

His 标签 ELISA 检测试剂盒

货号： L00436 版本号： 05132014



操作者在使用本产品之前必须仔细阅读操作指南

仅供科研使用，不能用于临床诊断

I. 产品介绍

His 标签由连续的组氨酸(Histidine, His)残基组成，主要有三种形式：HHHHHH (6 × His)，HHHHH (5 × His)，HHHH (4 × His)。因分子较小、对蛋白折叠的干扰较低以及免疫原性较弱等特点，His 标签已成为重组蛋白表达中应用最广泛的标签，编码 His 标签的基因序列一般构建在表达载体的 N 端或 C 端。因 His 标签对 Ni²⁺亲和力较高，所以通过 Ni²⁺亲和和层析方法可以很容易的从细菌、酵母、哺乳动物细胞等表达系统中纯化出 His 标签蛋白。His 标签抗体作为识别 His 标签蛋白的有效工具，常应用于免疫印迹、免疫沉淀、流式细胞术等多种检测方法中。

金斯瑞 His 标签酶联免疫吸附检测试剂盒能快速、高通量检测 His 标签蛋白，全程只需 1.5 小时，其应用主要有以下几方面：

- ▶ 快速检测样品中 His 标签蛋白
- ▶ 通过监测 His 标签蛋白水平达到优化蛋白表达的目的
- ▶ 高通量筛选稳定表达 His 标签蛋白的细胞系

本试剂盒采用竞争 ELISA 方法，将 His 标签蛋白（分子量 12.7 kDa）包被于 96 孔（8 孔×12 条）微孔板中，向微孔板中加入 His 标签蛋白标准品（分子量 11.3 kDa）或待测样品，同时加入 His 标签单克隆抗体，此时 His 标签蛋白标准品或待测样品将与微孔板上的 His 标签蛋白竞争结合 His 标签抗体。最后加入可结合 His 标签抗体的 HRP 偶联羊抗小鼠 IgG，经过洗涤后加入 TMB 底物显色，TMB 在 HRP 酶的催化下转化成蓝色并在酸的作用下最终转换成黄色，颜色的深浅与样品中的 His 标签蛋白的量呈负相关。

II. 主要特点

主要特征	参数
灵敏度	1 ng/ml
检测范围	1 ng/ml-729ng/ml
可测样品类型	N-端/C-端/中端 His 标签蛋白 4×His/ 5×His/ 6×His 标签蛋白 哺乳动物细胞、酵母、细菌等裂解液或细胞上清
便捷性	提供检测所需全部试剂 全部检测仅需 1.5 小时
试剂相容性	对多种干扰试剂具有较高的耐受度（见表 3）

III. 试剂盒组成

本试剂盒提供 His 标签蛋白检测所需的全部试剂，试剂的量足够一块板的检测。

- His 标签蛋白标准品储存液可作为备选用来配制标准曲线。

编号	组份	数量
436-80	His标签蛋白微孔板	1 块 (8 孔 × 12 条)
436-20	His标签单克隆抗体	6 ml
436-30	羊抗小鼠IgG-HRP	12 ml
436-11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18	His 标签蛋白标准品 (0, 1, 3, 9, 27, 81, 243, 729 ng/ml)	2 ml
436-60	稀释液	60 ml
436-70	20 ×洗液	40 ml
436-40	TMB 底物	12 ml
436-50	终止液	6 ml
436-10	His标签蛋白标准品贮存液	500 μl
N/A	盖板膜	2 张
N/A	产品说明书	1 份

