

人半乳糖缺乏IgA1 ELISA试剂盒

本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断！

货号：EKH327

1.简介

该试剂盒采用“一步”夹心法酶联免疫吸附试验（ELISA）体外定量检测血清、血浆、组织、细胞或其他相关生物液体中Gd-IgA1 浓度。

灵敏性、检测范围、特异性和重复性

- 检测范围：3.125 ng/ml-100
- 灵敏性：0.1 ng/ml
- 特异性：可检测样本中的Gd-IgA1，且与其类似物无明显交叉反应。
- 重复性：板内，板间变异系数均 < 10%。

2.检测原理

将目标抗体包被于 96 孔微孔板中，制成固相载体，向微孔中分别加入标准品或 标本，其中的目标连接于固相载体上的抗体结合，然后加入辣根过氧化物酶标记 的抗体，将未结合的抗体洗净后再次彻底洗涤后加入 TMB 底物显色。TMB 在过氧 化物酶的催化下转化成蓝色，并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和 样品中的目标呈正相关。用酶标仪在450nm 波长下测定吸光度（O.D.值），计算 样品浓度。

3.试剂盒组成

名称	96孔配置	备注
微孔酶标板	8 孔×12 条	2-8℃
标准品	0.3mL*6 管	-20℃（用不完）
样本稀释液	6mL	按说明书进行稀释
检测抗体-HRP	10mL	2-8℃
底物 A	6mL	2-8℃
底物 B	6mL	2-8℃
终止液	6mL	2-8℃
20×浓洗涤缓冲液	25ml	无

说明书	1 份	无
自封袋	1 个	无
封板膜	2 张	无

4、检测中需要但没有提供而需要自备的材料：

1. 酶标仪(450nm 波长滤光片)
2. 高精度移液器
3. EP 管及一次性吸头：0.5-10 μL , 2-20 μL , 20-200 μL , 200-1000 μL
4. 双蒸水或去离子水
5. 37°C恒温箱
6. 吸水纸

试剂准备：

1. 使用前将试剂盒和标本缓慢均衡至室温(18-25°C)，样本不能直接在37°C溶解。
2. 标准品（冻干品）：试剂盒提供了已知浓度的6 支标准品：



编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6
ng/ml	3.125	6.25	12.5	25	50	100

经过大量正常标本检验，标本的正常浓度值均在试剂盒提供的检测范围内，实验过程中直接取 50 μL 样本上样即可。当有部分样本值超过最大标准品浓度时，可用样本稀释液将标本进行适当稀释后再进行实验。

3. 从试剂盒中取出的浓缩洗涤液可能有结晶，属于正常现象；放置室温，轻摇均匀，待结晶完全溶解后再配置洗涤液。可将 25ml 浓缩洗涤液用蒸馏水或去离子水稀释配置成 500ml 工作浓度的洗涤液，未用完的放回 4°C。
20 $\times$ 洗涤缓冲液的稀释：蒸馏水按 1：19 稀释，即 1 份 20 $\times$ 洗涤缓冲液加 19 份蒸馏水。

注:标准品使用时要轻轻充分混匀, 避免气泡。为保证实验结果的准确请使用微量吸管, 并校准微量加液器。请依据所需的量精确吸取。

4. 请勿重复使用已用过的标曲、下一次实验需重新定标。

样品注意事项:

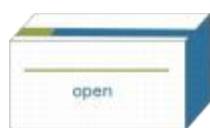
1. 样品收集后若在 1 周内进行检测的可保存于 $-2-8^{\circ}\text{C}$, 若不能及时检测, 请按一次使用量分装, 冻存于 -20°C (1 个月内检测), 或 -80°C (3-6 个月内检测), 避免反复冻融。
2. 试剂盒检测范围不等于样本的浓度范围, 如果您的样品中检测物浓度高于 标准品最高值, 请根据实际情况, 做适当倍数稀释(建议查阅文献后先做预实验, 以确定稀释倍数)。
3. 若所检样本不在说明书所列样本之中, 建议做预实验验证其检测有效性。
4. 若使用化学裂解液制备组织匀浆或细胞提取液, 由于引入某些化学物质会导致 ELISA 测值出现偏差。
5. 若样本为细胞培养上清, 因该类样本干扰因素较多, 如: 细胞状态、细胞数量、采样时间等, 所以可能存在不被检出情况。
6. 某些重组蛋白可能与试剂盒中捕获或检测抗体不匹配而出现不被检出的情况。
7. 不能检测含 NaN_3 的样品, 因 NaN_3 抑制辣根过氧化物酶的 (HRP) 活性。

5、样本要求:

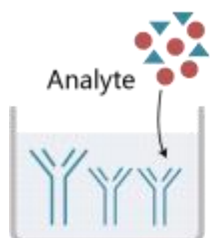
1. 血清: 全血样品于室温放置 2 小时或 $-2-8^{\circ}\text{C}$ 过夜后于 $1000\times g$ 离心 20 分钟, 取上清即可检测, 收集血液的试管应为一次性的无内毒素试管。
2. 血浆: 抗凝剂推荐使用 EDTA 钠盐, 样品采集后 30 分钟内于 $1000\times g$ 离心 15 分钟, 取上清即可检测。避免使用溶血, 高血脂样品。
3. 组织匀浆: 用预冷的 PBS (0.01 M , $\text{pH}=7.4$) 冲洗组织, 去除残留血液, 称重 后将组织剪碎。将剪碎的组织与对应体积的 PBS (一般按 1: 9 的重量体积比, 比如 1g 的组织样品对应 9 mL 的 PBS, 具体体积可根据实验需要适当调整, 并 做好记录。推荐在 PBS 中加入蛋白酶抑制剂) 加入玻璃匀浆器中, 在冰上充分 研磨。为了进一步裂解组织细胞, 可以对匀浆液进行超声破碎或反复冻融。最后将匀浆液 $5000\times g$ 离心 5-10 分钟, 取上清检测。
4. 细胞提取液: 贴壁细胞用冷的 PBS 轻轻清洗, 然后用胰蛋白酶消化, $1000\times g$ 离心 5 分钟后收集细胞; 悬浮细胞可直接离心收集。收集的细胞用冷的 PBS 洗 涤 3 次。每 1×10^6 个细胞中加入 150-200 μL PBS 重悬并通过反复冻融使细 胞破碎(若含量很低可减少 PBS 的体积)。将提取液于 $1500\times g$ 离心 10 分钟, 取上清检测。
5. 细胞培养上清或其他生物体液: $1000\times g$ 离心 20 分钟, 除去杂质及细胞碎 片。取上清检测。

6.操作步骤

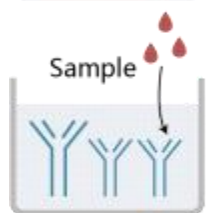
注：根据待测样品数量加上标准品的数量决定所需的板条数。每个标准品和空白孔建议做复孔,每个样品根据自己的数量来定，能使用复孔的尽量做复孔。



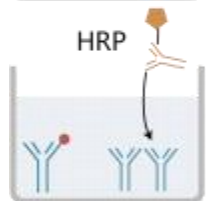
第一步：试剂盒室温平衡 30min，然后从铝箔袋中取出所需板条，剩余板条用自封袋密封放回4℃。



第二步：设置标准品孔和样本孔，标准品孔各加不同浓度的标准品 50 μ L。



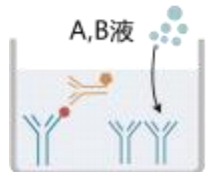
第三步：样本孔中加入待测样本 50 μ L；空白孔不加。



第四步：除空白孔外，标准品孔和样本孔中每孔加入辣根过氧化物酶（HRP）标记的检测抗体 100 μ L，用封板膜封住反应孔，37℃水浴锅或恒温箱温育 60min。



第五步：弃去液体，吸水纸上拍干，每孔加满洗涤液（350 μ L），静置 1min，甩去洗涤液，吸水纸上拍干，如此重复洗板 5 次（也可用洗板机洗板）。



第六步：每孔加入底物 A、B 各 50 μ L，37℃避光孵育 15min。



第七步：每孔加入终止液 50 μ L，15min 内，在 450nm 波长处测定各孔的 O.D 值。

注：

1. 准备: 准备一次实验所需要的酶标条，其他的可从微孔板上拆下，密封，按照说明书要求保存，以备下次使用。
2. 加样: 实验操作中请使用一次性的吸头，避免交叉污染。加样时注意不要有气泡，将样品加于酶标板底部，尽量不触及孔壁，轻轻晃动混匀，加样或加试剂时，第一个孔与最后一个孔加样之间的时间间隔如果太大，将会导致

不同的“预温育”时间，从而明显地影响到测量值的准确性及重复性。因此，一次加样时间（包括标准品及所以样品）最好控制在 10 分钟内。

3. 温育: 为防止样品蒸发，实验时请将加上盖或覆膜的酶标板置于湿盒内，以避免液体蒸发，洗板后应尽快进行下一步操作，任何时候都应避免酶标板处于干燥状态，同时应严格遵守给定的温育时间和温度。

