

人 CpG 寡脱氧核苷酸 ELISA 试剂盒
Human CpG Oligodeoxynucleotides(CpG-ODN)
ELISA Kit

Catalog No.: MA39911

96 Tests

该试剂盒仅供科研使用。

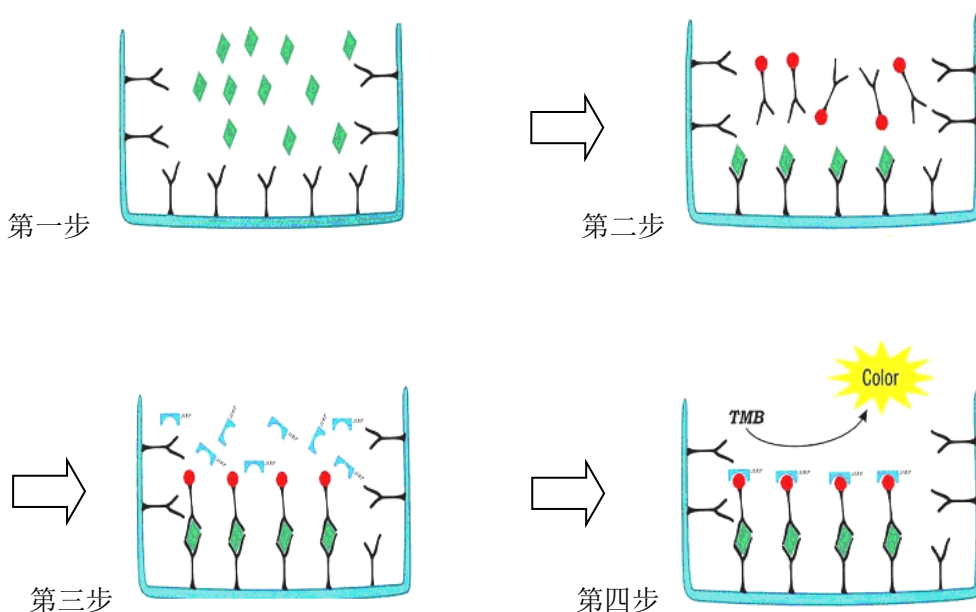
For Research Use Only, Not for In Vitro Diagnostic Use.

该人 CpG 寡脱氧核苷酸 (CpG-ODN) 试剂盒适用于体外定量检测人血清、血浆、细胞培养上清液等样品中的 CpG 寡脱氧核苷酸 (CpG-ODN) 浓度。

检测原理

该试剂盒是典型的夹心法酶联免疫吸附测定试剂盒 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA), 采用双抗体夹心 ELISA 法。酶标板预先包被的抗体为人 CpG 寡脱氧核苷酸 (CpG-ODN) 单克隆抗体, 检测相抗体为多克隆抗体, 经生物素 (biotin) 标记。样品和生物素标记抗体先后加入酶标板孔反应后, 经 PBS 或 TBS 洗涤, 随后加入过氧化物酶标记的亲合素反应; 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待测因子呈正相关。

原理示意图



试剂盒组分

名称	规格	名称	规格
酶标板	1	标准品稀释液	1 x 15 ml
标准品	2 支	样品稀释液	1 x 15 ml
浓缩生物素化抗体	1 x 120 μ l	浓缩洗涤液(25 $\times$)	1 x 20 ml
浓缩酶结合物(ABC)	1 x 120 μ l	显色剂 A	1 x 10 ml
酶结合物(ABC)稀释液	1 x 12 ml	显色剂 B	1 x 1.5 ml
抗体稀释液	1 x 12 ml	终止液	1 x 10 ml

备注 标准品：冷冻干燥；显色剂 A：避光。

需自备物品

1. 酶标仪(450nm 检测波长滤光片，570nm 或 630nm 校正波长滤光片)；
2. 洗板机（可调注液量，保证每孔 350 μ l 洗液而不溢出）；
3. 高精度单道加液器（量程为 0.5-10 μ l, 2-20 μ l,20-200 μ l,200-1000 μ l）；
4. 高精度多道加液器（8 道或 12 道，量程为 50-300 μ l）；
5. 37 $^{\circ}$ C 恒温箱；
6. 低温离心机；
7. 纯净水或蒸馏水。

