产品说明书目录

检测原理 ---------- 2

试剂盒组分 ---------- 3

实验所需材料 ---------- 3

标本收集及试剂准备 ---------- 3

检测程序 ---------- 5

结果判断和计算 ---------- 6

试剂盒性能 ---------- 6

检测实验的局限性 ---------- 7

注意事项 ---------- 7

ELISA常见问题分析 ----------8

人β2糖蛋白1抗体IgM(β2-GP1AbIgM)ELISA试剂盒

产品货号：ORSE4032H **产品规格： 96T**

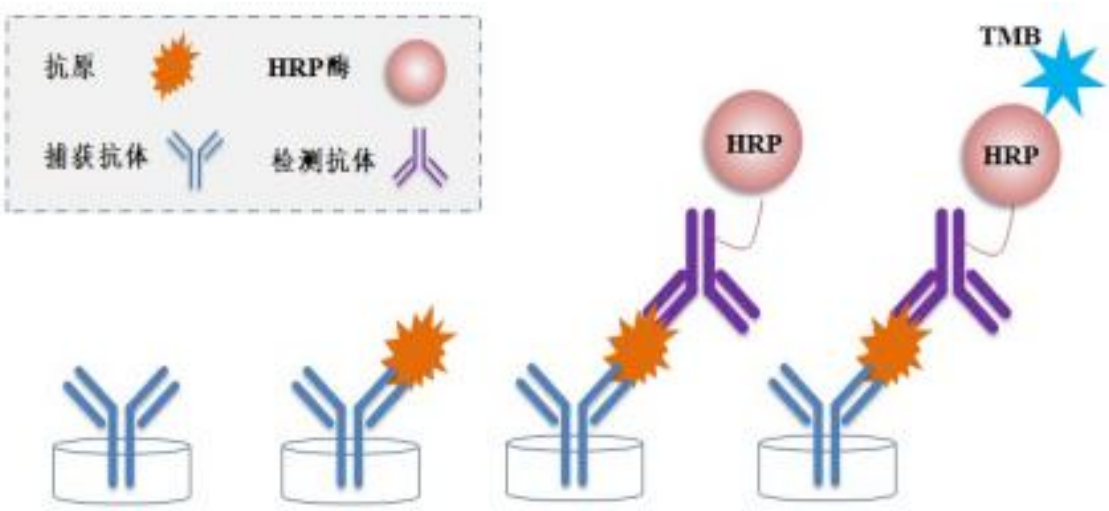
产品灵敏度: 0.469ng/ml **产品检测范围:0.781-50ng/ml**

适用范围：本试剂盒仅用于科研，不能用于临床诊断，适用于人血清、血浆、组织匀浆、细胞培养上清及其它生物体液。

检测原理

澳睿赛生物生产的 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。

按操作顺序形成抗体夹心结构后，加入TMB 底物，板孔液体由无色变成蓝色，再加入终止液液体变为黄色后进行吸光度值测定。



双抗体夹心模式图

试剂盒组分：（保存温度4℃）

名称	规格一（48T）	规格二（96T）	储存条件
预包被酶标板	8×6条	8×12条	未用完的酶标板密封干燥保存可于2-8℃储存至多1个月。
β2-GP1 Ab IgM标准品（红色）	1支×100μL	2支×100μL	每次测试按需配置标准品，剩余置于-20℃储存至多6个月。
100×生物素化抗体（粉色）	1支×60μL	1支×120μL	每次测试按需配置抗体工作液，剩余置于-20℃储存至多6个月。
浓缩ABC复合物(稀释1：100)(绿色盖)(亲和素生物素过氧化物酶复合体)	1支×60μL	1支×120μL	每次测试按需配置酶结合物工作液，剩余置于-20℃储存至多6个月。
20×浓缩稀释液（紫色）	1支×15mL	1支×30mL	于2-8℃可保存至有效期末。
TMB显色底物)（棕色瓶）	1支×5mL	1支×10mL	
终止液（黄色）	1支×5mL	1支×10mL	
20×浓缩洗涤液（蓝色）	1支×15mL	1支×30mL	
封板胶纸	2张	2张	
产品说明书	1份	1份	

