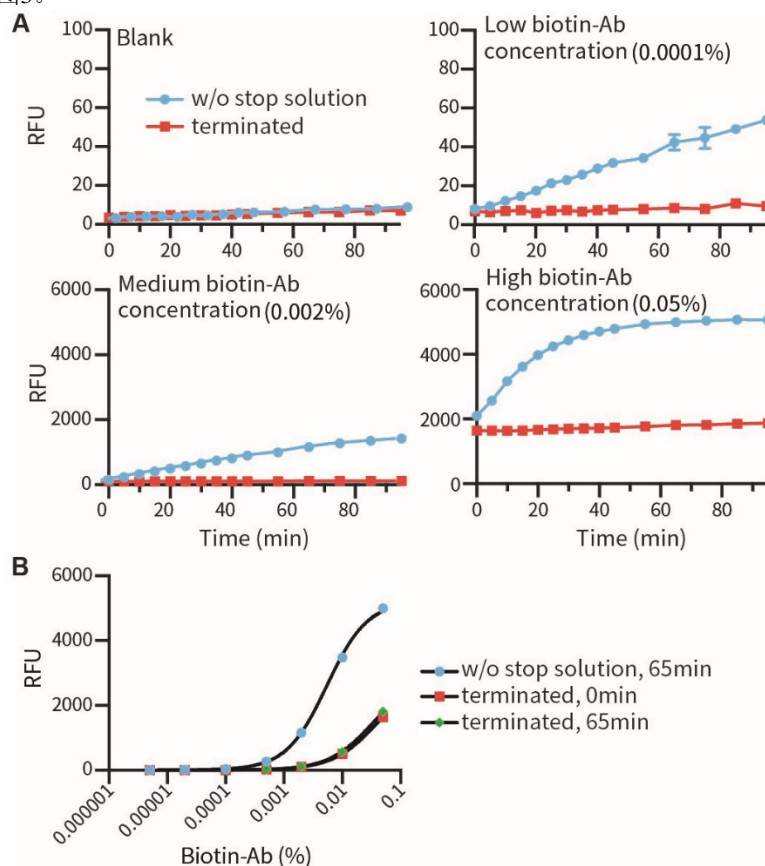


图3. 碧云天SignalUp™ ELISA超敏检测试剂盒(HRP荧光法)反应终止液的使用效果图。在低(0.0001%)、中(0.002%)、高(0.05%)三种浓度的生物素标记山羊抗小鼠IgG(H+L) (A0286),即图A中的low/medium/high Biotin-Ab,包被的孔中加入1:10,000稀释的辣根过氧化物酶标记Streptavidin (A0303),室温孵育30分钟;洗板后,分别加入100μl ADHP工作液,室温避光孵育5分钟后,进行同一浓度的生物素包被孔终止反应的平行实验:在反应孔中加入100μl反应终止液,对照孔不做处理;对各孔反应进行荧光检测跟踪,激发和发射波长分别设置为558nm和590nm,反应温度为25°C。图A为对照孔及低、中、高三组生物素标记山羊抗小鼠IgG(H+L)浓度下反应孔荧光强度随时间的变化。图B为反应在终止和未终止情况下持续约1小时后的标准曲线。从图中可以看出,本试剂盒中的反应终止液能够有效终止HRP催化荧光产物的生成。实测数据会因试剂、检测仪器等的不同而存在差异,图中数据仅供参考。w/o, without。

- 对于96孔板,按照每孔使用100μl ADHP工作液计算,本试剂盒小包装可以用于100个样品的检测,中包装可以用于500个样品的检测,大包装可以用于2000个样品的检测。

**包装清单:**

产品编号	产品名称	包装
P0205S-1	ADHP Substrate Solution (100X)	100μl
P0205S-2	Stable Peroxide Solution (50X)	200μl

P0205S-3	Assay Buffer	10ml
P0205S-4	Stop Solution	10ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
P0205M-1	ADHP Substrate Solution (100X)	500μl
P0205M-2	Stable Peroxide Solution (50X)	1ml
P0205M-3	Assay Buffer	50ml
P0205M-4	Stop Solution	50ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
P0205L-1	ADHP Substrate Solution (100X)	2ml
P0205L-2	Stable Peroxide Solution (50X)	4ml
P0205L-3	Assay Buffer	200ml
P0205L-4	Stop Solution	200ml
—	说明书	1份

