

SignalUp™ ELISA特超敏检测试剂盒(HRP荧光法) (试用装)

产品编号	产品名称	包装
P0207FT	SignalUp™ ELISA特超敏检测试剂盒(HRP荧光法) (试用装)	50次
P0207S	SignalUp™ ELISA特超敏检测试剂盒(HRP荧光法)	100次
P0207M	SignalUp™ ELISA特超敏检测试剂盒(HRP荧光法)	500次
P0207L	SignalUp™ ELISA特超敏检测试剂盒(HRP荧光法)	2000次

产品简介:

- 碧云天研发的SignalUp™ ELISA特超敏检测试剂盒(HRP荧光法) (SignalUp™ Ultra 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H₂O₂反应生成试卤灵(Resorufin), 从而对ELISA反应体系中的HRP进行增强型超敏荧光检测的试剂盒。
- 本试剂盒优化了相应的增敏试剂, 在ELISA应用中检测HRP灵敏度比碧云天的同类产品SignalUp™ ELISA超敏检测试剂盒(P0205)高约2-5倍, 比常规TMB作为底物时提高20-50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常规显色方法检测的样品。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。本产品和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(H₂O₂)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H₂O₂以1:1的化学计量比反应, 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。本试剂盒所使用的增敏试剂, 可以有效增强ADHP的荧光, 从而进一步提高荧光检测的灵敏度。本试剂盒的检测原理请参考图1。

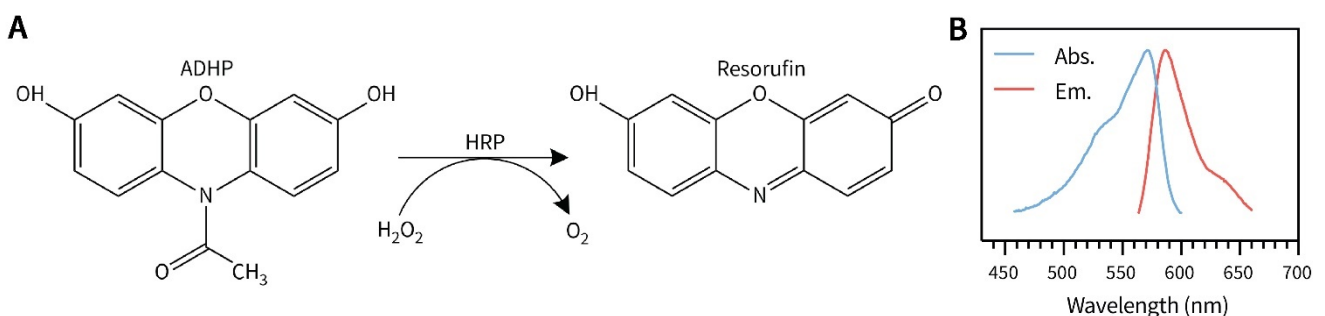


图1. 碧云天SignalUp™ ELISA特超敏检测试剂盒(HRP荧光法)的检测原理图。图A为ADHP在HRP催化下生成试卤灵的反应。图B为试卤灵在pH为7.4的缓冲溶液中的吸收和发射光谱。Abs.: Absorption, 吸收; Em.: Emission, 发射。

- **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(见图1B发射光谱), 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, 灵敏度极高。**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, 比碧云天的同类产品SignalUp™ ELISA超敏检测试剂盒(P0205)高约2-5倍。本试剂盒与P0205以及TMB检测信号对比参考图2。

