货号:FY-ER4505

Rat HP(Haptoglobin) ELISA Kit

酶联免疫吸附测定试剂盒

本试剂盒用于测定大鼠血清、血浆及相关液体样本中大鼠 HP 的含量。

本产品仅用于科学研究，不用于临床诊断！

检测原理

本试剂盒采用双抗体夹心 ELISA 法。用抗大鼠 HP 抗体包被于酶标板上，实验时样品（或标准品）中的大鼠 HP 会与包被抗体结合。后依次加入生物素化的抗大鼠 HP 抗体和辣根过氧化物酶标记的亲和素，抗大鼠 HP 抗体与结合在包被抗体上的大鼠 HP 结合，生物素与亲和素特异性结合而形成免疫复合物，游离的成分被洗去。加入显色底物（TMB），TMB 在辣根过氧化物酶的催化下呈现蓝色，加终止液后变成黄色。用酶标仪在 450 nm 波长处测 OD 值，HP 浓度与 OD450 值之间呈正相关，通过绘制标准曲线计算出样品中 HP 的浓度。

性能

★灵敏度：9.38 ng/mL
★检测范围：15.63-1000ng/mL
★在大鼠 HP 及其类似物之间没有检测到显著的交叉反应
★重复性：变异系数< 10%

实验前注意事项

1.实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。

2.试剂盒检测范围不等同于样本中待测物浓度范围，建议实验前通过文献预估浓度，并通过预实验确定实际浓度。如浓度过高或过低，请适当稀释或浓缩样本。

3.若所检样本不在所列样本类型之中，建议做预实验验证其检测有效性。

4.新打开的 ELISA 酶标板可能含有水雾样物质，此为正常现象，不会对实验结果产生任何影响。

5.不得重复使用标准品工作液、生物素化抗体工作液、酶结合物工作液。

6.酶标仪需要安装 450 ±3nm 波长的滤光片和能检测 450 ±3nm 波长的检测器，且光密度值在 0-3.5 之间。

7.溶解含有蛋白质溶液时，应始终避免起泡。

8.为避免交叉污染，在每个标准品浓度加样之间、样品加样之间以及试剂加样之间更换移液器枪头。此外，应为每种试剂使用单独的储液瓶。

9.为了得到准确的实验结果，在孵育过程中，必须确保封板覆膜将酶标板密封。

10.在被添加到酶标板中之前，底物溶液都应保持为无色，并且不受光照。加入到酶标板中之后底物溶液应从无色变为渐变蓝色。

11.终止液应按照与加底物溶液相同的顺序添加到酶标板中。添加终止液后，孔中溶液的颜色将从蓝色变为黄色。绿色的孔表明终止液未与底物溶液充分混合。如出现颜色不匀一，请轻轻晃动酶标板以使溶液混合均匀。

试剂盒组成及保存

组分名称	规格	使用后保存条件
ELISA 酶标板 (Micro ELISA Plate)	96T:8 孔×12 条 48T:8 孔×6 条 24T:8 孔×3 条	-20℃,6 个月
冻干标准品 (Reference Standard)	96T:2 支 48T:1 支 24T:1 支	
浓缩生物素化抗体 (Concentrated Biotinylated Detection Ab) (100X)	96T:1 支 120μL 48T:1 支 60μL 24T:1 支 60μL	
浓缩 **HRP** 酶结合物 (Concentrated **HRP** Conjugate) (100X)	96T:1 支 120μL 48T:1 支 60μL 24T:1 支 60μL	
标准品&样品稀释液 (Reference Standard & Sample Diluent)	20mL*1 瓶	2-8℃,6 个月
生物素化抗体稀释液 (Biotinylated Detection Ab Diluent)	13mL*1 瓶	
酶结合物稀释液 (HRP Conjugate Diluent)	13mL*1 瓶	
浓缩洗涤液 (Concentrated Wash Buffer) (25X)	30mL*1 瓶	
底物溶液 (Substrate Reagent)	10mL*1 瓶	2-8℃（避光）
反应终止液 (Stop Solution)	10mL*1 瓶	2-8℃,6 个月
封板覆膜	5 张	常温
产品说明书	1 份	
质检报告	1 份	

