

重组羧肽酶 B 酶联免疫吸附测定
试剂盒使用说明书
(96T)

使用前请仔细阅读说明书。若有任何问题，请联系我们。

1. 试剂盒用途

该试剂盒用于体外定量检测大肠菌液体中重组羧肽酶 B 含量。本试剂盒仅供研究或工业生产使用。

2. 试剂盒基本参数

灵敏度 = 1 ng/ml

检测范围：0.25 - 64 ng/ml

特异性：可检测重组羧肽酶 B，与其它重组大肠菌表达系统相关蛋白无明显交叉反应。

重复性：板内，板间变异系数均 < 10%。

工作时间：熟练实验人员可在 2.5 小时内完成一次测定。

有效期：6 个月

3. 试剂盒组成及保存

未拆封的试剂盒可在 2-8℃ 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。

中文名称	规格	保存条件
抗体包被的 ELISA 酶标板 (96 孔可拆卸) (MicroELISA Plate(Dismountable))	8 孔×12 条	-20℃
冻干标准品 (A1) (Reference Standard)	32ng/支×4 支	2-8℃
浓缩辣根过氧化物酶化抗体 (A2) (Concentrated HRP-Detection Ab)	1 支×0.1 mL	-20℃
显色底物 (TMB) (A3) (Substrate Reagent)	5 支×0.125 mL	-20℃ 避光
浓缩标准品&样品稀释液& HRP-抗体稀释液 (25 X) (P1) (Concentrated Reference Standard & Sample Diluent & Concentrated HRP- Ab Diluent (25x))	1 瓶×5ml	2-8℃
浓缩洗涤液 (25 X) (P2) (Concentrated Wash Buffer (25x))	1 瓶×40 mL	2-8℃
底物稀释液 (TMB) (P3) (Substrate Reagent)	1 瓶×15 mL	2-8℃ 避光
反应终止液 (P4) (Stop Solution)	1 瓶×5ml	2-8℃
封板覆膜 (可重复使用) (Plate Sealer)	5 张	
产品说明书 (User Manual)	1 份	
质检报告 (Certificate of Analysis)	1 份	

说明:

- ① 所有试剂瓶盖须旋紧以防止蒸发和微生物的污染。
- ② 酶标板-20℃可存放 6 个月，2-8℃存放勿超过一周。

4. 试验所需自备物品

- ① 酶标仪（滤光片波长 450 nm 和 650nm）；
- ② 高精度移液器，EP 管及一次性吸头，加样槽；
- ③ 37℃恒温箱，双蒸水或去离子水；
- ④ 洁净无纸屑的吸水纸或干布。

5. 待测样品注意事项

- ① 样品收集后若在 1 周内进行检测的可保存于 2-8℃，若不能及时检测，请按一次使用量分装，冻存于-20℃（1 个月内检测），或 -80℃（3 个月内检测），避免反复冻融。
- ② 试剂盒检测范围不等同于样品的浓度范围，如果您的样品中检测物浓度高于标准品最高值，请根据实际情况，做适当倍数稀释后再测。
- ③ 若使用化学裂解液制备的样本或细胞提取液，由于引入某些化学物质会导致 ELISA 测值出现偏差。

6. 检测前准备工作

① 请提前 20 分钟从冰箱中取出试剂盒，平衡至室温，**观察溶液是否有结晶，如果有结晶按提示进行操作。**提前 15 分钟打开酶标仪预热。

② 稀释液配制

将浓缩标准品&样品稀释液&HRP-抗体稀释液用双蒸水稀释（1：25）。

③ 洗涤液配制

将浓缩洗涤液用双蒸水稀释（1：25）。

提示:从冰箱中取出的浓缩洗涤液可能有结晶，属于正常现象，可用 40℃水浴加热使结晶完全溶解后再配制洗涤液（加热温度不要超过 50℃，使用时洗涤液温度应为室温）。请当日使用。