实验所需材料

- 酶标仪，包含450nm测定波长，建议配置包含600-680nm校正波长，采用双波长检测；
- 移液器及枪头、蒸馏水或去离子水、计量器具、带刻度的烧杯、量筒等耗材和容器具；
- 水平轨道微孔板振荡器、计时器、瓶、排枪或微孔板洗板机等辅助；
- 用于稀释校准品和样品的离心管、干净的吸水纸、以及其他实验可能需要用到的器具；

标本收集及试剂准备：

1、样品预处理

下面列出的样品收集和储存条件旨在作为一般性指导。样品稳定性尚未评估。

a) 细胞培养上清液：在 1000×g 下离心 15 分钟去除颗粒，立即进行测定或等分装样品，并将样品储存在≤-20℃的温度下。避免重复冻融循环。（细胞培养上清液样品建议 2 倍稀释。例如：100μL 样品+100μL 的 1×稀释液）

b） 血清：使用血清分离管，使样品在室温下凝结 30 分钟，然后在 1000×g 下离心 15 分钟。立即取出血清并进行测定或等分装样品，将样品储存在≤-20℃的温度下。避免重复冻融循环。（血清样品建议 2 倍稀释。例如：50μL 样品+50μL 的 1×稀释液）

c） 血浆：使用 EDTA 或肝素作为抗凝剂收集血浆。收集后 30 分钟内，以 1000×g 离心 15 分钟。立即测定或等分装样品，并将样品储存在≤-20℃的温度下。避免重复冻融循环。（血浆样品建议 2 倍稀释。例如：50μL 样品+50μL 的 1×稀释液）**注：柠檬酸盐抗凝剂血浆未经验证可用于本试验，使用时应自行验证可行性。溶血的样品不适合用于该测定。**

d） 组织匀浆：用预冷的 PBS(0.01M,pH=7.4)冲洗组织，去除残留血液（匀浆中裂解的红细胞会影响检测结果），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 9mL 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，于冰上充分研磨或匀浆机研磨。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。最后将匀浆液于 5000×g 离心 5-10 分钟，取上清检测。

e） 细胞裂解液：贴壁细胞用预冷 PBS 轻轻清洗，然后用胰蛋白酶消化，1000×g 离心 5 分钟后收集细胞；悬浮细胞可直接离心收集。收集的细胞用预冷 PBS 清洗 3 次，每 1×106 个细胞中加入 150-200μL 的 PBS 重悬（推荐在 PBS 中加入蛋白酶抑制剂；若含量很低可适当减少 PBS 体积）并通过反复冻融或超声使细胞破碎。将提取液于 2-8℃，1500×g 离心 10 分钟，取上清检测。