实验过程需自备的材料和仪器

带 450nm 波长滤光片的酶标仪
37℃恒温箱
高精度单道或多道移液器
一次性移液器吸头及 EP 管
加样槽
去离子水或蒸馏水
用于微孔板的吸水纸

样品收集方法

1. 血清：全血样品于室温放置 1 小时或 2-8℃过夜后于 2-8℃，1000×g 离心 20 分钟，取上清即可检测。
2. 血浆：使用含抗凝剂的采血管采集样本，采样后 30 分钟内，在 2-8℃条件下以 1000×g 离心 15 分钟，取上清液即可进行检测。
3. 细胞上清：收集液体后于 2-8℃，1000×g 离心 20 分钟，除去杂质及细胞碎片，取上清检测。
4. 其它类型的样本：处理方式请扫描下方二维码获取。

试剂准备

1.使用前将所有试剂平衡至室温（18-25℃）。按照酶标仪说明书进行设置检测波长为 450nm，并在读板前预热 15 分钟。

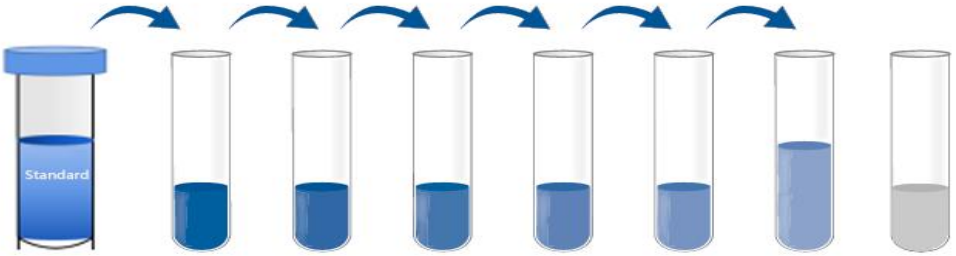
2.**洗涤缓冲液：**根据需要量用去离子水或蒸馏水稀释浓缩洗涤缓冲液（1:24），制备成 1×洗涤工作液。

3.**标准工作液：**

①离心：标准品 10000×g 离心 1 分钟。

②溶解：加 1mL 标准品&样本稀释液，静置 10 分钟，混匀（为避免起泡，可用涡旋仪混匀并低速离心），即为 1000ng/mL 的标准品工作液。

③倍比稀释：准备 7 支 EP 管，每管加 500μL 标准品&样本稀释液，从 1000ng/mL 取 500μL 配成 500ng/mL，依此类推，最后一管为空白（不需要再从倒数第二管中吸取液体）。现配现用！



1000	500	250	125	62.5	31.25	15.63	0
ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL

4.**生物素化抗体工作液：**计算生物素化抗体所需量(100μL/孔)。实际应多准备 100-200μL。使用前离心浓缩液管，将 100×浓缩生物素化抗体稀释为 1×工作液（如 10μL＋990μL 生物化抗体稀释液）。

5.**HRP 酶结合物工作液：**计算 HRP 酶结合物所需量(100 μL/孔)。实际应多准备 100-200μL。使用前离心浓缩液管，将 100×HRP 酶结合物稀释为 1×工作液（如 10μL＋990μL HRP 酶结合物稀释液）。

操作步骤

1．从板框上取下待用的微孔板条，将剩余的板条放回装有干燥剂的铝箔袋中，然后重新密封保存。

2．**加标准品以及样本：**分别设定标准孔、空白孔和样本孔。标准孔加入 **100μL** 倍比稀释的标准品，空白孔加入 **100μL** 标准品&样本稀释液，其余孔加入 **100μL** 待测样本(建议所有的待检样本和标准品在检测中设立复孔；建议通过预实验或咨询技术支持确定待检样本的稀释倍数)。

