

重组胰蛋白酶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和提示部分。若有任何问题，请联系我们。

1. 试剂盒用途

本试剂盒用于体外定量检测待测样品中重组胰蛋白酶含量。本试剂盒仅供研究和工业生产使用。

2. 试剂盒基本参数

灵敏度: ≤ 1 ng/ml

检测范围: 0.078 - 40 ng/ml

特异性: 可检测重组胰蛋白酶, 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°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。

中文名称	规格	保存条件
冻干标准品 (A1) (Reference Standard)	10ng/支 × 4 支	2-8°C
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 × 5 mL	2-8°C
浓缩洗涤液 (25 X) (P2) (Concentrated Wash Buffer (25x))	1 瓶 × 40 mL	2-8°C
底物稀释液 (TMB) (P3) (Substrate Reagent)	1 瓶 × 15 mL	2-8°C 避光
反应终止液 (P4) (Stop Solution)	1 瓶 × 5 mL	2-8°C
抗体包被的 ELISA 酶标板 (96 孔, 可拆卸) (MicroELISA Plate(Dismountable))	8 孔 × 12 条	-20°C
浓缩辣根过氧化物酶化抗体 (A2) (Concentrated HRP-Detection Ab)	1 支 × 0.05mL	-20°C
显色底物 (TMB) (A3) (Substrate Reagent)	5 支 × 0.125 mL	-20°C 避光
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	/

上海市徐汇区银都路 466 号 1 号楼 101 室 Tel:021-54336592 Fax: 021-54336593

公司网站: <http://www.yaxinbio.com>, email:sales@yaxinbio.com

说明:

- ①所有试剂瓶须旋紧瓶盖以防止蒸发和微生物污染。
- 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本的浓度范围, 如果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

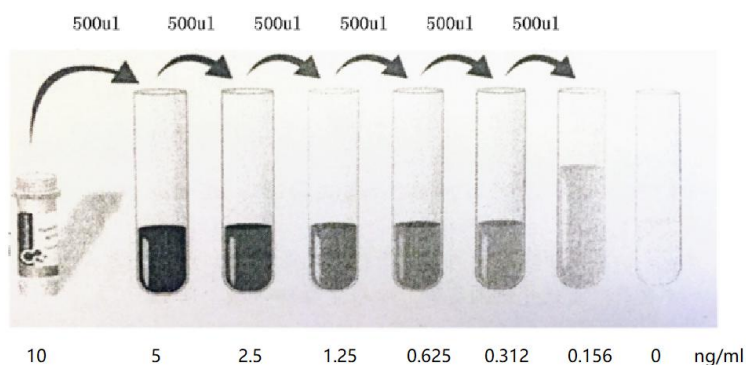
将标准品于 **1000 转/分离心 1 分钟**后, 加入标准品&样品稀释液 1.0 mL 至冻干标准品中, 旋紧管盖, 静置 10 分钟后上下颠倒数次, 待其充分溶解后, 用移液器将其轻轻混匀 (浓度为 10 ng/mL), 然后进行倍比稀释 (注: 不要直接在反应孔中进行倍比稀释)。建议配制成以下浓度: 10、5、2.5、1.25、0.63、0.312、0.156、0 ng/mL。标准品&样品稀释液直接作为空白孔 0 ng/mL。

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, 每管加入 500 μL 标准品&样品稀释液, 从 10 ng/mL 的标准品工作液中吸取 500 μL 加入含有 500 μL 标准品&样品稀释液的 EP 管中混匀配成 5 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。

⑤HRP-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。计算实验所需抗体用量 (以 100 µL /孔计算), 实际配制时应多配制 100-200 µL 工作液。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: 250), 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。

提示: 配制显色底物 (TMB) 工作液要严格避免污染, 如出现变蓝的现象应重新配制。

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°C 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°C 孵育 30 分钟。

④洗涤: 用洗涤液洗板 4 次, 方法同步骤 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: 每孔加显色底物 (TMB) 工作液 100 µL, 酶标板覆膜置于 37°C 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 μ L, 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。加液时移液枪的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 (OD_{450/650 nm} 值)。

提示: 请提前 15 分钟打开酶标仪电源, 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)。

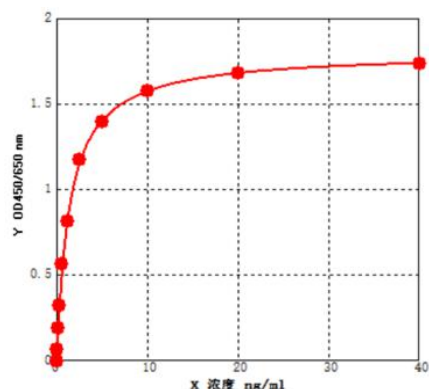
②推荐使用专业的曲线制作软件, 如 curve expert 1.3 或 ELISA Calc (请使用 Logistic 五参数拟合曲线计算方法绘制标准曲线) 等。

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)	10	5	2.5	1.25	0.625	0.312	0.156	0
Y-OD_{450/650 nm}	1.601	1.454	1.231	0.872	0.624	0.382	0.244	0.057
Y-OD_{450/650 nm} (去本底)	1.574	1.397	1.174	0.815	0.567	0.325	0.187	0
回收量 (ng/mL)	10.167	4.822	2.628	1.182	0.657	0.306	0.153	—
回收率%	101.7	96.4	105.1	94.6	105.1	98.1	98.1	—



五参数 Logistic 曲线拟合

方程: $y = (A - D) / [1 + (x/C)^B] n + D$

A = 1.79982

B = -0.98196

C = 1.30294

D = -0.00664

N = 1.05003

R² = 0.99943

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。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**洗板:** 洗涤过程中反应孔中残留的洗涤液应在吸水纸或干布上拍干, 勿将滤纸直接放入反应孔中吸水。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。

提示: 不同批号的试剂盒组分不能混用(洗涤液和终止液除外)。

⑩关于样品回收率

1) 本试剂盒以测定重组猪胰蛋白酶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胰蛋白酶的消光系数($E_{1\%1cm}=13.6D$, 即当 $A_{280nm}=1.36$ 时, 胰蛋白酶浓度为 $1mg/ml$)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、不同批次产品中胰蛋白酶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。也可参考以下信息以找出原因。

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
	酶标板洗涤不完全	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
	稀释不正确	
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
背景值高	检测抗体的工作浓度过高	使用推荐的稀释倍数
	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