IV. 贮存

本试剂盒未开封状态可于 2-8 °C 条件下稳定保存 12 个月，开封后 2-8 °C 条件下可稳定保存 1 个月，请勿冻存。

V. 所需物品

- 以下为实验需要但试剂盒未提供的材料和仪器：

检测 450 nm 吸光度的酶标仪

全自动洗板机

去离子水或双蒸馏水

量筒

1000 ml 烧杯

不同规格的 EP 管

不同规格的精密微量移液器、多通道微量移液器及吸头

平板纸

计时器

-20°C 冰箱、4°C 恒温箱、25°C 恒温箱（如果室温达不到 20-25°C，建议放 25°C 恒温箱）、37°C 恒温箱

离心机

VI. 实验步骤

- 实验开始前，请将所有试剂平衡至室温。

i. 样品准备

在准备样品时需要注意以下几点：

样品中有些试剂可能会对检测造成干扰，检测之前请仔细阅读试剂兼容性部分了解体系对于干扰试剂的最小耐受浓度；

检测样品的pH应为中性，样品中不含有颗粒物，若含有不溶物质可通过离心或过滤去除。

ii. 试剂准备
1×洗液

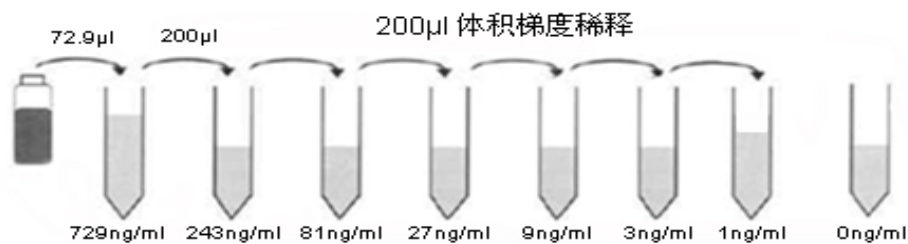
用去离子水或双蒸水按1:20稀释20×洗液。例如：取40 ml的20×洗液加入760 ml的去离子水中配成800 ml洗液，2-8℃条件下保存。

注：如果在20×洗液中出现结晶，在50℃的水浴锅中温浴，直至结晶完全消失。

His 标签蛋白标准品溶液

参照下表稀释步骤配制出标准曲线729 ng/ml、243 ng/ml、81 ng/ml、27 ng/ml、9 ng/ml、3 ng/ml、1 ng/ml和0 ng/ml。

移取	加入至	配成 His 标签蛋白浓度
72.9 μl 的 His 标准品贮存液(10 μg/ml)	927.1 μl 的稀释液，混匀	729 ng/ml
200 μl 的 729 ng/ml 标准	400 μl 的稀释液，混匀	243 ng/ml
200 μl 的 243 ng/ml 标准	400 μl 的稀释液，混匀	81 ng/ml
200 μl 的 81 ng/ml 标准	400 μl 的稀释液，混匀	27 ng/ml
200 μl 的 27 ng/ml 标准	400 μl 的稀释液，混匀	9 ng/ml
200 μl 的 9 ng/ml 标准	400 μl 的稀释液，混匀	3 ng/ml
200 μl 的 3 ng/ml 标准	400 μl 的稀释液，混匀	1 ng/ml
400 μl 的样品稀释液	空管	0 ng/ml


iii. 捕获板准备

- 建议检测时标准品和检测样品按复孔操作。
- 计算实验所需的板条数量，将不需要的板条拆卸下来，放回铝箔袋中，封好后 2-8℃ 保存。
- 确保板条紧密固定于板架上。

iv. 检测过程

- 正式检测前须进行预实验以确定样品的稀释条件，请用稀释液稀释样品。
- 实验反应温度不得高于 25℃。

标准品/待测样品/抗体孵育

1. 将配制好的 His 标准曲线或待测样品各 50 μ l 加入对应板孔中。
2. 将稀释后的 His 抗体 50 μ l 加入所有孔中。
3. 用盖板膜封板，室温(20-25℃)孵育 30 分钟。
4. 洗板：移去盖板膜，弃去板孔中液体，每孔加入 1 \times 洗液 260 μ l，浸泡 30 秒，弃去洗液，重复洗涤 4 次。