标本收集注意事项

1. 收集血液的试管应为一次性的无热原、无内毒素试管；
2. 血清和血浆避免使用溶血、高血脂标本；
3. 标本应清澈透明，悬浮物应离心去除；
4. 标本收集后若不及时检测，需按一次使用量分装，冻存于-20 $^{\circ}$ C，-80 $^{\circ}$ C 冰箱内，避免反复冻融；
5. 可根据标本的实际情况，做适当倍数稀释(建议做预实验，以确定稀释倍数)；
6. 收集标本，尽量做到双份的用量，避免一次实验失败，重复实验时标本缺失，从而耽误实验进程；
7. 收集标本时，应该做好防护措施（比如戴手套，口罩，护目镜等），因为所有标本都具有一定的潜在危险性；
8. 样本处理应该在生物安全柜里面，并且正确使用生物安全柜。

标本处理

1. 血清：将采集的全血静置冰箱 4℃过夜，然后 1000-3000rpm 离心 10 分钟，取上清立即测试，暂时不测可以放入-20℃（1-3 个月）或-80℃（3-6 个月）保存；
2. 血浆：用 EDTA，枸橼酸钠，肝素等作为抗凝剂，加入血液混匀后，1000-3000rpm 离心 10 分钟，取上清立即测试，暂时不测可以放入-20℃（1-3 个月）或-80℃（3-6 个月）保存；
3. 组织匀浆：切取组织块，0.01M PBS 中过洗一次；按照 1G 组织加入 5-10ml 组织蛋白萃取试剂的比例，在冰水中匀浆。匀浆完成后，5000-10000rpm 离心 10 分钟，取上清立即测试，暂时不测可以放入-20℃（1-3 个月）或-80℃（3-6 个月）保存；
4. 细胞培养上清：1000-3000rpm 离心 10 分钟，取上清立即测试，暂时不测可以放入-20℃（1-3 个月）或-80℃（3-6 个月）保存；
5. 尿液，腹水，脑脊液等：1000-3000rpm 离心 10 分钟，取上清立即测试，暂时不测可以放入-20℃（1-3 个月）或-80℃（3-6 个月）保存；

注 样品稀释的一般原则

用户须查阅相关文献了解标本内待测因子的含量，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。样品的稀释应有详细记录。

注意事项

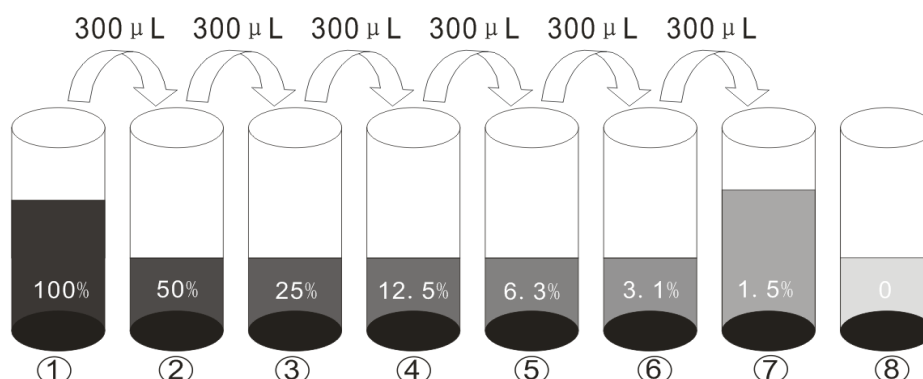
1. 试剂盒使用前请保存在 2-8℃。除复溶后的标准品，其他成分不可冻结；
2. 浓缩生物素化抗体、浓缩酶结合物体积小，运输中颠簸和可能的倒置，会使液体沾到管壁或瓶盖。因此使用前请用手甩几下或 1000rpm 离心 1 分钟，以使附着管壁或瓶盖的液体沉积到管底；
3. 浓洗涤液可能会有结晶析出，稀释时可在水浴中加温助溶，使结晶完全溶解后再配制洗涤液；
4. 实验过程中，冻干标准品为一次性使用，不得分装。因其浓度较低，溶解两小时候后，会迅速失活；
5. 操作严格按照说明书进行，本试剂不同批号组分不得混用；
6. 配制试剂时，要用旋涡混合仪混匀。加入孔内的试剂，充分混匀对测试结果尤为重要，最好使用微量振荡器(使用最低频率)，如无微量振荡器，可在反应前手工轻轻晃动酶标板 1 分钟，例如做圆周动作，使加入孔中的反应液混匀；

