

### 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	100 $\mu$ L
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  $\mu$ L标准品&样品稀释液中加入40  $\mu$ L样品，混匀，加入40  $\mu$ L活化试剂1，室温孵育10分钟。再加入40  $\mu$ L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  $\mu$ L标准品&样品稀释液中加入100  $\mu$ L样品，混匀，加入40  $\mu$ L活化试剂1，室温孵育10分钟。再加入40  $\mu$ L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  $\mu$ L标准品&样品稀释液中加入40  $\mu$ L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		
	1	2	3	1	2	3
样本						
数量	20	20	20	20	20	20
平均值 (MERGEFIELD 单位 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) (n=5)	细胞上清(n=5)
1:2	回收率范围 (%)	99-108	95-105	92-104
	平均回收率 (%)	105	102	97
1:4	回收率范围 (%)	95-109	90-100	97-105
	平均回收率 (%)	102	96	100
1:8	回收率范围 (%)	89-103	89-104	96-108
	平均回收率 (%)	97	97	102
1:16	回收率范围 (%)	88-102	98-108	92-105
	平均回收率 (%)	94	104	100

### 试剂盒组成及保存

未拆封的试剂盒可在4°C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°C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°C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)