(仅供科研使用，不得用于临床诊断!)

人抗 Rh 血型 D 抗原抗体（Anti RHD Ab）定量检测试剂盒（ELISA）使用说明书

规格：48T/96T

物理性能：各液体组分澄清透明、无沉淀或者絮状物。微孔板铝箔袋应真空包装，无破损漏气。

标准曲线线性：校准品剂量反应曲线相关系数 r 值，大于等于 0.9900。

精密度：批内变异系数 CV%小于 10%；批间变异系数 CV%小于 15%。

灵敏度：最低检出剂量小于 0.1 ng/mL。

回收率：回收率在 85%-115%之间。

敏感性：本试剂盒识别天然和重组人抗 Rh 血型 D 抗原抗体（Anti RHD Ab），与结构类似物无交叉。

稳定性：2℃-8℃保存，有效期 6 个月。

检测范围：0.25 ng/mL - 8 ng/mL。

用途：用于检测血清、血浆、细胞培养上清液等样本中人抗 Rh 血型 D 抗原抗体（Anti RHD Ab）的浓度。

使用试剂盒前，必须仔细阅读本说明书。如有任何问题，请通过以下方式联系我们：

免费电话：400-8332-227

官方热线：0595-2284-5743

技术电话：15260335612

公司网址：www.ruixinbio.com

联系时请提供产品货号、生产日期（见盒签），以便我们更高效为您服务。

实验原理

本试剂盒采用间接两步法酶联免疫吸附试验（ELISA）。在预包被人抗 Rh 血型 D 抗原抗体（Anti RHD Ab）捕获抗原（固相抗原）的微孔酶标板中，加入不同浓度校准品和待测样本，经过温育与充分洗涤，去除未结合的组分，再加入 HRP 标记的检测抗体（酶标抗体），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原-抗体-酶标抗体的夹心复合物。加底物 A 和 B，底物在 HRP 催化下，产生蓝色产物，在终止液作用下，最终转化为黄色，在酶标仪上测定吸光度（OD 值），吸光度（OD 值）与待测样品中待测抗体的浓度呈正相关。拟合校准品曲线，可以计算出样本待测抗体的浓度。

试剂盒限制性

1、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、使用试剂盒配套的样品稀释液。

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。

试剂盒组分与保存

未开封的试剂盒保存在 2-8 度，不得使用过期试剂盒。

组分	数量	主要成分
校准品	0.3ml/管*6 管	抗体配制的 6 个浓度标准品
包被微孔板	96T	预包被固相抗原
HRP 标记抗体	10mL	HRP 标记的检测抗体
底物液 A	6mL	过氧化氢工作液
底物液 B	6mL	TMB 工作液
样本稀释液	60mL	PBS
终止液	6mL	酸性溶液
20×浓缩洗涤液	30mL	含 0.15%Tween20 的 PBS
说明书	1 份	--
自封袋	1 个	--
不干胶	2 片	--