### 保存条件：

-20°C保存，一年有效。4°C保存，一个月有效。其中ADHP Substrate Solution (100X)和Stable Peroxide Solution (50X)需要避光保存。

### 注意事项：

- 各溶液需平衡至室温(25°C左右)后再使用，溶液温度会影响反应的动力学。Stop Solution在低温时会有晶体析出，可在使用前置于37°C水浴中使温度尽快恢复至室温，使晶体重新溶解。
- 各溶液使用后，请盖紧瓶盖，以防失效。特别是ADHP Substrate Solution (100X)和Stable Peroxide Solution (50X)，在空气中不太稳定，暴露时间过长容易失效。
- 可根据需要对ADHP Substrate Solution (100X)进行分装后保存。
- ADHP Substrate Solution (100X)和Stable Peroxide Solution (50X)使用时需注意避光。
- 使用过程中，各溶液在吸取过程中必须要更换枪头，否则相互污染后会导致逐渐失效，影响后续的使用效果。
- 为确保仪器读取结果的准确性，加样过程中须避免气泡的产生。
- 检测时建议使用96孔黑板，例如碧云天的BeyoGold™全黑96孔细胞培养板(FCP966)。
- Stop Solution对人体有刺激性，操作时请小心，并注意适当防护以避免直接接触人体或吸入体内。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

### 使用说明：

#### 1. ELISA检测。

- 按照常规的ELISA的实验步骤，进行抗体(夹心法检测)或抗原(直接/间接/竞争法检测)的包被、封闭，样品的孵育及洗涤各步骤。在与辣根过氧化物酶标记的抗体或Streptavidin孵育后，用适当的洗涤液洗涤反应孔3至5次。在进行最后几次洗涤步骤的时候，可以同时进行步骤1b。

**注：**如果孵育时间较长或温度较高，需用封板膜封住反应孔，防止挥发造成检测结果不准，可使用碧云天的封板膜(透明，耐冷耐热耐常见溶剂)(FSF017)。

- ADHP工作液(ADHP Working Solution)的配制：按照每个反应孔需100μl的ADHP Working Solution，均匀混合97μl Assay Buffer、1μl ADHP Substrate Solution (100X)和2μl Stable Peroxide Solution (50X)，即可配制成100μl ADHP Working Solution。根据反应孔数量，计算所需ADHP Working Solution的体积。具体配制方法参考下表。

Reagent	1 Sample	10 Samples	50 Samples	100 Samples
Assay Buffer	97μl	970μl	4.85ml	9.7ml
ADHP Substrate Solution (100X)	1μl	10μl	50μl	100μl
Stable Peroxide Solution (50X)	2μl	20μl	100μl	200μl
<b>ADHP Working Solution</b>	<b>100μl</b>	<b>1ml</b>	<b>5ml</b>	<b>10ml</b>

**注：**ADHP Working Solution配制后需尽快使用(如30分钟内)，配制时和配制完成后请注意避光。

- 最后一次洗涤后，去除孔中的液体并在吸水纸上拍干残余液体。
- 每个孔中加入100μl ADHP Working Solution，根据反应需要室温避光孵育5-15分钟或更长时间。
- (可选)根据实验需要考虑加入终止液：每个反应孔中加入100μl Stop Solution。通常推荐先进行2f的检测，在检测获得比较理想的荧光检测效果时，再在每个反应孔中加入100μl Stop Solution，混匀后再次进行荧光检测，以获得更理想的检测

数据。

**注1:** Stop Solution在低温时会有晶体析出,使用前需平衡至室温使其溶解。

**注2:** 为保证仪器读取准确性,加样时需避免气泡产生。

- f. 进行荧光测定。设置反应产物的最大激发和发射波长分别为570nm和585nm。也可根据需要将激发波长设定在530-575nm,发射波长设定在585-630nm范围内进行检测。

