**(仅供科研使用， 不得用于临床诊断!)**

# 小鼠抗卵清蛋白 IgE 抗体(OVAIgE)定量检测试剂盒（ELISA）

# 使用说明书

**规格**：48T/96T

使用前请仔细阅读说明书。

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

**试剂盒性能**

**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 0.062 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小鼠抗卵清蛋白 lgE 抗体(OVAIgE)，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 – 8ng/ml。

**用途：**用于检测血清、血浆、细胞培养上清液等样本中小鼠抗卵清蛋白 lgE 抗体(OVAIgE)的浓度。

**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 OVA 蛋白（固相抗原）的微孔酶标板中，加入小鼠抗卵清蛋白 lgE 抗体(OVAIgE)校准品和待测样本，再加入生物素标记抗体，经过温育与充分洗涤后，再加入 HRP 偶联的亲和素，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-生物素标记抗体-亲和素酶的夹心复合物。加底物 A 和 B，产生蓝色产物，在终止液作用下，最终转化为黄色，在酶标仪 450nm 波长上测定吸光度（OD 值），吸光度（OD 值）与待测样品中小鼠抗卵清蛋白 lgE 抗体(OVAIgE)的浓度正相关。拟合校准品曲线，可以计算出样本中小鼠抗卵清蛋白 lgE 抗体(OVAIgE)的浓度。

**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 | 开封后储存 |
|---|---|---|---|
| 校准品 | 0.35ml/管 | -- | 2-8℃14 天 |
| 包被微孔板 | 96T/48T | 预包被固相抗原 | 2-8℃14 天 |
| 生物素抗体 | 10mL | 生物素抗体 | 2-8℃180 天 |
| HRP 标记亲和素 | 10mL | HRP 标记亲和素 | 2-8℃14 天 |
| 样本稀释液 | 6mL | PBS | 2-8℃180 天 |
| 底物液 A | 6mL | 0.01%过氧化氢 | 2-8℃180 天 |
| 底物液 B | 6mL | 0.1%TMB | 2-8℃180 天 |
| 终止液 | 6mL | 酸性溶液 | 2-8℃180 天 |
| 20×浓缩洗涤液 | 25mL | 0.05%Tween20 | 2-8℃180 天 |
| 说明书 | 1份 | -- | -- |
| 自封袋 | 1个 | -- | -- |
| 不干胶 | 4 片 | -- | -- |

校准品浓度依次为：8、4、2、1、0.5、0.25、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。

**试剂盒限制性**

仅供科研使用，不得用于临床诊断。

在试剂盒标示的有效期内使用，过期产品不得使用。

跟其他厂家的试剂盒或者组分不能混用。

使用试剂盒配套的样品稀释液。

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。

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，请排出该因素。

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。

**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。

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。

按前面说明书描述的方法，配制好试剂盒各种组分的工作液。

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。

3、设置标准品孔、样本稀释液孔、空白孔和样本孔，标准品孔各加不同浓度的标准品 50μL，样本稀释液孔加样本稀释液 50μL，空白孔不加，样本孔加待测样本 50μL。用封板膜盖住反应板，37℃水浴锅或恒温箱避光温育 30min。

4、揭开封板膜，弃去液体，吸水纸上拍干，每孔加满洗涤液，静置 1min，甩去洗涤液，吸水纸上拍干，如此重复 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 30s 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。

5、除空白孔外，每孔加入生物素抗体 100uL，用封板膜盖住反应板，37℃水浴锅或恒温箱避光温育 30min。

6、重复步骤 4。

7、除空白孔外，每孔加入 HRP 标记亲和素 100uL，用封板膜盖住反应板，37℃水浴锅或恒温箱避光温育 20min。

8、重复步骤 4。

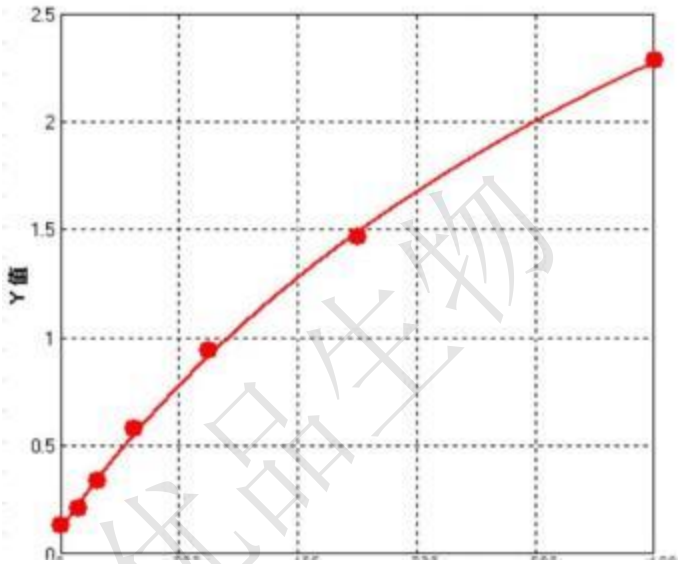
9、将底物 A 和 B 按 1:1 体积充分混合，所有孔中加入底物混合液 100μL。用封板膜盖住反应板，37℃水浴锅或恒温箱避光温育 15min。

10、所有孔加入终止液 50μL，在 450nm 波长酶标仪上读取各孔吸光度（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）

优品生物

## ［问题分析］

若实验效果不好，请及时对显色结果拍照，保存实验数据，保留所用板条及未使用试剂，然后联系我公司技术支持为您解决问题。同时您也可以参考以下资料：

**[问题解答]**

| 问题描述 | 可能原因 | 相应对策相应对策 |
|---|---|---|
| 标准曲线梯度差 | 吸液或加液不准 | 检查移液器及吸头 |
| | 平衡时间太短 | 保证充足的平衡时间 |
| | 洗涤不完全 | 保证洗涤时间和洗涤次数及每孔的加液量 |
| 显色很弱或无色 | 孵育时间太短 | 保证充足的孵育时间 |
| | 实验温度不正确 | 使用推荐的实验温度 |
| | 试剂体积不够或漏加 | 检查吸液及加液过程，保证所有试剂按顺序足量添加 |
| | 稀释不正确 | |
| | 酶标记物失活或底物失效 | 混合酶结合物和底物，通过迅速显色来检查判断 |
| 读数数值低 | 酶标仪设置不正确 | 在酶标仪上检查波长及滤光片设置 |
| | | 提前打开酶标仪预热 |
| 变异系数大 | 加液不正确 | 检查加液情况 |
| 背景值高 | 检测抗体的工作浓度过高 | 使用推荐的稀释倍数 |
| | 酶标板洗涤不完全 | 保证每步清洗完全；如果用自动洗板机，请检查所有的出口是否有堵塞；是否使用试剂盒配备的洗涤液 |
| | 洗液有污染 | 配制新鲜的洗液 |
| 灵敏度低 | ELISA 试剂盒保存不当 | 按说明书要求保存相关试剂 |
| | 读数前未终止 | OD 读数前应在每孔中加入终止液 |