3．**孵育：**给酶标板加上封板覆膜，**37℃**孵育 **90 分钟**。提示：加样时将样品加于酶标板底部，尽量不触及孔壁，轻轻晃动混匀，避免产生气泡。加样时间宜控制在 **10 分钟**内。甩尽孔内液体，在洁净的吸水纸上拍干。

4．**洗板：**每孔加洗涤液 **300μL**，浸泡 **30 秒**，吸去或甩掉酶标板内的液体，拍干。重复此洗板步骤 **3 次**。洗板完成后请立即进行下步操作，不要让微孔板干燥。

5．**加生物素化抗体并孵育：**每个孔中加入生物素化抗体工作液 **100μL**，酶标板加上封板覆膜，**37℃**孵育 **60 分钟**。

6．**洗板：**甩尽孔内液体，洗涤 **3 次**，洗板方法同步骤 4。

7．**加 HRP 酶结合物并孵育：**每孔加 HRP 酶结合物工作液 **100μL**，酶标板加上覆膜，**37℃**孵育 **30 分钟**。

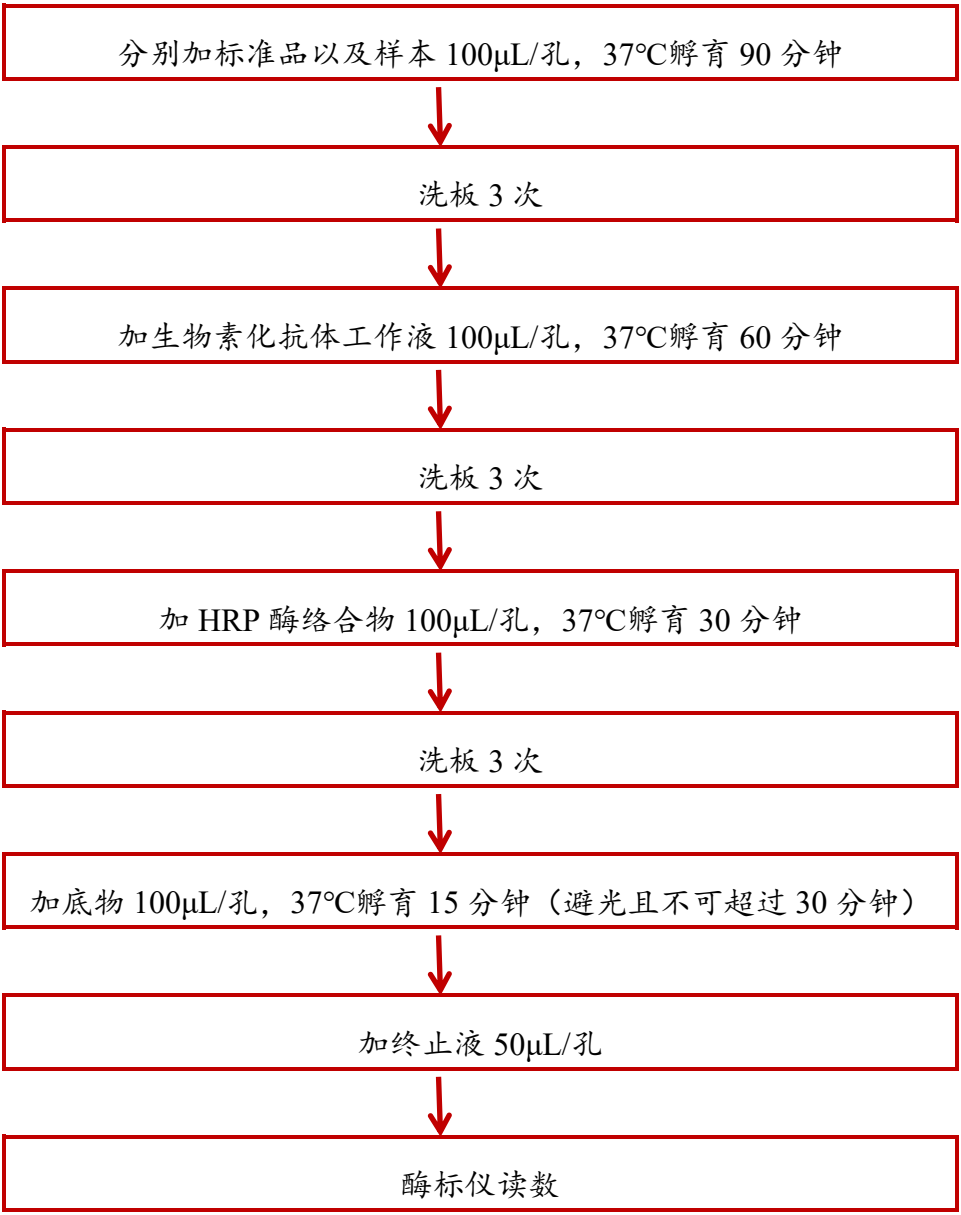
8．**洗板：**甩尽孔内液体，洗板 **3 次**，洗板方法同步骤 4。

9．**加底物：**每孔加底物溶液(TMB)**100μL**，酶标板加上封板覆膜，**37℃**避光孵育 **15 分钟**左右但不可超过 30 分钟。此时可提前 15 分钟打开酶标仪预热。

10．**加终止液：**每孔加终止液 **50μL**，终止反应。提示：终止液的加入顺序应尽量与底物溶液的加入顺序相同。

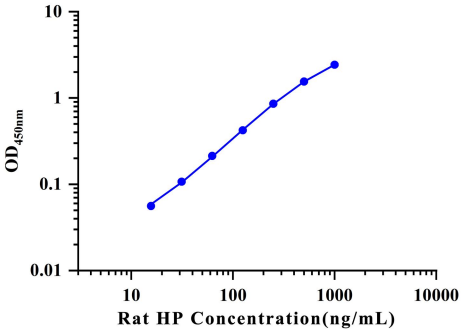
