(仅供科研使用，不得用于临床诊断!)

大鼠抗凝血酶(AT)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。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

官方热线：025-5229-8998

技术电话：15950492658

销售部电话：13914481711

公司网址：www.njbybio.com

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。

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。

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 7.813 ng/mL。

回收率：回收率在 85%-115%之间。

敏感性：本试剂盒识别天然大鼠抗凝血酶(AT)，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：31.25 ng/mL – 1000 ng/mL。

用途：用于检测血清、血浆、细胞培养上清液等样本中大鼠抗凝血酶(AT)的浓度。

实验原理

本试剂盒采用双抗体夹心两步法酶联免疫吸附试验（ELISA）。在预包被抗大鼠抗凝血酶(AT)抗体（固相抗体）的微孔酶标板中，加入大鼠抗凝血酶(AT)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体-抗原-生物素标记抗体-亲和素酶的夹心复合物。加显色液 TMB，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）与待测样品中大鼠抗凝血酶(AT)的浓度正相关。拟合校准品曲线，可以计算出样本中大鼠抗凝血酶(AT)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	2 vial	标准品冻干粉	2-8℃，复溶后当天使用
标准品复溶液	2 vial	PBS	2-8℃180 天
校准品&样本 稀释液	30mL	PBSTN	2-8℃180 天
包被微孔板	96T/48T	预包被固相抗体	2-8℃14 天
生物素抗体	10mL	生物素抗体	2-8℃14 天
HRP 标记亲和素	10mL	HRP 标记亲和素	2-8℃14 天
显色底物（TMB)	10mL	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	--	--

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。

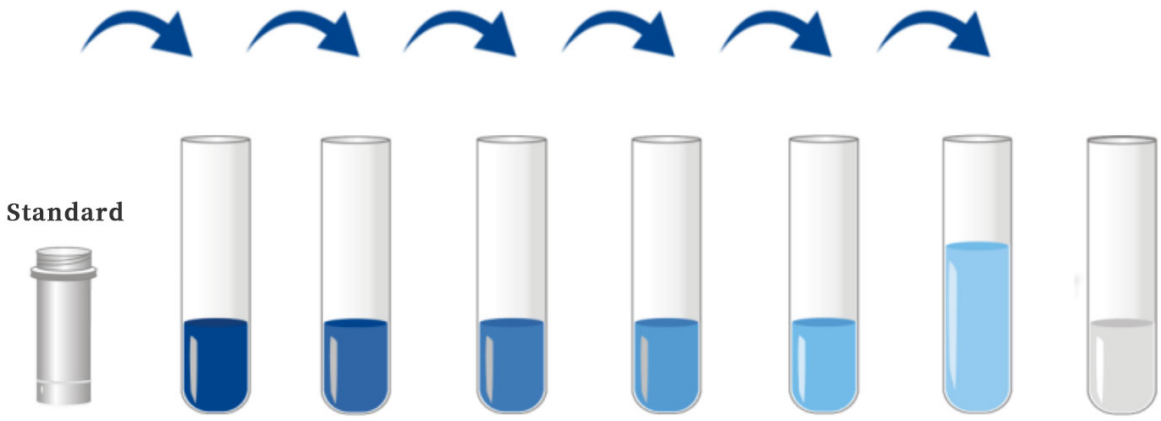
浓缩洗涤液：从冰箱取出的浓缩洗涤液，会有结晶产生，这属于正常现象，水浴加热使结晶完全溶解。浓缩洗涤液与蒸馏水，按 1:20 稀释，即 1 份的浓缩洗涤液，添加 19 份的蒸馏水。

标准品稀释方法：

标准品重溶步骤：将标准品于 10000×g 离心 1 分钟，用标准品复溶液重溶标准品，每管标准品重溶体积为 1 整管的标准品复溶液体积。轻柔地涡旋震荡，确保充分混匀，重溶后标准品的母液浓度为 2000 ng/mL,稀释前充分混匀。

标准品母液稀释步骤：稀释前标准品工作液静置 1-2 分钟，用标准品&样本通用稀释液将标准品母液进行倍比稀释，倍比稀释方法：取 7 支 EP 管，每管中加入 500 μL 标准品&样品稀释液，从 2000 ng/mL 的标准品母液中吸取 500 μL 到第一支 EP 管中混匀配成 1000 ng/mL 的标准品工作液，按此步骤往后依次吸取混匀。如下页图示。提示：最后一管直接加入标准品&样本通用稀释液作为 0 值，不需要再从倒数第二管中吸取液体。倍比稀释的标准品作液需要现配现用。

