

## 用途

该试剂盒用于体外定量检测血清、血浆或其他相关生物液体中浓度。

## 检测原理

本试剂盒采用双抗体夹心ELISA法。用抗体包被于酶标板上，实验时样品或标准品中的抗原会与包被抗体结合，游离的成分被洗去。依次加入生物素化的抗体和辣根过氧化物酶标记的亲合素。抗体与结合在包被抗体上的抗原结合、生物素与亲合素特异性结合而形成免疫复合物，游离的成分被洗去。加入显色底物(TMB)，TMB在辣根过氧化物酶的催化下呈现蓝色，加终止液后变成黄色。用酶标仪在450nm波长处测OD值，抗原浓度与OD450值之间呈正比，通过绘制标准曲线计算出样品中指标的浓度。

|      |                           |
|------|---------------------------|
| 反应类型 | 夹心法                       |
| 规格   | 96T                       |
| 反应时间 | 4.5h                      |
| 反应性  | 通用                        |
| 检测方法 | Colormetric               |
| 灵敏度  | 检测下线除以10                  |
| 样本体积 | 100μL                     |
| 样本类型 | 血清、血浆或其他相关生物液体            |
| 特异性  | 可检测样本中的指标,且与其它相关蛋白无明显交叉反应 |
| 重复性  | 板内, 板间变异系数均<10%           |

## 样品活化方法

生物样品中的通常以无活性的形式存在，在检测指标活性前必须进行活化处理。

活化方法如下：

**血清、血浆：**280 μL标准品&样品稀释液中加入40 μL样品，混匀，加入40 μL活化试剂1，室温孵育10分钟。再加入40 μL活化试剂2，混匀后立即检测。

注意：样品被稀释了**10倍**！

**细胞培养上清：**20 μL标准品&样品稀释液中加入100 μL样品，混匀，加入40 μL活化试剂1，室温孵育10分钟。再加入40 μL活化试剂2，混匀后立即检测。

注意：样品被稀释了**2倍**！

**组织匀浆：**1960 μL标准品&样品稀释液中加入40 μL样品，混匀后检测。

注意：样品被稀释了**50倍**！

## 精密度

板内精密度:低浓度样本,中浓度样本和高浓度样本分别在1块板子上检测20次。板间精密度:低浓度样本,中浓度样本和高浓度样本分别在3块板子上检测20次。

|                                 | 批内变异系数 |      |      | 批间变异系数 |      |      |
|---------------------------------|--------|------|------|--------|------|------|
| 样本                              | 1      | 2    | 3    | 1      | 2    | 3    |
| 数量                              | 20     | 20   | 20   | 20     | 20   | 20   |
| 平均值<br>(MERGEFIELD 单位<br>ng/mL) | 0.41   | 1.07 | 4.96 | 0.47   | 1.25 | 4.24 |
| 标准差                             | 0.02   | 0.05 | 0.22 | 0.03   | 0.06 | 0.2  |
| 变异系数 (%)                        | 4.88   | 4.67 | 4.43 | 6.38   | 4.8  | 4.72 |

## 回收率

分别往5个不同样本中添加已知浓度的目标蛋白，做回收实验，得出回收率范围和平均回收率。

| 样本类型          | 回收率范围 (%) | 平均回收率 (%) |
|---------------|-----------|-----------|
| 血清(n=5)       | 94-110    | 102       |
| 血浆(EDTA)(n=5) | 90-102    | 96        |
| 细胞上清(n=5)     | 95-106    | 98        |

