

仅供科研使用，不得用于临床检验。

HRP 直接标记配对抗体通用试剂盒（ELISA）

说明书

【产品名称】

HRP 直接标记配对抗体通用试剂盒（ELISA）

【包装规格】

48T/盒，96T/盒，96T*5/盒。

【预期用途】

仅供科研使用，用于配对抗体研发和制备 ELISA 试剂盒使用。

【检验原理】

本试剂盒用于研制和生产双抗体夹心酶联免疫试剂盒（ELISA）。使用空白微孔酶标板包被特异性抗体（固相抗体）并封闭，加入标准品和待测样本、再加入 HRP 标记的特异性抗体（标记抗体），经过温育与充分洗涤，去除未结合的组分，在微孔板固相表面形成固相抗体-抗原-HRP 标记抗体的夹心复合物。加 TMB 底物，底物在 HRP 催化下，产生蓝色产物，在终止液（2M 硫酸）作用下，最终转化为黄色，在酶标仪上测定吸光度（OD 值），吸光度（OD 值）与待测样本的浓度呈正相关，拟合标准品曲线，计算检测样本的浓度。

【主要组成成分】

主要成分

组分	96T/盒数量	5*96T/盒数量	主要成分
空白微孔板	96T	5*96T	--
包被液	15mL	60mL	PBS
封板液	30mL	120mL	酪蛋白
酶标稀释液	30mL	120mL	含 NBS 的 PBST
TMB 底物液	15mL	60mL	TMB 工作液
终止液	10mL	60mL	2mol/L 稀硫酸
20×浓缩洗涤液	30mL	120mL	含 0.15%Tween20 的 PBS
说明书	1 份	1 份	--
自封袋	1 个	5 个	--
不干胶	2 片	10 片	--

酶标稀释液已经通过测试，结果表明 HBs 抗原阴性，HIV1、HIV2 和 HCV 抗体阴性，由于不存在一种试验方法能够完全保证没有这些物质，本品必须按照具有潜在的感染性进行处理，处理过程应当遵循通用的安全措施。

需要但未提供的材料及耗材

- 1、酶标仪
- 2、精密移液器及一次性吸头
- 3、蒸馏水
- 4、洗瓶或者自动洗板机
- 5、37℃水浴锅或恒温箱
- 6、500ml 量筒
- 7、无粉一次性乳胶手套

【储存条件及有效期】

- 1、2-8℃保存，切勿冷冻，有效期 6 个月。

仅供科研使用，不得用于临床诊断。

2、开封使用后，包被微孔板放入带有干燥剂的自封袋中，密闭自封袋，并将全部试剂放回2-8℃冰箱。

3、开封后，按照建议的条件保存，校准品、包被微孔板、生物素化的抗体和 HRP 标记的链霉亲和素，有效期为 1 个月，其他成分在标签标明的有效期内是稳定的。

【适用仪器】

半自动的酶标仪，如 Thermo MK3，或者国产酶标仪。

【样本要求】

样本类型和采集

以下只是列出样品采集的一般指南。所有样本采集过程中，不得使用叠氮钠做为防腐剂。

1、细胞培养上清：4000rpm 条件下离心 20min，去除细胞颗粒和聚合物，上清液保存在-20℃以下，避免反复冻融。

2、血清：使用不含热原和内毒素的试管，操作过程中避免任何细胞刺激，4000rpm 条件下离心 20min，小心地分离出血清，保存在-20℃以下，避免反复冻融。

3、血浆：肝素，EDTA，或柠檬酸钠作为抗凝剂。在 4000rpm 条件下，离心 20 分钟取上清，血浆保存在-20℃以下，避免反复冻融。

样本保存和稳定性

样本在 2-8℃条件下，可以储存 72h，在-20℃和-80℃储存 6 个月。样本收集后，不是一次检测完，请按一次用量分装冻存，避免反复冻融，使用时在室温下解冻，确保样品均匀充分解冻。

【检验方法】

试剂准备

1、使用前，所有的组分都要至少复温 120min，确保充分复温到室温。

2、浓缩洗涤液：从冰箱取出的浓缩洗涤液，会有结晶产生，这属于正常现象，水浴加热使结晶完全溶解。浓缩洗涤液与蒸馏水，按 1:20 稀释，即 1 份的浓缩洗涤液，添加 19 份的蒸馏水。

操作程序

一、预包被板制备

- 1、用包被液将包被抗体稀释到 1-5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ （一般用 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）浓度的包被工作液。
- 2、将包被工作液加入空白微孔板中，每孔 100 μL 。
- 3、室温放置过夜（12h）。
- 4、弃去包被工作液，在洁净卫生纸上拍干，每孔加入 150 μL 封闭液。
- 5、37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 120min。
- 6、弃去封闭液，在洁净卫生纸上拍干，放室温干燥 6h。
- 7、用自封袋收好预包被板，避免潮湿。