④ 标准品配制

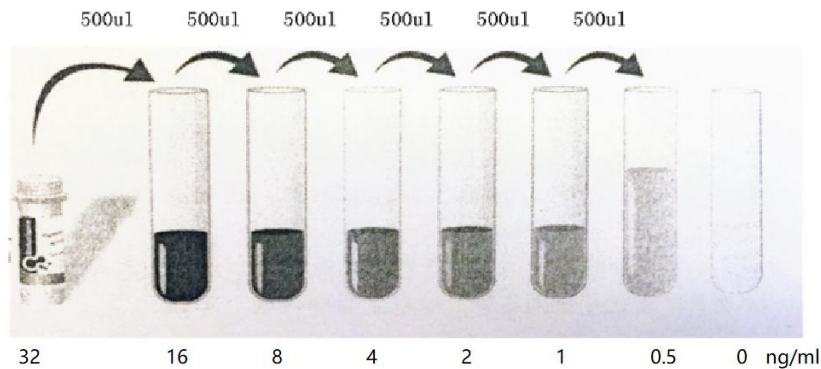
将标准品于 1000 转/分离心 1 分钟后，加入标准品&样品稀释液 1.0 mL 至冻干标准品中，旋紧管盖，静置 10 分钟，上下颠倒数次，待其充分溶解后，用移液器将其轻轻混匀（浓度为 32ng/ml），然后进行倍比稀释（注：不要直接在反应孔中进行倍比稀释）。建议配制成以下浓度：**32、16、8、4、2、1、0.5、0 ng/ml**。样品稀释液直接作为空白孔 0 ng/ml。

提示:溶解和稀释标准品过程中尽量避免产生气泡。

倍比稀释方法

取 7 只 EP 管，每管中加入 500 μL 标准品&样品稀释液，从 32 ng/ml 的标准品工作液中吸取 500 μL 加入含有 500 μL 标准品&样品稀释的 EP 管中混匀配成 16 ng/ml 的标准品工作液，按此步骤往后依次吸取混匀。如下图。

标准品稀释图例（以 500 μL 为例）



提示：最后一管直接作为空白孔，不再加入标准品工作液。

⑤ HRP 标记抗体工作液配制

实验前请先将抗体管 1000 转/分离心 1 分钟，以避免管壁及管盖上残留抗体。实验前计算实验所需用量（以 100 μL/孔计算），实际配制时应多配制 100-200 μL。使用前 15 分钟，用 HRP-抗体稀释液将浓缩辣根过氧化物酶化抗体稀释为工作浓度（抗体：稀释液 = 1:125），当日使用。

⑥ 显色底物（TMB）工作液配制

计算实验所需显色底物用量（以 100 μL/孔计算），实际配制时应多配制 100-200 μL 显色底物工作液。使用前 15 分钟，用底物稀释液将 TMB 显色底物稀释为工作浓度（底物：稀释液 = 1: 20），避光保存，当日使用。

7.洗板方法

① 自动洗板机：每孔加入洗涤液 350-400 μL（根据加满孔的标准进行调整），注入和吸出间隔 60 秒。

② 手工洗板：甩尽孔内液体，在洁净无纸屑的吸水纸或干布上拍干，每孔加入洗涤液 350-400 μL（根据加满孔的标准进行调整），浸泡 2-3 分钟，甩尽孔内液体，在洁净无纸屑的吸水纸上拍干。

8.操作步骤

① 将标准品工作液依次加入到前两列孔中，每个浓度的工作液并列加两孔（复孔），每孔 100 μL。待测样品加入到其他孔，每孔 100 μL，若样本浓度高于检测范围，需用标准品 & 样本稀释液稀释后加样。将酶标板覆膜并置于 37℃ 孵育 60 分钟。

提示：加样时将样品加于酶标板底部，尽量不触及孔壁，轻轻晃动酶标板混匀避免产生气泡。加样时间控制在 10 分钟内。

② 洗涤：甩尽孔内液体，在洁净无纸屑的吸水纸或干布上拍干。每孔加入 350-400 μL（根据加满孔的标准进行调整）洗涤液，浸泡 2-3 分钟，甩尽孔内液体，在洁净无纸屑的吸水纸或干布上拍干。重复此洗板步骤 3 次。