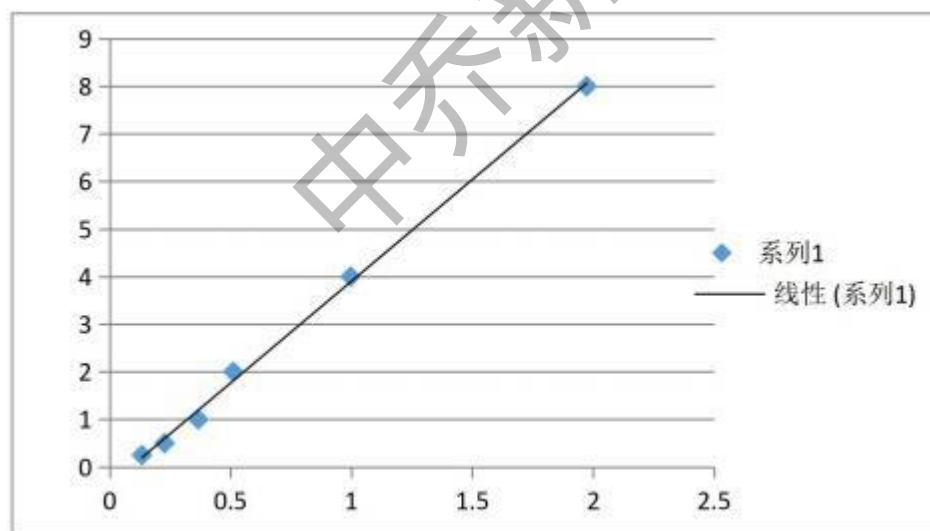
4. 洗涤: 充分的洗涤非常重要，在每次洗涤过程中，都要将洗涤液完全甩干。洗涤过程中反应孔中残留的洗涤液应在滤纸上拍干，勿将滤纸直接放入反应孔中吸水，同时要消除板底残留的液体和手指印，避免影响最后的酶标仪读数。如果有自动洗板机，应在熟练使用后再用到正式实验过程中。

5. 反应时间的控制: 加入显色液后请定时观察反应孔的颜色变化，如颜色较深，请提前加入终止液终止反应，避免反应过强从而影响酶标仪光密度读数。

底物：底物请避光保存，在储存和温育时避免强光直接照射。

7、结果计算

各标准品及样本 O.D.值扣除空白孔 O.D.值后作图（5 点图），如设复孔，则应取其平均值计算。以标准品的浓度为纵坐标（或对数坐标），O.D.值为横坐标（或对数坐标），绘出标准曲线（最佳方程式应依回归方程计算的 R² 值来定，以 R² 值越趋近于 1 为好）。推荐使用专业制作曲线软件进行分析，如 curve expert 1.30, 根据样品 O.D.值，由标准曲线查出相应的浓度，再乘以相应稀释倍数(没有稀释 不需要乘)，即为样品实际浓度。



8.试剂盒相关性能参数

精密度

精密度用样品测定值的变异系数 CV 表示。CV (%) = SD/mean × 100

批内差：取同批次试剂盒对低、中、高值定值样本进行定量检测，每份样本连续测定 20 次，分别计算不同浓度样本的平均值及 SD 值。

批间差: 选取 3 个不同批次的试剂盒分别对低、中、高值定值样本定量测定, 每个样本使用同一试剂盒重复测定 8 次, 分别计算不同浓度样本的平均值及 SD 值。批内差: $CV < 10\%$ Inter-批间差: $CV < 13\%$

稳定性

经测定, 试剂盒在有效期内按推荐温度保存, 其活性降低率小于 5%。

为减小外部因素对试剂盒破坏前后检测值的影响, 实验室的环境条件需尽量保持一致, 尤其是实验室内温度、湿度及温育条件。其次由同一实验员来进行操作可减少人为误差。

警告

本试剂盒中使用了稀硫酸作为终止液, 其具有轻微腐蚀性, 使用时应避免接触衣物或眼、手等皮肤暴露部位。

友情提醒

试剂盒使用完毕后, 请妥善处理相关耗材, 避免环境污染!

9、注意事项

1. 试验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。特别是检测血液或者其他体液样品时, 请按国家生物试验室安全防护条例执行。
2. 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。暂时不用的板条应拆卸后放入备用铝箔袋, 按照上述表格中保存条件存放。
3. 检测使用的酶标仪需要安装能检测 $450 \pm 10\text{nm}$ 波长的滤光片, 光密度范围在 0-3.5 之间。
4. 不同批号的试剂盒组份不能混用(反应终止液除外)。
5. 试验中所用的 EP 管和吸头均为一次性使用, 严禁混用。