## 线性

分别往5个样本中添加已知浓度的目标蛋白，做回收实验，得出回收率范围及平均回收率。将5个样本分别稀释2倍，4倍，8倍，16倍做回收实验，得出回收率范围及平均回收率。

|      |              | 血清(n=5) | 血浆(EDTA)<br>(n=5) | 细胞上清(n=5) |
|------|--------------|---------|-------------------|-----------|
| 1:2  | 回收率范围<br>(%) | 99-108  | 95-105            | 92-104    |
|      | 平均回收率<br>(%) | 105     | 102               | 97        |
| 1:4  | 回收率范围<br>(%) | 95-109  | 90-100            | 97-105    |
|      | 平均回收率<br>(%) | 102     | 96                | 100       |
| 1:8  | 回收率范围<br>(%) | 89-103  | 89-104            | 96-108    |
|      | 平均回收率<br>(%) | 97      | 97                | 102       |
| 1:16 | 回收率范围<br>(%) | 88-102  | 98-108            | 92-105    |
|      | 平均回收率<br>(%) | 94      | 104               | 100       |

### 试剂盒组成及保存

未拆封的试剂盒可在4℃保存一周；如果一周以后才使用试剂盒，请拆开试剂盒按照下表中的条件分别保存各组分。

| 试剂盒组成    | 48孔配置    | 96孔配置    |
|----------|----------|----------|
| 说明书      | 1份       | 1份       |
| 封板膜      | 2片       | 2片       |
| 密封袋      | 1个       | 1个       |
| 酶标包被板    | 1×48     | 1×96     |
| 标准品      | 0.3ml×6管 | 0.3ml×6管 |
| 酶标试剂     | 5 ml×1瓶  | 10 ml×1瓶 |
| 样品稀释液    | 3 ml×1瓶  | 6 ml×1瓶  |
| 显色剂A液    | 3 ml×1瓶  | 6 ml×1瓶  |
| 显色剂B液    | 3 ml×1瓶  | 6 ml×1瓶  |
| 终止液      | 3 ml×1瓶  | 6 ml×1瓶  |
| 20×浓缩洗涤液 | 15ml×1瓶  | 25ml×1瓶  |
| 试剂盒组成    | 48孔配置    | 96孔配置    |
| 说明书      | 1份       | 1份       |
| 封板膜      | 2片       | 2片       |
| 密封袋      | 1个       | 1个       |

说明：所有试剂瓶盖须旋紧以防止蒸发和微生物的污染。

试剂体积以实际发货版说明书为准。相关试剂在分装时会比标签上标明的体积稍多一些，请在使用时量取而非直接倒出。

### 操作步骤

1. 标准品的加样：设置标准品孔和样本孔，标准品孔各加不同浓度的标准品50μL；。
2. 加样：分别设空白孔（空白对照孔不加样品及酶标试剂，其余各步操作相同）、待测样品孔。在酶标包被板上待测样品孔中先加样品稀释液40μl，然后再加待测样品10μl（样品最终稀释度为5倍）。加样将样品加于酶标板孔底部，尽量不触及孔壁，轻轻晃动混匀。
3. 加酶：每孔加入酶标试剂100μl，空白孔除外。
4. 温育：用封板膜封板后置37℃温育60分钟。
5. 配液：将20倍浓缩洗涤液用蒸馏水20倍稀释后备用。
6. 洗涤：小心揭掉封板膜，弃去液体，甩干，每孔加满洗涤液，静置30秒后弃去，如此重复5次，拍干。
7. 显色：每孔先加入显色剂A50μl，再加入显色剂B50μl，轻轻震荡混匀，37℃避光显色15分钟。
8. 终止：每孔加终止液50μl，终止反应（此时蓝色立转黄色）。
9. 测定：以空白孔调零，450nm波长依序测量各孔的吸光度（OD值）。测定应在加终止液后15分钟以内进行。

### 试验所需自备物品

1. 酶标仪(450nm波长滤光片)

2. 高精度移液器，EP管及一次性吸头：0.5-10  $\mu\text{L}$ , 2-20  $\mu\text{L}$ , 20-200  $\mu\text{L}$ , 200-1000  $\mu\text{L}$

3. 37°C恒温箱，双蒸水或去离子水

4. 吸水纸

---

[www.affandi-e.com](http://www.affandi-e.com)