注：本步骤可以在洗板机上完成。

5. 在平板纸上拍板，彻底去除板孔中的残留液体。

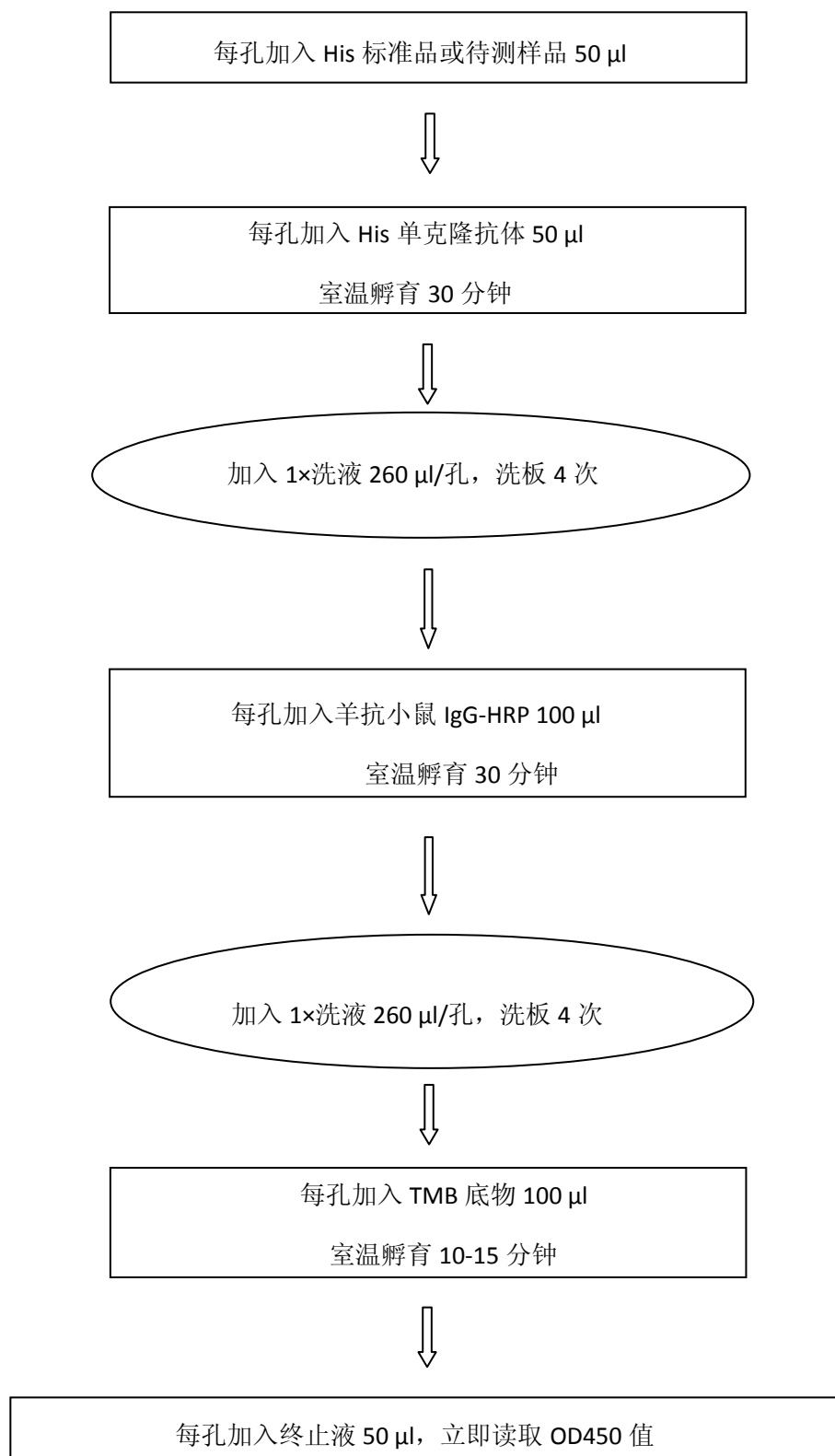
羊抗小鼠 IgG-HRP 孵育

6. 每孔加入羊抗小鼠 IgG-HRP 100 μ l。
7. 用盖板膜封板，室温(20-25℃)孵育 30 分钟。
8. 洗板，同第 4 步。
9. 在平板纸上拍板，彻底去除板孔中的残留液体。

底物反应和吸光值检测

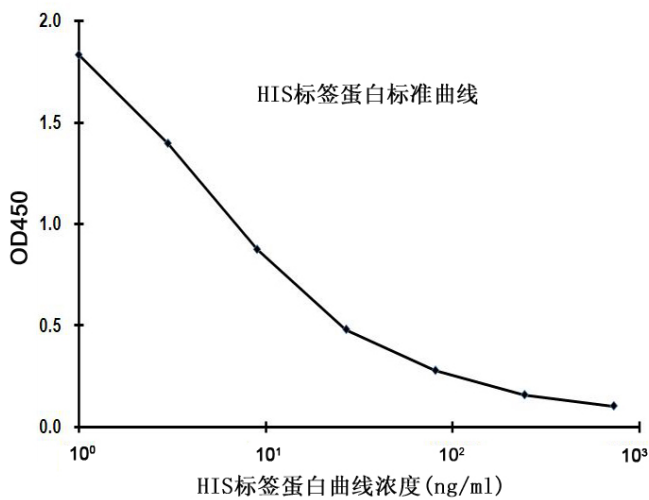
10. 每孔加入 TMB 底物溶液 100 μ l。
11. 用盖板膜封板，室温(20-25℃)反应 10-15 分钟（从加入显色液至第一孔时开始计时）。
12. 移去盖板膜，每孔加入终止液 50 μ l。
13. 终止后立即用酶标仪在 450 nm 处测量吸光值。
14. 以 His 标准蛋白对应的 OD 值为纵坐标，以 His 标准蛋白浓度为横坐标，绘制标准曲线。
15. 根据标准曲线计算出样品中 His 标签蛋白的含量。