11．**读数：**立即用酶标仪在 **5 分钟**内测定每个孔 **450nm** 的光密度(OD 值)。如果可以选择校正波长，则设置 630nm 或 570nm。并从 450nm 的读数中减去 630nm 或 570nm 的读数，这种方式可以校正并去除非显色物质的 OD 值，获得更准确的检测结果。

操作步骤概要


分别加标准品以及样本 100μL/孔，37℃孵育 90 分钟
洗板 3 次
加生物素化抗体工作液 100μL/孔，37℃孵育 60 分钟
洗板 3 次
加 HRP 酶络合物 100μL/孔，37℃孵育 30 分钟
洗板 3 次
加底物 100μL/孔，37℃孵育 15 分钟（避光且不可超过 30 分钟）
加终止液 50μL/孔
酶标仪读数

典型数据

每次检测，每块酶标板都必须设立标准曲线。下面的标准曲线仅作为示例参考。

ng/mL	Corrected OD	Typtical Standard Curve
0	0	
15.63	0.056	
31.25	0.107	
62.5	0.213	
125	0.422	
250	0.857	
500	1.55	
1000	2.43	

结果计算

计算标准品和样本的平均 OD 值，同时减去 0 孔的 OD 值作为校正值。

以标准品浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，用计算机软件使用非线性四参数方程拟合生成标准曲线，并通过曲线计算样本浓度。(扫描下方二维码，获取标曲拟合以及计算样本浓度操作步骤)

灵敏度

本试剂盒检测大鼠 HP 的最低检测浓度通常小于 9.38 ng/mL。灵敏度（LOD，检测限）是通过计算 20 个空白孔的平均 OD 值加 3 倍标准差，并换算为相应浓度得出的。

