

## SignalUp™ ELISA特超敏检测试剂盒(HRP荧光法)

产品编号	产品名称	包装
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, 强烈推荐使用该试剂盒。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。

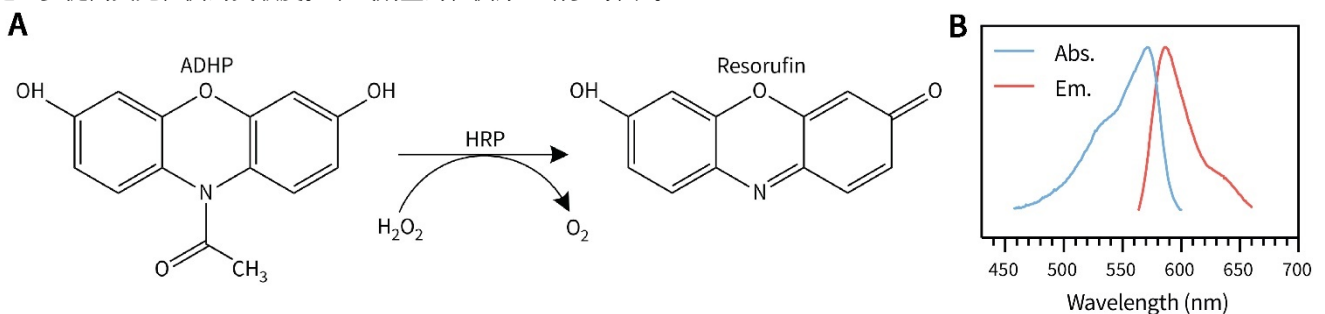


图1. 碧云天SignalUp™ ELISA特超敏检测试剂盒(HRP荧光法)的检测原理图。图A为ADHP在HRP催化下生成试卤灵的反应。图B为试卤灵在pH为7.4的缓冲溶液中的吸收和发射光谱。Abs.: Absorption, 吸收; Em.: Emission, 发射。

- **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。

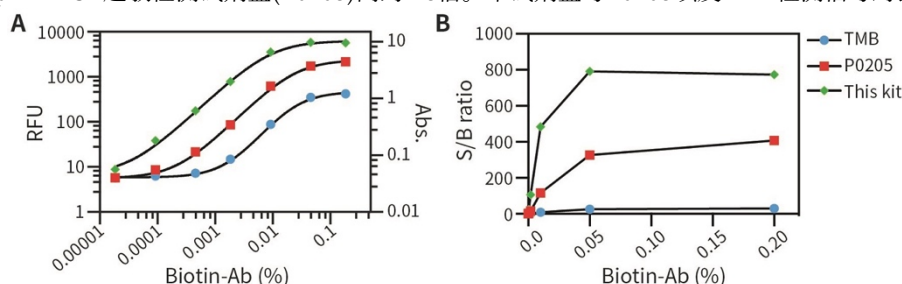


图2. 碧云天SignalUp™ ELISA特超敏检测试剂盒(HRP荧光法)与碧云天同类产品SignalUp™ ELISA超敏检测试剂盒以及TMB法对96孔板中包被的不同浓度生物素标记二抗(Biotin-Ab)检测效果对比图。生物素标记山羊抗小鼠IgG(H+L) (A0286)稀释至图中所示各浓度, 对96孔板进行包被; 辣根过氧化物酶标记Streptavidin (A0303)用PBS按1:10,000稀释后加入各反应孔中室温孵育30分钟; 洗板后, 分别加入100μl ADHP工作液(本试剂盒或P0205)或TMB显色液(ELISA HRP显色用) (P0209), 室温避光孵育10分钟。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。

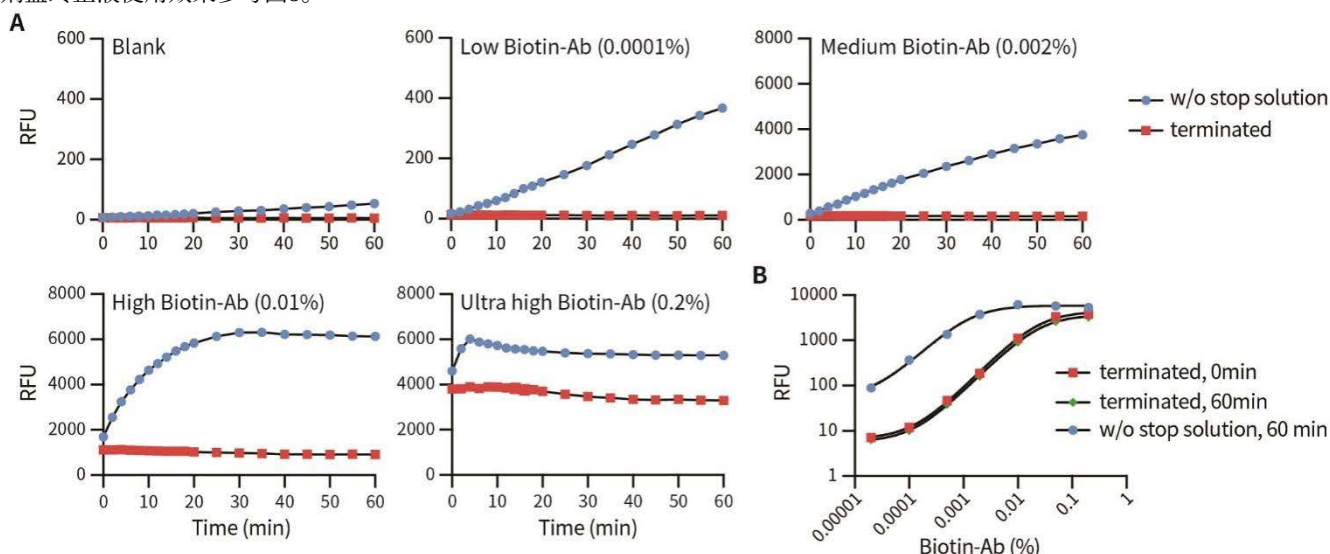


图3. 碧云天SignalUp™ ELISA特超敏检测试剂盒(HRP荧光法)反应终止液的使用效果图。在低(0.0001%)、中(0.002%)、高(0.01%)、极高(0.2%)四种浓度的生物素标记山羊抗小鼠IgG(H+L) (A0286), 即图A中的low/medium/high/ultra-high Biotin-Ab, 包被的孔中加入1:10,000稀释的辣根过氧化物酶标记Streptavidin (A0303), 室温孵育30分钟; 洗板后, 分别加入100μl ADHP工作液, 室温避光孵育10分钟后, 进行同一浓度的生物素包被孔终止反应的平行实验: 在反应孔中加入20μl反应终止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

- 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
<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15分钟内)，配制时和配制完成后请注意严格避光。

- 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。
- (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。

- 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。也可根据需要设置激发波长在530-575nm，发射波长在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)。

- 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
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:

- Hosoda H, Takasaki W, Oe T, Tsukamoto R, Nambara T. Chem Pharm Bull (Tokyo). 1986. 34(10):4177-4182.
- Meng Y, High K, Antonello J, Washabaugh MW, Zhao Q. Anal Biochem. 2005. 345(2):227-236.
- 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