

Mouse CITH3 Elisa Kit

检测原理:

攸碧艾的 ELISA 试剂盒采用“夹心法”:将捕获抗体包被于酶标板上,捕获样品及标准品中的靶蛋白,生物素化的检测抗体与靶蛋白结合, SABC 复合物与生物素化检测抗体结合,形成免疫复合物,加入 TMB 显色液后,若反应孔中有靶蛋白则显蓝色,加入终止液变黄色,检测过程中游离的成分均被洗去,用酶标仪在 450 nm 处测 OD 值,靶蛋白浓度与 OD 值之间呈正比,通过绘制标准曲线计算出标本中靶蛋白的浓度。

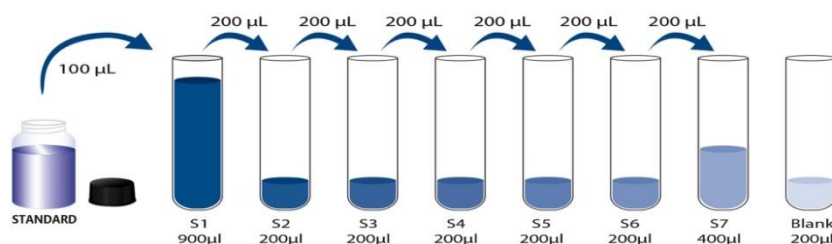
试剂盒组分: (保存温度 4°C)

| 名称 | 规格 (48 T) | 规格 (96 T) |
|-----------------|-----------|-----------|
| 预包被酶标板 | 8×6 条 | 8×12 条 |
| 标准品 | 1 支 | 1 支 |
| 标准品/样品稀释液 | 12ml | 12ml |
| 生物素化检测抗体 (100×) | 60ul | 120ul |
| 生物素化检测抗体稀释液 | 6ml | 12ml |
| SABC (100×) | 60ul | 120ul |
| SABC 稀释液 | 6ml | 12ml |
| TMB 显色液 (A/B) | 各 3ml | 各 6ml |
| 终止液 | 3ml | 6ml |
| 30×浓缩洗涤液 | 30ml | 30ml |
| 封板胶纸 | 2 张 | 4 张 |
| 产品说明书 | 1 份 | 1 份 |

本试剂盒适用于血清、血浆、组织匀浆及其它生物体液。

标本收集与试剂准备:

- 血清、血浆样本收集应使用一次性的无热原,无内毒素试管 (EDTA、柠檬酸盐、肝素抗凝均可),血清、血浆避免使用溶血,高血脂标本,标本悬浮物应离心去除,使标本清澈透明。待测样本应尽早检测,2-8°C 保存 48 小时;更长时间须冷冻 (-20°C 或 -80°C) 保存,避免反复冻融。
- 洗涤液配置:用蒸馏水 1:30 稀释 (例:1ml 浓缩洗涤液加入 29ml 的蒸馏水)
- 标准品配制:取 8 个 1.5ml 离心管,分别标注 S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, blank, 第一管 S1 中加入标准品/样品稀释液 900ul,第二至第八管中分别加入标准品/样品稀释液 200ul,在第一管中加入标准品溶液 (50000.0pg/ml) 100ul 置于漩涡混合器上混匀后用加样器吸出 200ul,移至第二管,如此反复作对倍稀释至 S7,第八管为空白对照。配置好的标准曲线浓度为:5000.0、2500.0、1250.0、625.0、312.5、156.25、78.1、0 pg/ml (标准品的用量及标准曲线范围也可根据自己需要配置)。



4. 生物素化抗体工作液配置:使用前 20 分钟, 用生物素化抗体稀释液将 **100×**生物素化抗体稀释成 **1×**工作液, 根据所需用量配置, 当日使用, 剩余弃之。
5. SABC 工作液配置:使用前 20 分钟, 用 SABC 稀释液将 **100×**SABC 稀释成 **1×**工作液, 根据所需用量配置, 当日使用, 剩余弃之。
6. TMB 显色液的配置: 使用前 10 分钟, 将 TMB 显色液 A 液和 B 液 1: 1 混合, 避光放置备用。
7. 如果您检测的样本中靶蛋白浓度高于标准品最高值, 建议重新检测, 请根据实际情况, 适当倍数稀释(建议做预实验, 以确定稀释倍数)。

检测程序:

1. 加样: 空白孔加入 50 µl 标准品/样品稀释液, 其余孔各加入标准品或待测样品 50ul, 将反应板混匀后置 37°C, 50 分钟。
2. 洗板: 用 **1×**洗涤液将反应板充分洗涤 3 次, 每孔加入 **1×**洗液 300 µl, 每次震荡/浸泡 1-2 分钟, 向滤纸上印干。
3. 空白孔加入 100ul 生物素化抗体稀释液, 其余孔各加入 **1×**的生物素化抗体工作液 100ul, 混匀后置 37°C, 50 分钟。
4. 洗板: 同上。
5. 每孔加入 SABC 工作液 100ul, 混匀后置 37°C, 30 分钟。
6. 洗板: 同上。
7. 每孔加入提前配置好的 TMB 混合液 100ul, 混匀后置 37 °C 暗处反应 10-20 分钟(具体显色时间根据显色结果而定)。
8. 每孔加入 50ul 终止液, 混匀, 30 分钟内用酶标仪在 450nm 处测吸光值。

结果判断与计算:

1. 所有 OD 值建议减除空白孔值后再进行计算, 如空白孔 OD 低于 0.1, 也可以直接计算。
2. 以标准品浓度作横坐标, OD 值作纵坐标, 手工绘制或用软件绘制标准曲线, 根据样品 OD 值计算出相应含量, 再乘以稀释倍数即可。

试剂盒性能:

- 1、灵敏度:可测浓度小于 25.6pg/ml。
- 2、特异性:不与其它蛋白、细胞因子有交叉反应。
- 3、重复性:板内, 板间变异系数均小于 10%。

注意事项

1. 在试验中标准品和样本检测时建议作双孔检测, 每次检测都应做标准曲线。
2. 洗涤过程很关键, 洗涤不充分将导致精确度误差及 OD 值错误地升高, 从冰箱中取出的浓缩洗涤液可能有结晶, 属于正常现象, 37°C 水浴使结晶完全溶解后再配制洗涤液。
3. 检测时所有试剂都要恢复到室温, 板条开封后剩余板条需封好, 放回袋中 **1** 个月内用完。

4. 试剂盒使用超敏 TMB 溶液，显色过深时会出现沉淀状，属正常现象，混匀即可，不影响结果判读。
5. 说明书以试剂盒内纸质版为准，本试剂盒仅用于科研，不能用于临床诊断！