7. 实验用酶标仪应严格按使用说明书规范操作，并在使用前充分预热；
8. ELISA 实验中标准品和样本检测时建议作复孔；
9. 应将未用的酶标板放回原铝箔袋中，置 2-8℃保存；
10. 显色液对光敏感，因此要避免直接暴露在光线下；
11. 超过使用有效日期的试剂盒不能应用于实验中；
12. 试验结果判定必须以酶标仪读数为准，使用双波长检测时，波长应该设置为 450nm 和 630nm；
13. 所有样品，洗涤液和各种废弃物都应按生物废弃物处理。终止液为 2M 硫酸，使用时必须注意安全；
14. 各步骤加样均应使用加样器，并经常校准其准确性，以避免试验误差。一次加样时间最好控制在 5 分钟内，如标本数量多，推荐使用排枪加样；
15. 每次试验测定的同时做标准曲线，最好做复孔。如标本中待测物质含量过高（样本 OD 值大于标准品孔最高浓度的 OD 值），请先用样品稀释液稀释一定倍数（n 倍）后再测定，计算时请最后乘以总稀释倍数（ $\times n$ ）；
16. 不能检测含 NaN₃ 的样品，因 NaN₃ 抑制辣根过氧化物酶的（HRP）活性；
17. 以洗板机洗板时，每孔注液量不应少于 350 μ l，注意检查加样头是否堵塞。手工洗板时，用带纸屑的吸水材料应慎重，防止外源性过氧化物酶类似物或氧化还原物与显色剂发生反应；
18. 用终止液终止反应后，请于 10 分钟内读取 OD 值；
19. 进行复孔实验时，结果计算一定要求平均值；
20. 标本溶血可能会有假阳性结果，因此溶血标本不宜进行此项检测；
21. 实验时，应该将加过样品的板条放于密闭盒内，并保持湿度约 60%左右；
22. 为保证恒温箱内的温度为 37℃，恒温箱的温度要经常校准。以确保实验温度保持恒定；

准备工作

1. 请提前 20 分钟从冰箱中取出试剂盒，平衡至室温后方可进行试验；
2. 将浓缩洗涤液用双蒸水稀释(1:25)。未用完的放回；
3. 标准品：加入标准品稀释液 1.0ml 至冻干标准品中，静置 10 分钟，待其充分溶解后，轻轻混匀(浓度为 50 ng/ml)，之后在管身标注①，然后根据需要进行稀释（建议标准曲线使用以下浓度：50、25、12.5、6.25、3.12、1.56、0.78 ng/ml）。注意：务必要保证冻干标准品彻底溶解和混匀。
4. 标准品稀释方法图例：取 7 支洁净的试剂管，分别标注②,③,④,⑤,⑥,⑦,⑧。每管加入 300 μ l 标准品稀释液。从第①管内取出 300 μ l 加入到第②管，混匀后，

再从第②管取出 300 μ l 加入到第③管，以此类推至第⑦管。第⑧管为标准品稀释液，作为阴性对照使用。



备注 复溶标准品原液 (50 ng/ml) 请废弃，不可重复使用；

5. 生物素化抗体工作液：按当次试验所需用量，用抗体稀释液稀释浓缩生物素化抗体(1:100)，配置成生物素化抗体工作液。使用前 30 分钟准备，仅供当日使用；

6. 酶结合物工作液：按当次试验所需要用量，用酶结合物稀释液稀释浓缩酶结合物(1:100)，配置成酶结合物工作液。使用前 30 分钟准备，仅供当日使用；

7. TMB 显色工作液：在使用之前 30 分钟，按 TMB 显色液 A x 9 份加 TMB 显色液 B x 1 份 (9 : 1) 的比例配制 TMB 显色工作液。

洗涤方法

1. 自动洗板机：要求注入的洗涤液为 350 μ l，注入与吸出间隔 20 - 30 秒。确保机器运用熟练后，再投入实验中使用；

2. 手工洗板：每孔加洗涤液 350 μ l，静置 30 秒后甩尽孔内液体，在吸水纸上拍干。手工洗板时，注意加入洗液的过程中，不要造成孔间污染，从而出现跳孔的现象。