精密度

板内精密度：低、中、高浓度样本分别在 1 块板子上检测 20 次。

板间精密度：低、中、高浓度样本分别在 3 块板子上检测 20 次。

结果显示试剂盒变异系数均小于 10%，符合精密度质量控制标准。

特异性

本方法对大鼠 HP 的检测灵敏度高，特异性好。大鼠 HP 及其类似物之间未观察到明显的交叉反应。

回收率

分别往不同样本中添加已知浓度的大鼠 HP，做回收实验，结果显示试剂盒回收率范围和平均回收率为 80-120%，符合回收率质量控制标准。

稀释线性

将添加有大鼠 HP 的样本进行稀释线性实验以评估检测试剂盒的线性，结果显示试剂盒线性范围（%）为 80-120%，符合线性质量控制标准。

声明

1.本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。

2.由于其有效性的不确定性，该试剂盒可能不适合检测某些特殊的实验样品，例如基因敲除实验样品。

3.本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。

4.不同厂家的试剂盒或通过其他方法检测相同的指标可能会产生不一致的结果

5.由于试剂盒中使用的抗体通常是由重组蛋白作为免疫原制备而成，而重组蛋白可能会受限于不同的片段、表达和纯化体系，因此不建议使用此试剂盒来检测重组蛋白。

6.为了获得最佳实验结果，请仅使用我们提供的试剂，并且不要混用不同批次的试剂。

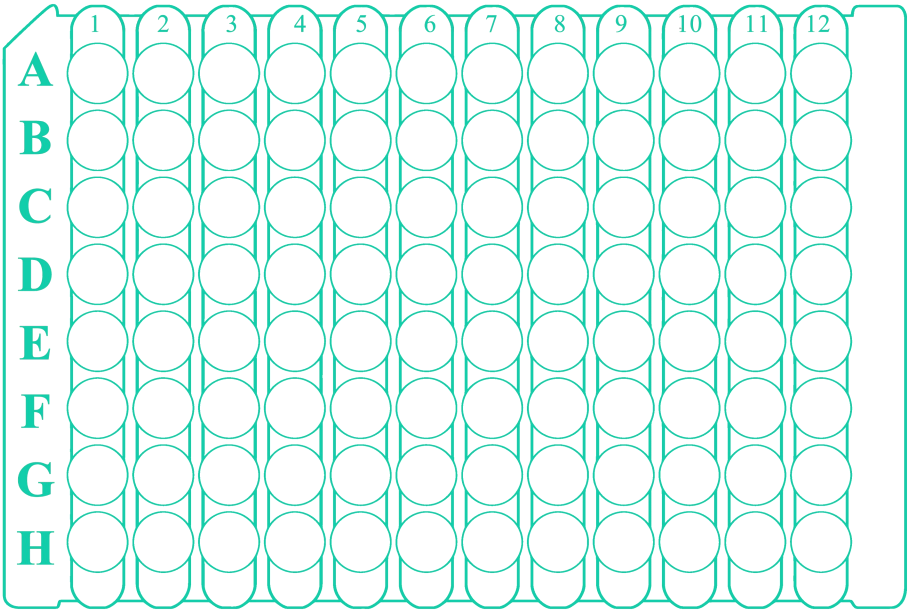
7.由于现有条件和科学技术的局限性，我们无法全面识别和分析供应商提供的原材料。因此，该试剂盒可能存在一定的质量和技术风险。

8.在 ELISA 实验测试所有影响因素之前，不能排除干扰的可能性。

9.为了获得可重复的结果，应严格控制实验中的每个步骤，样品收集、处理和存储的变化也可能导致样品测量的差异。

10.尽管每个试剂盒都通过了严格的质量测试，但由于运输条件和不同实验室设备等影响因素，可能会引起不同批次试剂盒之间检测值的差异。

排版布局



更多资讯和支持请关注菲越生物

微信公众号

技术支持