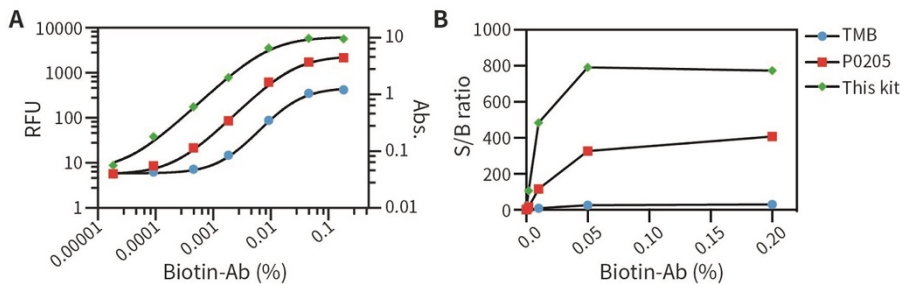


图2. 碧云天SignalUp™ ELISA特超敏检测试剂盒(HRP荧光法)与碧云天同类产品SignalUp™ ELISA超敏检测试剂盒以及TMB法对96孔板中包被的不同浓度生物素标记二抗(Biotin-Ab)检测效果对比图。生物素标记山羊抗小鼠IgG(H+L) (A0286)稀释至图中所示各浓度, 对96孔板进行包被; 辣根过氧化物酶标记Streptavidin (A0303)用PBS按1:10,000稀释后加入各反应孔中室温孵育30分钟; 洗板后, 分别加入100μl ADHP工作液(本试剂盒或P0205)或TMB显色液(ELISA HRP显色用) (P0209), 室温避光孵育10分钟。对使用本试剂盒和P0205试剂盒工作液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为使用各方法检测的标准曲线, 生物素标记二抗浓度为横坐标, 荧光强度(本试剂盒和P0205, 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P0205检测限相比TMB显色体系提升约10倍, 而本试剂盒比P0205的检测限进一步提高约4.5倍。图B为三种方法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), 而本试剂盒比P0205在相同浓度下的信号-背景比又有进一步的提升, 可使检测灵敏度得到提高。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)、增强剂溶液(Enhancer Solution)和终止试剂(Stop Reagent)。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试剂, 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。

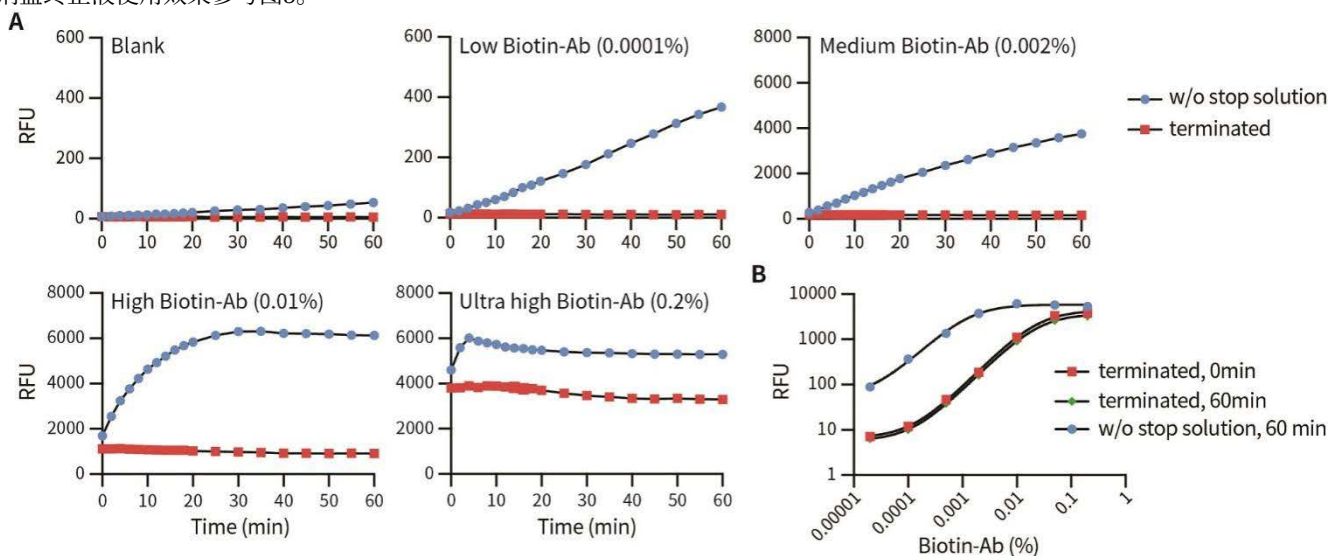


图3. 碧云天SignalUp™ ELISA特超敏检测试剂盒(HRP荧光法)反应终止液的使用效果图。在低(0.0001%)、中(0.002%)、高(0.01%)、极高(0.2%)四种浓度的生物素标记山羊抗小鼠IgG(H+L) (A0286), 即图A中的low/medium/high/ultra-high Biotin-Ab, 包被的孔中加入1:10,000稀释的辣根过氧化物酶标记Streptavidin (A0303), 室温孵育30分钟; 洗板后, 分别加入100μl ADHP工作液, 室温避光孵育10分钟后, 进行同一浓度的生物素包被孔终止反应的平行实验: 在反应孔中加入20μl反应终止液, 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为空白孔及低、中、高、极高四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
P0207FT-1	ADHP Substrate Solution (100X)	50μl
P0207FT-2	Stable Peroxide Solution (16X)	330μl