③ 每孔中加入 HRP-抗体工作液 100 μL，轻轻晃动酶标板混匀避免产生气泡，将酶标板覆膜并置于 37℃ 孵育 30 分钟。

④ 洗涤：用洗涤液洗板 4 次，方法步骤同 2。

提示：酶标板洗涤不完全可能会造成标准曲线梯度差，或背景值高。应注意加入洗涤液的体积，以加满酶标板的孔为标准进行调整，确保所有的孔浸泡在洗涤液中并浸泡 2-3 分钟。

⑤ 显色：每孔加底物显色工作液（TMB）100 μL，将酶标板覆膜并置于 37℃ 条件下孵育 10 分钟。

提示：加显色底物推荐使用排枪和加样槽，但应严格避免底物污染，确保所使用的加样槽洁净或一次性使用，加液时移液枪的枪头切不要接触孔内溶液以避免污染，影响实验结果。可通过观察加样槽中底物是否变蓝预判底物是否被污染。根据实际显色情况酌情缩短或延长，显色时间在 5-30 分钟范围内。当标准孔出现明显梯度时，即可终止。

⑥ **终止：**每孔加终止液 50 μL ，终止反应，室温放置 1 分钟，推荐使用排枪和加样槽。

提示：终止液的加入顺序应尽量与底物溶液的加入顺序相同。加液时移液枪枪头切不要接触孔内溶液以避免污染，影响实验结果。

⑦ **读数：**用酶标仪在 450 nm 波长（参考波长 650nm）测量各孔的光密度（ $\text{OD}_{450/650 \text{ nm}}$ 值）。

提示：请提前打开酶标仪电源，预热仪器，设置检测程序。

9.结果判断

① 计算每组复孔的平均 OD 值。每个标准品的平均 OD 值减去空白孔的 OD 值作为矫正值。以标准品的浓度为横坐标 (X)，OD 值为纵坐标 (Y)，绘出标准曲线（作图时亦可去掉空白组的值）。

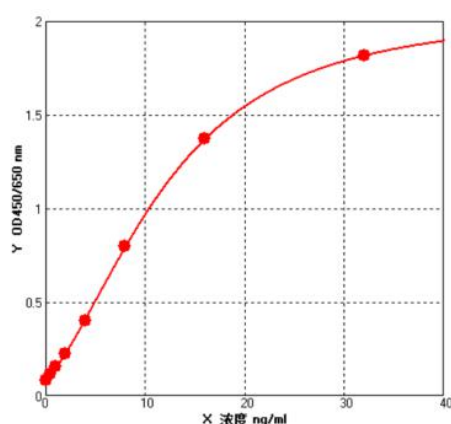
② 推荐使用专业的曲线制作软件，如 curve expert 1.3 或 ELISA Calc（请使用 Logistic 五参数拟合曲线计算方法绘制标准曲线）等。

③ 若样品 OD 值高于标准曲线上限，应适当稀释后重测。

④ 典型数据

由于实验操作条件的不同（如操作者、移液技术、洗板技术和稳定条件等），标准曲线的 OD 值会有所差异。以下数据和曲线仅供参考，实验者需根据自己的实验建立标准曲线。

X-浓度 (ng/mL)	32	16	8	4	2	1	0.5	0
Y- $\text{OD}_{450/650 \text{ nm}}$	1.816	1.370	0.801	0.403	0.227	0.150	0.114	0.081
Y- $\text{OD}_{450/650 \text{ nm}}$ (去本底)	1.735	1.289	0.720	0.322	0.146	0.069	0.033	0
回收量 (ng/mL)	32.02	15.97	8.05	3.92	2.02	1.06	0.54	—
回收率%	100.1	99.8	100.6	98.0	101.0	106.0	108.0	—



五参数 Logistic 曲线拟合

$$\text{方程: } y = (A - D) / [1 + (x / C)^B] + D$$

$$A = 2.04650$$

$$B = -2.14765$$

$$C = 16.45755$$

$$D = 0.08630$$

$$N = 0.58305$$

$$R^2 = 0.99995$$

10.注意事项

① **储存：**试剂盒中各种试剂请按说明书提示合理存放。在储存及温育过程中避免将试剂暴露在强光中。所有试剂瓶需旋紧以防止蒸发和微生物污染，否则可能会出现错误的结果。