二、HRP 标记抗体配制

用酶标稀释液，将 HRP 标记的特异性抗体按 1：500-1：4000 稀释（一般用 1：1000），配成酶标记工作液。

三、标准品配制

标准品用酶标稀释液稀释到合适浓度，再按 2 倍倍比关系，稀释 7 个浓度点。

四、实验操作

- 1、所有试剂和组分都先恢复到室温。
- 2、按前面试剂准备中描述的方法，配制好试剂盒各种组分的工作液。
- 3、从自封袋中取出所需板条，剩余的板条用自封袋密封放回冰箱。
- 4、设置样本孔、标准品孔，样本孔加待测样本 50 μL ，标准品孔加不同浓度标准品 50 μL ，
- 5、所有孔立即加入配制好的酶标记抗体工作液 100 μL 。
- 6、覆上封板膜，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱或者水浴锅中温育 60min。
- 7、揭开封板膜，弃去液体，吸水纸上拍干，每孔加满洗涤液，静置 20s，甩去洗涤液，吸水纸上拍干。如此重复 4 次（共洗板 5 次）。若使用自动洗板机，请按洗板机操作程序进行洗板，添加浸泡 20s 的程序，可以提高检测的精度。洗板结束，加底物前，要在干净不掉屑的纸上，充分拍干反应板。
- 8、在所有孔中加入 TMB 底物液 100 μL 。用封板膜盖住反应板，37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅或恒温箱避光温育 15min。

9、所有孔加入终止液 50 μ L，在酶标仪上读取各孔吸光度（OD 值）。

【检验结果的解释】

1、检测完成后，以标准品浓度做为纵坐标，对应的吸光度（OD 值）作为横坐标，利用计算机软件，采用四参数 Logistic 曲线拟合（4-pl），创建标准曲线方程，通过样本的吸光度（OD 值），利用方程计算样品的浓度值。

2、如果样品被稀释，通过上述方法测得的浓度值，要乘以稀释倍数，才是样品的最终浓度。

【检验方法的局限性】

- 1、仅供科研使用，不得用于临床诊断。
- 2、在试剂盒标示的有效期内使用，过期产品不得使用。
- 3、跟其他厂家的试剂盒或者组分不能混用。
- 4、使用试剂盒配套的稀释液。
- 5、如果样本值高于最高标准品浓度值，请将样本适当稀释后，再重新测定。
- 6、待测样本中存在的人抗鼠等异嗜抗体会干扰检测结果，检测前，请排除该因素。
- 7、通过其他方法得到的检测结果，与本试剂盒测定结果不具有直接的可比性。

【产品性能指标】

1、物理性能

试剂盒的各液体组分应澄清透明、无沉淀或者絮状物。微孔板铝箔袋应真空包装，无破损漏气。

2、稳定性

2 $^{\circ}$ C-8 $^{\circ}$ C保存，有效期 6 个月。

【注意事项】

生物安全

1、检测必须符合实验室管理规范的规定，严格防止交叉污染，所有样品、洗弃液和各种废弃物都应按照传染病进行处置。

2、试剂盒的液体组分中，含有 proclin-300 防腐剂，可能引起皮肤过敏反应，避免吸入烟

雾与皮肤接触。

3、底物液对皮肤、眼睛和上呼吸道有刺激作用，避免吸入烟雾。戴上防护手套，实验完成后彻底洗手。

技术提示

1、混合蛋白溶液时，避免起泡。

2、加校准品与样本时，每个校准品浓度和样本都要更换移液枪头，公共组分应该悬臂加样，避免交叉污染。

3、合适的温育时间，和充分的洗涤步骤，是保证实验结果准确性的必要条件。

4、底物溶液为无色液体，保存过程中变为蓝色，代表底物溶液已经失效，不得使用。

5、终止液加样顺序与底物溶液加样顺序一致，加入终止液后，蓝色底物产物，会瞬间变为黄色。

6、实验中，用剩的板条，应立即放回自封袋中，密封（低温干燥）保存。

7、所有液体组分，使用前充分摇匀，严格按照说明书标明的时间、加样量及加样顺序进行温育操作。

废物处理

所有使用或未使用的试剂，所有污染性的一次性材料，应当遵循传染性或潜在传染性产品的处理程序，每个实验室都有责任根据其实验的类型和危险性级别，进行废物和污物的处理，同时要严格依照有关规定对待所有的废物和污物。