P0207FT-3	Enhancer Solution	4.8ml
P0207FT-4	Stop Reagent (2X)	0.5ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
P0207S-1	ADHP Substrate Solution (100X)	100µl
P0207S-2	Stable Peroxide Solution (16X)	650µl
P0207S-3	Enhancer Solution	9.5ml
P0207S-4	Stop Reagent (2X)	1ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
P0207M-1	ADHP Substrate Solution (100X)	500µl
P0207M-2	Stable Peroxide Solution (16X)	3.3ml
P0207M-3	Enhancer Solution	48ml
P0207M-4	Stop Reagent (2X)	5ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
P0207L-1	ADHP Substrate Solution (100X)	2ml
P0207L-2	Stable Peroxide Solution (16X)	13ml
P0207L-3	Enhancer Solution	190ml
P0207L-4	Stop Reagent (2X)	20ml
—	说明书	1份

保存条件：

-20°C避光保存，一年有效。4°C避光保存，一个月有效。

注意事项：

- Stop Reagent (2X)三个月内使用效果最佳，如果要保存更长时间，须-80度保存，一年有效。
- 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。
- 各溶液中均含有空气敏感的组分，暴露时间过长容易失效，使用后，请盖紧瓶盖。
- 各溶液中均含有光敏组分，使用时注意避光，特别是配制好的ADHP工作液，使用前和使用中需严格避光。
- 可根据需要对ADHP Substrate Solution (100X)进行分装后保存。
- 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。
- 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 Reagent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。
- 在HRP浓度过高或反应时间过长时，生成的荧光产物试卤灵可能会因浓度过高而产生自猝灭现象(如图3A中0.2%浓度所示)。可通过调整HRP标记的检测抗体或Streptavidin浓度来优化检测范围。
- 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。

a. 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)。

b. 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92.75µl Enhancer Solution、1µl ADHP Substrate Solution (100X)和6.25µl Stable Peroxide Solution (16X)，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
Enhancer Solution	92.75µl	927.5µl	4637.5µl	9275µl
ADHP Substrate Solution (100X)	1µl	10µl	50µl	100µl

Stable Peroxide Solution (16X)	6.25µl	62.5µl	312.5µl	625µl
ADHP Working Solution	100µl	1ml	5ml	10ml

注: ADHP Working Solution配制后需尽快使用(如15分钟内), 配制时和配制完成后请注意严格避光。

- c. 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。
 - d. 每个孔中加入100µl ADHP Working Solution, 根据反应需要室温严格避光孵育5-10分钟或更长时间。因本试剂盒反应速度较快, 也可根据实际情况缩短孵育时间, 以免高浓度样品信号过快达到饱和。
 - e. (可选)根据实验需要考虑加入终止液: 按照每个反应孔需20µl的Stop Solution, 将Stop Reagent (2X)按1:1 (v/v)用超纯水稀释, 即每个反应孔需要混合10µl Stop Reagent和10µl水, 配制成Stop Solution。使用时每个反应孔中加入20µl Stop Solution, 稍作混匀即可进行检测, 无需孵育。可以先进行1f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20µl 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: Stop Reagent (2X)和配制后的Stop Solution均呈浅黄色, 其不会对ADHP的荧光产物试卤灵的检测产生光学干扰。
 - 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10-20µl样品。
 - b. 按步骤1b配制ADHP Working Solution。
 - c. 每个孔中加入100µl ADHP Working Solution, 室温避光孵育5-10分钟或更长时间。因本试剂盒反应速度较快, 也可根据实际情况缩短孵育时间, 以免高浓度样品信号过快达到饱和。
 - d. (可选)根据实验需要考虑加入终止液: 按照每个反应孔需20µl的Stop Solution, 将Stop Reagent (2X)按1:1(v/v)用水稀释, 即每个反应孔需要混合10µl Stop Reagent和10µl水, 配制成Stop Solution。使用时每个反应孔中加入20µl Stop Solution, 稍作混匀即可进行检测, 无需孵育。可以先进行2e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20µl 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: Stop Reagent (2X)和配制后的Stop Solution均为浅黄色液体, 不会对ADHP的荧光产物试卤灵的检测产生光学干扰。
 - 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标记的抗体或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°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	
检测信号低	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
	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
P0207S	SignalUp™ ELISA特超敏检测试剂盒(HRP荧光法)	100次
P0207M	SignalUp™ ELISA特超敏检测试剂盒(HRP荧光法)	500次
P0207L	SignalUp™ ELISA特超敏检测试剂盒(HRP荧光法)	2000次

Version 2023.08.01