f） 其它样本类型：1000×g 离心 20 分钟，取上清即可检测。

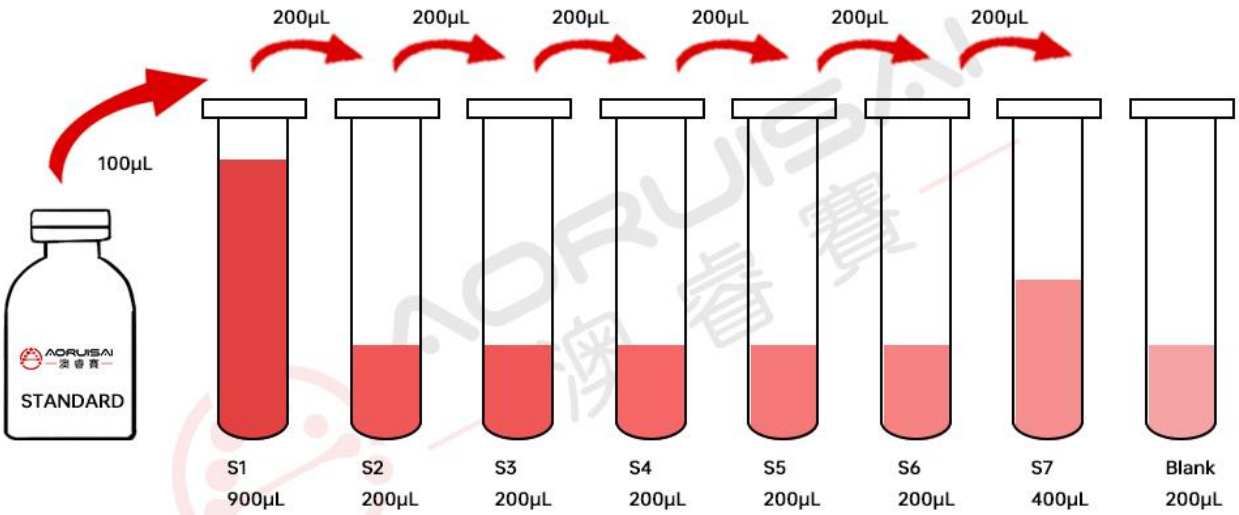
2、洗涤液/稀释液配置

如果洗涤液/稀释液（20×）有晶体析出，需在 37℃下加热至晶体全部溶解。用蒸馏水 1:20 稀释（例如：1mL 浓缩洗涤液/稀释液加入 19mL 的蒸馏水）

3、标准品配置

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（500ng/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:50、25、12.5、

6.25、3.125、1.563、0.782、0ng/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、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 100μl 标准品/样品稀释液，其余孔各加入标准品或待测样品 100ul，将反应板混匀后置 37℃，60 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 300μl，每次震荡/浸泡 1-2 分钟，向滤纸上印干。
3. 空白孔加入 100ul 标准品/样品稀释液，其余孔各加入 1×的生物素化抗体工作液 100ul，混匀后置 37℃，60 分钟。
4. 洗板：同上。
5. 每孔加入 SABC 工作液 100ul，混匀后置 37℃，30 分钟。
6. 洗板：同上。
7. 每孔加入 TMB 显色底物 100ul，混匀后置 37 ℃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，5 分钟内用酶标仪在 450nm 处测吸光值。

结果判断和计算

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. 回收率

回收率在不同基质的整个测定范围内选取在人血清、血浆和细胞培养上清中加入 3 个不同浓度水平的待测物，计算回收率。

样本类型	范围（%）	平均回收率（%）
血清(n=8)	86-102	94
血浆(n=8)	90-106	98
细胞培养上清(n=8)	94-110	102

2. 线性关系

分别在选取的人血清、血浆和细胞培养上清中加入高浓度待测物，在标准曲线线性范围内进行稀释，评估线性。

稀释比例	回收率（%）	血清	血浆	细胞培养上清
1:2	范围（%）	95-106	90-108	92-112
1:4	范围（%）	92-104	89-107	104-116
1:8	范围（%）	86-112	92-101	99-115
1:16	范围（%）	89-104	89-107	93-116
1:32	范围（%）	87-102	92-101	90-115

3. **特异性**:不与其它蛋白、细胞因子有交叉反应。

4. **重复性**:板内，板间变异系数均小于 10%。

检测实验的局限性

1. 试剂盒的使用期限不得超过试剂盒标签上的有效期。不要将试剂与其他批次或来源的试剂混合使用或替换使用。
2. 如果样品产生的值高于最高标准，则用测定稀释剂进一步稀释样品，并重复测定。
3. 稀释剂、操作人员、移液技术、洗涤技术、培养时间或温度以及试剂盒使用年限的任何变化都可能导致结合变化。
4. 样本采集、处理和存储的变化可能会导致样本值的差异。
5. 本试剂盒实验设计消除了不同生物样品中可能潜在的干扰因素的影响，但并不能涵盖所有潜在影响因素。不能排除存在其他干扰的可能性。

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℃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！

ELISA常见问题分析

标准曲线较差

原因	解决方案
标准品溶液配置有误	确认是否进行正确稀释。
标准品复溶不当	开盖前进行离心；检查复溶后是否存在不溶物。
标准品已降解	按推荐方式保存和处理标准品。
曲线的标度不适合	尝试使用不同标度绘制曲线。
移液器加样误差	正确使用经过校准的移液。

无信号

原因	解决方案
孵育时间过短	样品在 4 ℃孵育过夜，或遵循试剂的实验方案。
靶标含量低于检测范围	减小样品的稀释倍数或浓缩样品。
样品类型不适用	对于没有验证过的样品类型，检测信号可能减弱或没有使用验证过的样品类型作为阳性对照同时进行检测。
抗原表位被孔板吸附，无法识别	使用直接或间接 ELISA 方法增强检测肽的能力，将肽偶联到大的载体蛋白上，然后包被到微量滴定板。
检测缓冲液的相容性	确保检测缓冲液与靶标兼容（例如，保留酶活性、保留蛋白质相互作用）。
检测试剂不足	遵循试剂的实验方案，增加检测试剂的浓度或用量。
样品制备不正确	确保进行正确的样品制备/稀释。样品可能与微量滴定板测定形式不兼容。

