

TC4-SOP 0-2b

ELISA titer test

名稱: _____

MATERIALS:

- **Blocking buffer: Gelatin-NET buffer**
Gelatin (Merck) 5 g ; NaCl (Merck) 17.5 g ; EDTA.2Na (Merck) 3.6 g ; Tween 20 (Merck) 1 mL ; Tris (BDH) 12.1 g , 加熱至 gelatin 溶解, 待冷卻至室溫後, 調 pH 至 8.0 , 再定量至 2 L
- **Coating Buffer - 0.1 M Sodim Carbonate, pH 9.5**
7.13g NaHCO₃, 1.59g Na₂CO₃; q.s. to 1.0 L; pH to 9.5 with 10 N NaOH. Freshly prepare or use within 7 days of preparation, stored at 2-8°C
- **PBST buffer**
PBS buffer 加入 0.05% (v/v) Tween-20
- **一次抗體 (血清或培養上清液)**
- **二次抗體 (HRP-goat-anti-mouse)**
- **TMB 基質液 - Tetramethylbenzidine (TMB) and Hydrogen Peroxide**
KPL SureBlue™ TMB Microwell Peroxidase Substrate (Cat. No. 52-00-00).
BD Pharmingen™ TMB Substrate Reagent Set (Cat. No. 555214).
- **Stop Solution**
TMB – 1 M H₃PO₄ or 2 N H₂SO₄.
- **ELISA plate (NUNC 442404)**
- **十二爪分注器**
- **ELISA 光度計**

METHODS:

- 抗原吸附 (Coating)** : 取以 Coating buffer 稀釋至適量濃度的抗原 (約 1 µg/ml) , 在 ELISA 盤中每槽加入 100 µL , 以透明膠布封住, 防止溶液蒸發。於 37°C 下反應 2 hrs , 或直接 4°C 過夜。
 - 須設計控制組:
 - Blank, BL** : Coating buffer 不含抗原, 可當作 Negative Control
 - Negative Control, NC** : Coating buffer 含抗原, 不加一抗
 - Positive Control, PC** : Coating buffer 含抗原, 加已知有效價之一抗
 - Strong Positive Control, SPC** : Coating buffer 含鼠血清 (IgG)
- 填塞 (Blocking)** : 吸附反應後吸去抗原, 以 PBST 洗三次。每槽加入 Gelatin-NET 液 200 µL , 透明膠布封住後, 置 37°C 下反應 1 hr 或 4°C 過夜後洗去, 再以 PBST 洗過 2 次。可密封後置於 4°C 備用。
- 抗原抗體反應** : 一次抗體以 Gelatin-NET 稀釋至適當濃度 (若一抗為血清稀釋 1/2000~1/256000 , 若為培養上清液則可用原液或稀釋 1/2~1/5) , 每槽加入 100 µL , 以透明膠布封住, 於 37°C 下反應 1 hr 或室溫反應 2 hrs 。反應後吸去抗體, 以 PBST 洗 3 次。
- 二次抗體反應** : 二次抗體以 Gelatin-NET 稀釋至適當倍數 (5000X) 後, 每槽加入 100 µL , 以透明膠布封住後, 於 37°C 下反應 1 hr 。反應後小心吸去二次抗體溶液, 以 PBST 洗 7 次。
- 酵素呈色反應** : 每槽加入 50 或 100 µL TMB 基質液呈色, 以十二爪分注器快速添加完成, 室溫下避光反應 10~20 分鐘後每槽加入 50 µL Stop Solution 。
- 讀取吸光值** : 加入 Stop Solution 後盡快讀取 450 nm 吸光值 (或 OD450 – OD570 吸光值) 。

Note:

日期	操作者	QC