

Competitive ELISA 检测实验SOP

1.主要仪器

表1 实验所用主要仪器

所用仪器	仪器型号	公司
洗板机	HW2096	Highcreation
电热恒温培养箱	DND-9082	精宏
酶标仪	Multiskan-FC	Thermo

2.主要试剂

表2 主要试剂及其生产公司

试剂名称	货号	生产公司
CBS	/	Atagenix
脱脂奶粉	/	伊利

3.实验内容

3.1 抗体间接ELISA检测，确定竞争ELISA中抗体的使用浓度

- (1) 抗原包被，BSA偶联小分子4 μ g/ml，2 μ g/ml，1 μ g/ml, 0.5 μ g/ml，100 μ l/well，37 $^{\circ}$ C，120 min。
- (2) 封闭，3% BSA-PBS，300 μ l/well，37 $^{\circ}$ C，90min。
- (3) 洗板，PBST，300 μ l/well，2 times。
- (4) 一抗稀释梯度1 μ g/ml-0.015625 μ g/ml，100 μ l/well，37 $^{\circ}$ C，1H。
- (5) 洗板，PBST，300 μ l/well，3 times。
- (6) 二抗，100 μ l/well，37 $^{\circ}$ C，30min，Peroxidase-conjugated Affinipure Goat Anti-Mouse IgG Fc，1:10000。
- (7) 洗板，PBST，300 μ l/well，3 times。
- (8) TMB 显色，100 μ l/well，37 $^{\circ}$ C，10min。
- (9) 终止：2M HCl，50 μ l/well。
- (10) 读数：OD₄₅₀-OD₆₃₀。

3.2 竞争ELISA确定小分子最佳稀释梯度

- (1) 抗原包被，BSA偶联小分子4 μ g/ml，2 μ g/ml，1 μ g/ml 0.5 μ g/ml，100 μ l/well，37 $^{\circ}$ C，120min。
- (2) 封闭，3% BSA-PBS，300 μ l/well，37 $^{\circ}$ C，90min。

- (3) 洗板，PBST，300 μ l/well，2 times。
- (4) 小分子从1 μ g/ml-0.015625 μ g/ml梯度稀释，50 μ l/well +抗体选择最佳稀释浓度使用50 μ l/well，共100 μ l/well，37 $^{\circ}$ C，30min。
- (5) 将第4步中的100 μ l样品加到第三步准备好的ELISA板中，37 $^{\circ}$ C，60min。
- (6) 洗板，PBST，300 μ l/well，3 times。
- (7) 二抗，100 μ l/well，37 $^{\circ}$ C，30 min，Peroxidase-conjugated Affinipure Goat Anti-Mouse IgG Fc，1: 10000。
- (8) 洗板，PBST，300 μ l/well，3 times。
- (9) TMB 显色，100 μ l/well，37 $^{\circ}$ C，10 min。
- (10) 终止：2M HCl，50 μ l/well。
- (11) 读数：OD₄₅₀-OD₆₃₀。

3.3 选择最佳的抗体和小分子使用浓度，最后确认最佳包被浓度

- (1) 抗原包被，BSA偶联小分子4 μ g/ml，2 μ g/ml，1 μ g/ml 0.5 μ g/ml，100 μ l/well，37 $^{\circ}$ C，120 min。
- (2) 封闭，3%BSA-PBS，300 μ l/well，37 $^{\circ}$ C，90min。
- (3) 洗板，PBST，300 μ l/well，2 times。
- (4) 小分子选择最佳梯度稀释50 μ l/well +抗体选择最佳稀释浓度使用50 μ l/well，共100 μ l/well，37 $^{\circ}$ C，30min。
- (5) 将第4步中的100 μ l样品加到第三步准备好的ELISA板中，37 $^{\circ}$ C，60min。
- (6) 洗板，PBST，300 μ l/well，3 times。
- (7) 二抗，100 μ l/well，37 $^{\circ}$ C，30 min，Peroxidase-conjugated Affinipure Goat Anti-Mouse IgG Fc，1:10000。
- (8) 洗板，PBST，300 μ l/well，3times。
- (9) TMB 显色，100 μ l/well，37 $^{\circ}$ C，10min。
- (10) 终止：2M HCl，50 μ l/well。
- (11) 读数：OD₄₅₀-OD₆₃₀。

The end



AtaGenix
From Gene to Antibody

• **一站式蛋白抗体发现服务**
重组蛋白 · 抗体 · 噬菌体文库 · 诊断原料

—— 武汉国家生物产业基地 · 光谷抗体发现与筛选公共服务平台 ——