## 2. 其它检测(如样品溶液中过氧化物酶活性的检测)。

- a. 直接在96孔板内每孔加入10-20 $\mu$ l样品。  
b. 按步骤1b配制ADHP Working Solution。  
c. 每个孔中加入100 $\mu$ l ADHP Working Solution, 室温避光孵育5-15分钟或更长时间。  
d. (可选)根据实验需要考虑加入终止液: 每个反应孔中加入100 $\mu$ l Stop Solution。通常推荐先进行2f的检测, 在检测获得比较理想的荧光检测效果时, 再在每个反应孔中加入100 $\mu$ l Stop Solution, 混匀后再次进行荧光检测, 以获得更理想的检测数据。

**注1:** Stop Solution在低温时会有晶体析出,使用前需平衡至室温使其溶解。

**注2:** 为保证仪器读取准确性,加样时需避免气泡产生。

- e. 进行荧光测定。设置反应产物的最大激发和发射波长分别为570nm和585nm。也可根据需要将激发波长设定在530-575nm,发射波长设定在585-630nm范围内进行检测。

## 常见问题:

Problem	Possible Causes	Solution
背景信号高	HRP浓度过高	适当降低HRP标记的二抗或Streptavidin的浓度
	包被板封闭不完全	调整封闭的时间和温度(例如室温封闭至少1小时,或在4 $^{\circ}$ C下封闭过夜)
		选择更合适的封闭液,例如选购适当的封闭液或使用和一抗相同来源的血清(10%)进行封闭。
		提高封闭液中的蛋白浓度
	(夹心法)捕获抗体和检测抗体非特异性结合	更换抗体对
洗涤不充分	与HRP标记物孵育步骤后增加洗涤步骤或延长洗涤时间	
洗涤液中Tween-20可能造成干扰	在加入ADHP工作液前用不含Tween-20的洗涤液进行1-2次洗涤	
检测信号低	样品中待检测目标分子浓度过低	加入更多样品
	捕获或检测抗体浓度低(夹心法)一抗或二抗浓度低(其他方法)	适当优化和提高相应抗体的浓度。
	激发或发射波长不在合适范围	使用接近荧光产物的最大激发和发射波长进行检测
	荧光显色反应时间不够	适当延长避光孵育时间

## 参考文献:

1. Hosoda H, Takasaki W, Oe T, Tsukamoto R, Nambara T. Chem Pharm Bull (Tokyo). 1986. 34(10):4177-4182.
2. Meng Y, High K, Antonello J, Washabaugh MW, Zhao Q. Anal Biochem. 2005. 345(2):227-236.
3. Zhou M, Diwu Z, Panchuk-Voloshina N, Haugland RP. Anal Biochem. 1997. 253(2):162-168.

## 相关产品:

产品编号	产品名称	包装
A0279	生物素高效标记山羊抗兔IgG(H+L)	0.5ml
A0288	生物素高效标记山羊抗小鼠IgG(H+L)	0.5ml
A0303	辣根过氧化物酶标记Streptavidin	0.2ml
P0209-100ml	TMB显色液(ELISA HRP显色用)	100ml
P0209-500ml	TMB显色液(ELISA HRP显色用)	500ml
P0215-100ml	TMB显色终止液(450nm, 不含硫酸)	100ml
P0215-500ml	TMB显色终止液(450nm, 不含硫酸)	500ml
P0217-100ml	TMB显色终止液(650nm, 无腐蚀性)	100ml
P0603	SABC-HRP Kit (IHC, ICC, Blotting & ELISA)	1000次
P0612	SABC-HRP Kit with Anti-Mouse IgG (IHC & ICC)	500次
P0615	SABC-HRP Kit with Anti-Rabbit IgG (IHC & ICC)	500次
P0205S	SignalUp™ ELISA超敏检测试剂盒(HRP荧光法)	100次
P0205M	SignalUp™ ELISA超敏检测试剂盒(HRP荧光法)	500次

P0205L	SignalUp™ ELISA超敏检测试剂盒(HRP荧光法)	2000次
--------	--------------------------------	-------

Version 2022.05.06