VII. 检测流程图



VIII. 参考曲线

以下曲线仅作为示例展示，每一次检测都必须制备标准曲线。



His 蛋白标准品浓度		OD450		
(ng/ml)	(pmol/ml)	复孔 1	复孔 2	均值
0	0	2.177	2.183	2.180
1	0.088	1.833	1.831	1.832
3	0.265	1.374	1.418	1.396
9	0.796	0.825	0.922	0.874
27	2.389	0.516	0.444	0.480
81	7.168	0.266	0.289	0.278
243	21.504	0.158	0.157	0.158
729	64.513	0.105	0.101	0.103

IX. 试剂相容性

样品中的某些试剂可能会干扰检测结果，常见的洗涤剂 and 变性剂的相容性和干扰情况见下表。

试剂	建议用量
Triton X-100	≤ 1%
Imidazole	≤ 125 mM
Guanidine HCl	≤ 30 mM
Urea	≤ 0.5 M
Deoxycholic Acid	≤ 1%
SDS	≤ 0.07%
EDTA	≤ 10 mM
β-ME	≤ 160 mM
DTT	≤ 20 mM
Tris (pH=7)	≤ 6.5 mM
CHAPS	≤ 5%
Tween-20	≤ 1%
Glycerol	≤ 1%
TBS	Fully compatible
PBS	Fully compatible
RIPA Lysis Buffer	Fully compatible

X. 常见问题

问题	原因	解决方法
重复性差	遗漏加样品步骤	按说明书重新操作
	加样不准	对移液器进行校正, 根据操作指南使用移液器
	板孔内表面被移液器枪头刮伤	在加样和洗板中, 避免接触板孔内表面
	样品中存在颗粒物	检测前通过离心去除颗粒物
标准曲线不好	配制标准品溶液有问题	根据说明书重新配制标准品溶液
	洗板不彻底	使用洗板机洗板时, 要注意洗液的量是否充足, 检测是否有堵孔现象发生
	加样不准	对移液器进行校正, 根据操作指南使用移液器
	误用其它试剂盒中的成分	检查实验中使用的试剂, 重新操作
	操作时, 各个成分没有完全恢复至室温	所有的试剂完全恢复至室温后, 重新操作实验
	孵育温度不当	按说明书重新操作
信号弱/没有信号	遗漏加显色液步骤	按说明书重新操作
	遗漏加抗体步骤或者遗漏加羊抗小鼠 IgG-HRP	按说明书重新操作
	误用其它试剂盒中的成分	不同试剂盒组份不能混用, 重新操作
	显色液被污染	使用新的显色液
	加入孔中的液体体积有误	按说明书重新操作
	孵育温度或时间有误	按说明书重新操作
	没有立即读板	加入终止液后立即读板
本底过深	洗板不彻底	使用洗板机洗板时, 要注意洗液的量是否充足, 检测是否有堵孔现象发生
	显色液被污染	使用新的显色液
	孵育过程中的挥发	在孵育过程中, 使用盖板膜
	孵育温度或时间有误	按说明书重新操作
	显色液没有避光保存	使用新的显色液

XI. 相关产品

- His Tag Antibody, pAb, Rabbit L00411
- Mouse Anti-His mAb MagBeads L00275
- His Tag Antibody Plate L00440
- THE™ His Tag Antibody, mAb, Mouse A00186
- THE™ His Tag Antibody [HRP], mAb, Mouse A00612
- THE™ His Tag Antibody [Biotin], mAb, Mouse A00613
- THE™ His Tag Antibody [FITC], mAb, Mouse A01620

XII. 实验记录

运用如下表格记录实验标准曲线以及样品数据

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

实验记录:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

实验记录:

南京金斯瑞生物科技有限公司

江苏省南京市江宁科学园雍熙路28号, 邮编211100

客服热线: 025-58897288-5810

订购邮箱: product@genscript.com.cn

公司主页: <http://www.genscript.com.cn>