标准品建议稀释浓度：建议配制成以下浓度：1000、500、250、125、62.5、31.25、0 ng/mL，并作为拟合标曲的标准品浓度值。



2000 ng/mL

操作程序

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。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 60min。

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 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。

6、重复步骤 4。

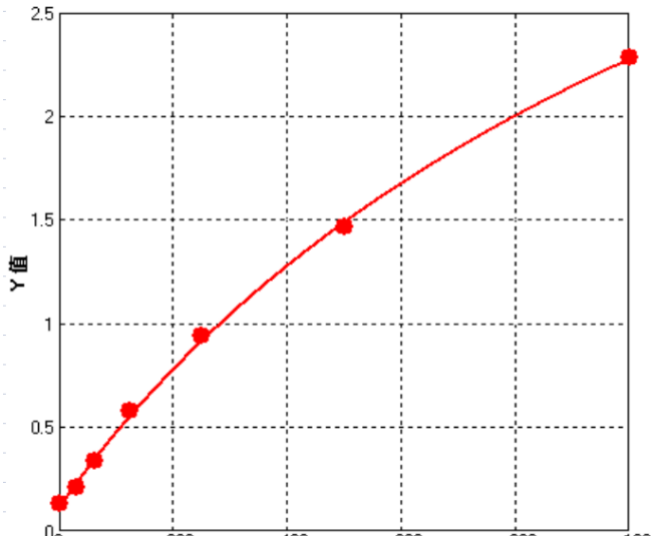
7、所有孔中加入底物显色液 100μL。用封板膜盖住反应板，37℃水浴锅或恒温箱避光温育 15min。

8、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

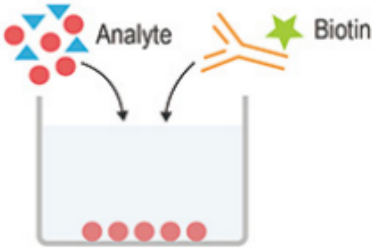
9、以标准品浓度做为横坐标，对应的吸光度（OD 值）作为纵坐标，利用计算机软件，采用四参数 Logistic 曲线拟合（4-pl），创建标准曲线方程，通过样本的吸光度（OD 值），利用方程计算样品的浓度值。【用 ELISA Calc 软件计算】

10、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。

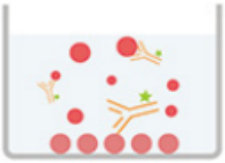


（示意图，仅供参考）

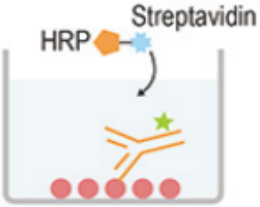
[操作概要]



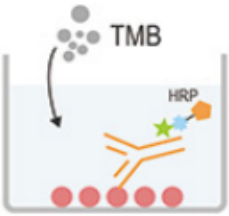
1. 对应板孔中加入 50μL 标准品工作液或样本后，立即每孔加入 100μL 生物素化抗体工作液，37℃孵育 60 分钟。



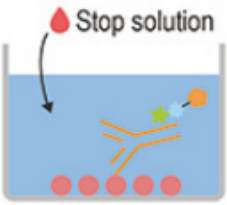
2. 弃掉板内液体，洗板 5 次.



3. 每孔加入 100μL HRP 酶结合物工作液，37℃孵育 20 分钟，弃掉板内液体，洗板 5 次。



4. 每孔加入 100μL 显色底物混合溶液，37℃孵育 15 分钟。



5. 每孔加入 50μL 终止液。

6. 立即在 450nm 波长下读数，处理数据

[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

[声明]

1. 限于现有条件及科学技术水平，尚不能对所有原料进行全面的鉴定分析，本产品可能存在一定的质量技术风险。

2. 本试剂盒在研发过程中去除/降低了生物学样本中的一些内源性干扰因素，并非所有可能影响的因素均已去除。

3. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及当时的实验环境等因素密切相关，本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，请使用者使用前充分考虑到样本可能的使用量，预留充足的样本。

4. 为了达到好的实验结果，请只使用本公司试剂盒内提供的试剂，不要混用其他制造商的产品，严格按照说明书操作。

5. 由于操作过程中试剂制备以及酶标仪参数设置不正确，可能导致结果异常，实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器。

6. 即使是相同人员操作也可能在两次独立实验中得到不同的结果，为保证结果的重现性，需要控制实验过程中每一步的操作。

7. 试剂盒发货前会经过严格的质检，然而，因为运输条件、实验设备差异等等因素影响，用户检测结果可能跟出厂数据不一致。

8. 本试剂盒未与其他厂家同类试剂盒或不同方法检测同一目的物的产品进行对比，所以不排除检测结果不一致的情况。

9. 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。