校准品浓度依次为：8、4、2、1、0.5、0 ng/mL。

注意：

1：使用前请检查试剂盒中试剂的标签和数量与表格是否一致。

2：如果试剂盒的组份需要再次使用，请确保上一次使用之后没有被污染。

3：酶标板单次未使用完，要谨记密封放到 2-8℃保存。

试验所需自备试验器材（不提供，但可协助购买）

1.标准规格酶标仪。

2.自动洗板机。

3.振荡器。

4.系列可调节移液器及吸头，一次检测样品较多时，最好用多通道移液器。

注意事项

1)本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断。

2)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。

3)严格按照规定的时间和温度进行温育以保证准确结果。所有试剂都必须在使用前达到室温20-25℃。使用后立即冷藏保存试剂。

4)洗板不正确可以导致不准确的结果。在加入底物前确保尽量吸干孔内液体。温育过程中不要让微孔干燥掉。

5)消除板底残留的液体和手指印，否则影响 OD 值。

6)底物显色液应呈无色或很浅的颜色。

7)避免试剂和标本的交叉污染以免造成错误结果。

8)在储存和温育时避免强光直接照射。

9)平衡至室温后再打开密封袋以防水滴凝聚在冷板条上。

10)任何反应试剂不能接触漂白溶剂或漂白溶剂所散发的强烈气体。任何漂白成分都会破坏试剂盒中反应试剂的生物活性。

11)检测使用的酶标仪需要安装能检测 450±10nm 波长的滤光片，光密度范围在0-3.5 之间。建议使用时提前 15 分钟预热。

12)请勿使用其他批号或其他来源的试剂混合或替代本试剂盒中的试剂。

13)试验中所用的 EP 管和吸头均为一次性使用，严禁混用。

14)请勿使用过期的试剂。

样品的准备和保存

以下只是列出样品采集和保存的一般指南。所有样本采集保存过程中，不得使用叠氮钠做为防腐剂。样品如果不立即分析，应分装后冷冻保存，且避免反复冻融。

细胞培养上清——离心去除沉淀，立即分析或分装后-20℃冷冻保存。

血清——用干净试管收集血液，室温凝固 30 分钟，离心 2000×g 20 分钟，收集血清。立即分析或分装后-20℃冷冻保存。

血浆——采用肝素、柠檬酸盐或 EDTA 抗凝，抽血后 30 分钟内在 2-8℃离心 2000×g 20 分钟。为消除血小板的影响，建议在 2-8℃进一步离心 10000×g 10 分钟。立即分析或分装后-20℃冷冻保存。

细胞裂解液——对于贴壁细胞，去除培养液，用 PBS、生理盐水或无血清培养液洗一遍。加入适量裂解液，用枪吹打数下，使裂解液和细胞充分接触。通常 10 秒后，细胞就会被裂解。对于悬浮细胞，离心收集细胞，用 PBS、生理盐水或无血清培养液洗一遍。加入适量裂解液，用枪吹打把细胞吹散，用手指轻弹以充分裂解细胞。充分裂解后，10000—14000×g 离心 3-5 分钟， 取上清。立即分析或分装后-20℃冷冻保存。

尿液——用无菌管收集，离心 2000×g 20 分钟。仔细收集上清。如有沉淀形成，应再次离心。

试剂准备

使用前，所有的组分都要至少复温 120min，确保充分复温到室温。

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。

底物：底物液 A 和 B，在使用前，按 1:1 体积充分混合，混合后 15 分钟内使用。

操作程序

推荐样本稀释方案：建议老师先做预实验摸索样本最佳稀释倍数，然后再做正式实验。

1、所有试剂和组分都先恢复到室温，标准品、质控品和样品，建议做复孔。

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、从铝箔袋中取出所需板条，剩余的板条用自封袋密封放回冰箱。

4、设置标准品孔、样本孔和空白孔，标准品孔各加不同浓度的标准品 50μL，样本孔加待测样本 50μL，空白孔不加，用封板膜盖住反应板，37℃水浴锅或恒温箱温育 30min。