② **酶标板：**刚开启的酶标板孔中可能会有少许水样物质，此为正常现象，不会对实验

结果造成任何影响。暂时不用板条应拆下后放入备用自封袋，按推荐温度存放。

③ **加样：**加样和加同一试剂时，第一孔与最后孔之间加样时间间隔过大将导致不同的“预温育”时间，从而明显的影响到测量值的准确性及重复性，每次的加样时间最好控制在10分钟之内。推荐设置复孔。

④ **温育：**为防止样品蒸发，实验时必须给酶标板覆膜，洗板后应尽快进行下步操作，避免酶标板处于干燥状态。严格遵守给定的温育时间和温度。

⑤ **洗涤：**洗涤过程中反应孔中残留的洗涤液应在吸水纸上拍干，勿将滤纸直接放入反应孔中吸水。在读数前要清除酶标板底部残留的液体和手指印，以免影响酶标仪读数。

⑥ **试剂配制：**试剂盒在运输过程中会使液体沾到管壁或瓶盖，因此使用1000转/分离心一分钟，以使附着管壁或瓶盖的液体沉积到管底。取用前请用移液器小心吹打4-5次，使溶液混匀。所有试剂请按说明书指示请精确配制。

⑦ **显色时间的控制：**加入底物后，请定时观察反应孔的颜色变化（比如每隔五分钟），如梯度已经很明显，请提前加终止液终止反应，以避免颜色过深，影响酶标仪读数。

⑧ **底物：**请避光保存底物。在储存和温育时，避免强光直接照射。

⑨ **混匀：**充分轻微混匀对反应结果尤为重要，最好使用微量振荡器，使用最低频率，如无微量振荡器，可以在反应前手工轻轻敲击酶标板框混匀。

⑩ 不同批号的试剂盒组分不能混用（洗涤液和终止液除外）。

⑪ **关于样品回收率**

1) 本试剂盒以测定重组羧肽酶 B 的抗原性而非活力来推测残留量，因此试剂盒中标准品采用羧肽酶 B 的消光系数($E^{1\%1cm}=21.0D$ ，即当 $A_{280nm}=2.10$ 时，羧肽酶 B 浓度为 $1mg/ml$) 来计算其蛋白含量，以最大限度保持质控的精确和稳定性。

2) 不同计量方法以及产品纯度的差别可以导致不同来源、不同批次产品中羧肽酶 B 的蛋白含量不完全一致，也会造成回收率的差异。

3) 为避免上述因素影响，建议将用作回收率测试的样品采用分光光度法 (A_{280nm}) 估算蛋白含量，再稀释至适合的浓度用于回收率测试，尽量减少回收率的误差。

11. 问题分析

若实验结果有问题，请及时对显色结果拍照，并妥善保存未使用板条及试剂，然后联系技术支持。也可参考以下信息找出原因。

问题描述	可能原因	相应对策
标准曲线梯度差	吸液或加液不准	检查移液器和吸头
	标准品稀释不正确	溶解标准品时稍微旋转瓶身，轻轻混匀使粉末完全溶解
	洗涤不完全	保证洗涤时间和洗涤次数及每孔的加液量
显色很弱或无色	温育时间太短	保证充足的温育时间
	实验温度不正确	使用推荐的实验温度
	试剂体积不够或漏加	检查吸液及加液过程，保证所有试剂按顺序足量添加
读数数值低	酶标仪设置不正确	在酶标仪上检查波长和滤光片装置
		提前打开酶标仪预热
变异系数大	加液不正确	检查加液情况
	检测抗体的工作浓度过高	使用推荐的稀释倍数

背景值高	酶标板洗涤不完全	重新仔细阅读操作步骤, 保证每步清洗完全; 如果用自动洗板机, 请检查所有的出口是否有堵塞; 是否使用试剂盒配备的洗涤液。
	洗液有污染	配制新鲜的洗液
灵敏度低	ELZSA 试剂盒保存不当	按说明书要求保存相关试剂
	读数前未终止	OD 读数前应在每孔中加入终止液