操作步骤

1. 从已平衡至室温的密封袋中取出试验所需板条，未用的板条和干燥剂请放回铝箔袋内封存于 2-8 $^{\circ}$ C；

2. 预留空白孔（若使用双波长读板，空白孔可以不设）；

3. 分别将标本或不同浓度的标准品 (0 ng/mL 孔加标准品稀释液) 加入相应孔中(100 μ l/孔)， 37 $^{\circ}$ C孵箱孵育 90 分钟；

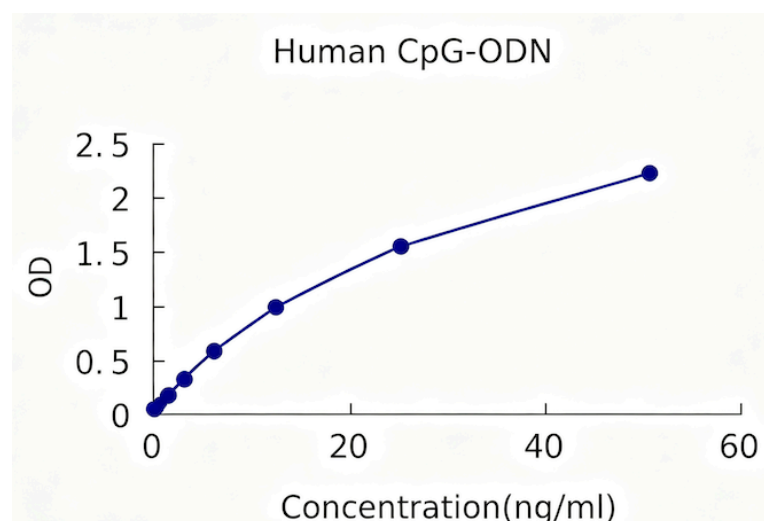
4. 提前 30 分钟制备生物素化抗体工作液；

5. 洗板 2 次；
6. 加入生物素化抗体工作液(100 μ l/孔)，37 $^{\circ}$ C 孵箱孵育 60 分钟；
7. 提前 30 分钟制备酶结合物工作液。室温避光放置；
8. 洗板 3 次；
9. 除空白孔外，加入酶结合物工作液(100 μ l/孔)。37 $^{\circ}$ C 孵箱，避光孵育 30 分钟；
10. 洗板 5 次；
11. 加入 TMB 显色工作液（包括空白孔）100 μ l/孔，37 $^{\circ}$ C 孵箱，避光孵育，当标准曲线高浓度的颜色较深，有明显的颜色梯度的时候，即可终止。试验显色反应请勿超过 30 分钟；
12. 加入终止液（包括空白孔）100 μ l/孔，混匀后即刻测量 OD (450nm) 值(10 分钟内)。

结果判断

1. 每个标准品和标本的 OD 值应减去零孔的 OD 值（若不减零孔值，标准曲线的零孔应相交于 Y 轴）；
2. 手工绘制标准曲线：以标准品浓度作横坐标，OD 值作纵坐标，以平滑线连接各标准品的坐标点。通过标本的 OD 值可在标准曲线上查出其浓度。推荐使用专业制作曲线软件进行分析，如 curve expert 1.3 进行结果计算；
3. 若标本 OD 值高于标准曲线上限，应适当稀释后重测，计算浓度时应乘以稀释倍数。

参考曲线



注意：本图仅供参考，应以同次试验标准品所绘标准曲线来计算标本含量。

操作程序总结

准备试剂，样品和标准品



加入准备好的样品和标准品，37°C反应 90 分钟



洗板 2 次，加入生物素化抗体工作液，37°C反应 60 分钟



洗板 3 次，加入 ABC 工作液，37°C反应 30 分钟



洗板 5 次，加入 TMB 显色液，37°C反应



加入 TMB 终止液



10 分钟之内酶标仪测 OD 值



计算标本待测因子含量

试剂盒参数

检测范围：50 ng/ml-0.78 ng/ml；

灵敏度：最小可测值<0.1 ng/ml；

特异性：经检测与其它相似物质无明显交叉反应；

批内差：CV < 8%

批间差：CV < 10%

回收率：80-120%

储存条件：2-8°C，6 个月。