5、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。

6、除空白孔外，标准品孔和样本孔，加入辣根过氧化物酶标记的检测抗体 100μL。

7、用封板膜盖住反应板，37℃水浴锅或恒温箱温育 30min。

8、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。

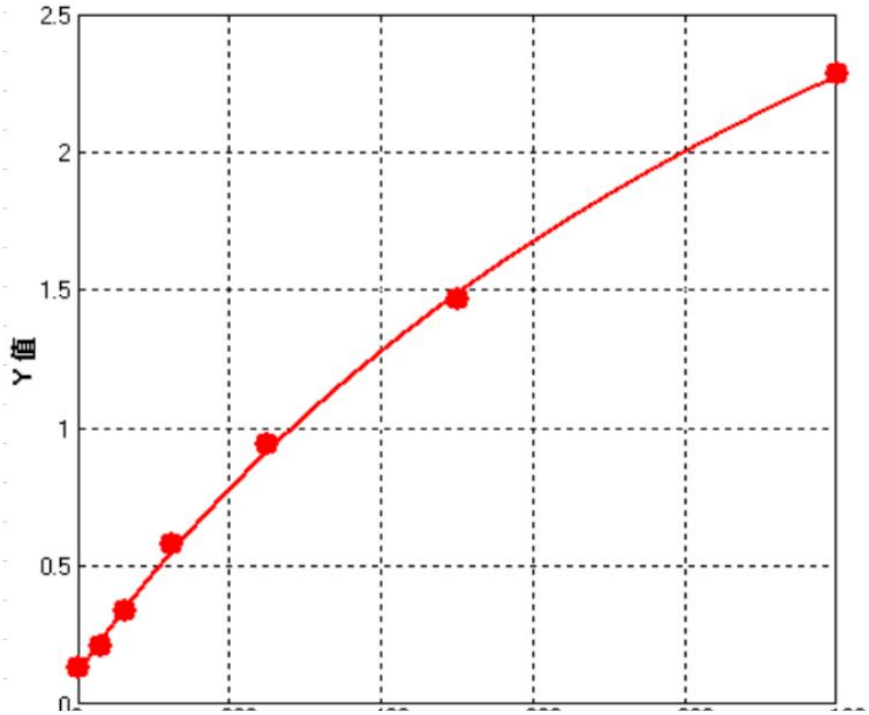
9、将底物 A 和 B 按 1:1 体积充分混合，所有孔中加入底物混合液 100μL。用封板膜盖住反应板，37℃水浴锅或恒温箱温育 15min。

10、所有孔加入终止液 50μL，在酶标仪 450nm 波长下读取各孔吸光度（OD 值）。

结果计算

11、以标准品浓度做为横坐标，对应的吸光度（OD 值）作为纵坐标，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。【用 ELISA Calc 软件计算】

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



（示意图，仅供参考）

[说明]

1、由于现有条件及科学技术水平尚不能对供货商提供的所有所有原料进行全面的鉴定与分析，本产品可能存在一定的质量技术风险。

2、最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境密切相关，请务必准备充足的标本备份。

3、不同批次的同一产品可能会有少许差别，网站电子版说明书仅作参考。

4、本试剂盒配套试剂必须配套使用，不能混用其他制造商的产品。只有严格遵守本试剂盒的实验说明才会得到最佳的检测结果。

5、用于制备试剂盒中抗体的免疫原通常为重组蛋白，但由于备重组蛋白所选取的片段、表达系统、纯化方式等各有不同，所以我们无法保证该试剂盒可用于其他公司重组蛋白的检测，通常我们也不建议使用试剂盒检测重组蛋白。

6、该试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。

[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。

[问题解答]

问题	可能原因	解决方案
标准曲线差	试剂盒平衡时间不够	不低于 2 个小时的室温平衡
	吸取及洗涤不充分	充分的吸取及洗涤
	移液不精确	检查和校正移液器
精密度低	洗涤不充分	按说明书要求充分洗涤和浸泡
	混匀不充分和吸取试剂不足	充分混匀和吸取试剂
	重复利用吸头、容器和覆膜	使用加样器要更换新的吸头、使用新的封板模
	加样不精确	检查和校正移液器
O.D 值低	每孔加的试剂量不精确	校正移液器，精确加入试剂
	温育时间不正确	保证充足的温育时间
	温育温度不正确	试剂要平衡至室温并保证准确的温育温度
	酶标记物或底物失效	通过混合酶标记物和底物，颜色迅速显现来检查
	没有加入终止液	按照说明书实验操作步骤加入终止液
	超出读数时间读数	在说明书推荐的读数时间内读数
样本值	不正确的样本储存方式	正确储存样本，使用新鲜样本进行实验
	不正确的样本收集和处理方法	采取正确的样本收集和处理方法
	待测物质在样本中含量低	使用新鲜样本，重复实验