抗体不足	尝试不同的抗体浓度/稀释。
孵育温度过低	确保在正确温度下进行孵育。所有试剂（包括孔板）在进行实验前应处于室温，或试剂的实验方案所建议的温度。
波长不正确	确认波长，再次读板。
孔板被强力洗涤	检查并确保自动洗涤系统的压力正确。如果手动洗涤，则轻轻吸取冲洗缓冲液。
孔变干	测定开始后，不要让孔变干。将所有的孵育步骤使用封口膜或胶带密封孔板。
酶反应的显色速度慢	使用前配制底物溶液。确保母液未过期、未污染。延长孵育时间。
试剂盒没有充分平衡	试剂室温平衡至少 20 分钟，确保所有试剂已平衡至室温。

变异系数（CV）较大

原因	解决方案
孔中有气泡	读板前，确保不存在气泡。
孔洗涤不均/未充分洗涤	检查洗板机的所有管口是否畅通。使用推荐方法进行洗涤。
试剂混匀不充分	确保所有试剂充分混匀。
移液量不一致	正确使用经过校准的移液器
边缘效应	确保孔板和所有试剂处于室温。
样品制备或保存条件不一致	确保样品制备保持一致，使用最优的样品保存条件（例如尽可能减少反复冻融）。

背景偏高

原因	解决方案
孔洗涤不充分	按照实验方案建议进行洗涤。
洗涤缓冲液污染	制备新鲜的洗涤缓冲液。
检测试剂过多	确保试剂被正确稀释或者减少检测试剂的推荐浓度。

封闭缓冲液无效（例如检测试剂结合封闭剂；孔未完全封闭）	尝试不同的封闭剂和/或将封闭剂添加到洗涤缓冲液。
孵育/洗涤缓冲液的盐浓度	增加盐浓度可能会降低非特异性和/或减弱脱靶相互作用。
读板前加入终止液后时间太长	添加终止液后立即读板。
抗体出现非特异性结合	使用适当的封闭缓冲液，例如 BSA 或 5-10% 正常血清，如果是直标一抗，使用与一抗种属相同的血清，如果是非直标一抗，则使用与二抗种属相同的血清。确保孔已经过预处理，以防止非特异性附着。
高抗体浓度	尝试不同的稀释度，以获得最优结果。
底物孵育在光下进行	底物孵育应避光进行，或根据试剂的实验方案建议进行。
底物加入后孔中有沉淀生成	增大样品的稀释倍数或降低底物浓度。
孔板脏	清洁孔板底部。
显色液变质或者试剂过期	检查试剂盒有效期,在有效期内使用
孵育时间和温度的改变	按照说明书上推荐的时间和温度操作
盖板、容器或者枪头的重复使用	及时更换使用过的盖板，容器或者枪头

灵敏度偏低

原因	**解决方案**
ELISA 试剂盒保存不当	按推荐方式保存所有试剂。请注意，各试剂的保存条件可能有所不同。
靶标不足	浓缩样品或降低样品稀释度。
检测试剂失活	确保报告酶/荧光素具有预期的活性。
酶标仪设置不正确	在检测中，确保酶标仪设置为正确的吸收波长或激发/发射波长。
测定方法不够灵敏	更换更灵敏的检测系统（例如从比色检测转变为化学发光/荧光检测）。更换更灵敏的测定方法（例如从直接 ELISA 方法

	转变为夹心 ELISA 方法）。延长孵育时间或升高温度。
微量滴定板吸附靶标的效果不佳	将靶标共价结合到微量滴定板。
底物不足	加入更多底物。
样品类型不兼容（例如血清与细胞提取物）	对于没有验证过的样品种属，检测信号可能减弱或没有。使用验证过的样品类型作为阳性对照同时进行检测。
缓冲液或样品成分干扰	确认试剂中是否存在干扰性化合物。例如，抗体中的叠氮化钠会抑制 HRP 酶，在血浆中用作抗凝剂的 EDTA 会抑制酶反应。
混合或混用不同试剂盒的试剂	避免混合来自不同试剂盒的试剂。
试剂盒没有充分平衡	试剂室温平衡至少 20 分钟，确保所有试剂已平衡至室温。

温馨提示：ELISA 实验中可能会影响到测定结果的因素较多，分布在实验操作中各个细节步骤，请务必加强各环节的质量控制，才能确保得到精确的实验数据。