

本产品仅用于科学研究，非诊断试剂，不能用于临床诊断。

鱼碱性磷酸酶（ALP； AKP）ELISA 试剂盒

使用说明书

【产品名称】

中文名称：鱼碱性磷酸酶（ALP； AKP）酶联免疫试剂盒（ELISA）

英文名称： Fish alkaline phosphatase（ALP； AKP） ELISA KIT

【包装规格】

48人份/盒，96人份/盒

【预期用途】

定量检测血清、血浆、细胞培养上清和组织等样本中的鱼碱性磷酸酶（ALP； AKP）浓度。

一、产品介绍

1. 检测原理

本试剂盒采用双抗体夹心酶联免疫吸附试验（ELISA）。在预包被抗鱼碱性磷酸酶（ALP； AKP）抗体（固相抗体）的微孔酶标板中，加入鱼碱性磷酸酶（ALP； AKP）标准品和待测样本，再加入另一株HRP标记的抗鱼碱性磷酸酶（ALP； AKP）抗体（HRP标记抗体），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体-抗原-HRP标记抗体的夹心复合物。加入显色底物A和B，底物在HRP催化下，产生蓝色产物，在终止液（2M 硫酸）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）与待测样品中鱼碱性磷酸酶（ALP； AKP）的浓度正相关。拟合标准品曲线，可以计算出样本中鱼碱性磷酸酶（ALP； AKP）的浓度。

2. 试剂盒检测的局限

- 1) 仅供科研使用，不得用于临床诊断
- 2) 请在本试剂盒标示的有效期内使用。
- 3) 试剂盒的试剂不能与其他批号的试剂或其他来源的试剂混合使用。
- 4) 任何操作人员、移液技术、洗涤技术、孵育温度、试剂盒保存时间的改变，都将影响结合反应。
- 5) 本试剂盒在设计上去除或降低了生物学样本中的一些内源性干扰因素，并非所有可能的影响因素都已经去除。

二、基本信息

1. 试剂盒提供的材料

组分	48孔配置	96孔配置	备注
预包被酶标板	48T	96T	无
标准品	0.3mL*6管	0.3mL*6管	无
稀释液	3 ml	6 ml	无
HRP 标记抗体	5 ml	10 ml	无
显色底物 A	3 ml	6 ml	无
显色底物 B	3 ml	6 ml	无
终止液	3 ml	6 ml	无
20×洗液	25 ml	25 ml	按说明书进行操作
封板膜	2张	2张	无
说明书	1份	1份	无
自封袋	1个	1个	无

备注：

- 1) 标准品浓度依次为：20、 10、 5、 2.5、 1.25、 0.625 IU/L。
- 2) 经过大量正常标本检验，标本的正常浓度值均在试剂盒提供的检测范围内，实验过程中直接取 50 μ L 样本上样即可。当有部分样本值超过最大标准品浓度时，可用样本稀释液将标本进行适当稀释后再进行实验。
- 3) 盒子拆封后必须在一个月内使用完；试剂瓶盖须旋紧以防止蒸发和微生物的污染；相关试剂在分装时会比标签上标明的体积稍多一些，具体含量以实际收到的实物为主。

2. 未提供的材料设备

- 1) 能够检测 450 nm 吸光度的酶标仪
- 2) 移液器及枪头、加样槽
- 3) 3. 37℃恒温箱或水浴锅
- 4) 准备试剂用的试管、离心管、量筒等
- 5) 蒸馏水或去离子水
- 6) 涡旋振荡器、微孔板振荡器

3. 贮存

试剂盒保存于 2 - 8℃，有效期标注于标签上（有效期一般是6个月）。只有恰当保存的试剂才是有保证的。如果试剂盒的组分需要再次使用，请确保上一次使用之后没有被污染。

未开封试剂盒		贮存于 2 - 8℃。 请在有效期内使用。
打开的 试剂盒 或重组 试剂	显色底物A 显色底物B 终止液 20×洗液 样本稀释液	在 2 - 8℃， 大约可以贮存 3个月。
	标准品 HRP 标记抗体	在 2 - 8℃，大约可贮存 14天。 使用后丢弃。
	预包被酶标板	未使用的板条请放回铝箔袋，封好封口。在 2 - 8℃，大约可贮存 14天。

4. 注意事项

- 1) 所有的化学试剂理应被认为具有潜在危害。
- 2) 推荐只有经过良好实验室培训的工作人员方可操作本试剂盒。操作时请佩戴合适的防护设施，例如白大衣、乳胶手套、安全眼镜等。

- 3) 请避免试剂接触皮肤和眼睛。如不慎接触, 请立即用大量清水清洗。
- 4) 试剂盒中的终止液为酸性溶液, 在使用终止液时, 请佩戴防护服, 及防护眼睛、手及面部的设施。
- 5) 本试剂盒用于科学研究, 不能用于诊断治疗。
- 6) 请不要使用过期的试剂。
- 7) 在试剂盒的贮存或孵育过程请避免强光照射。
- 8) 在操作试剂盒或处理样本时请佩戴乳胶或一次性手套。
- 9) 为了避免微生物的污染, 以及试剂与样本间的交叉污染, 请使用一次性枪头。
- 10) 使用干净的容器配制试剂。
- 11) 试剂的准备必须使用蒸馏水或去离子水。
- 12) 显色底物在使用之前必须平衡至室温。
- 13) 液体废弃物的处理。不含酸的液体废弃物, 加入 1.0 %的次氯酸钠, 浸泡 30 分钟。含酸的液体废弃物, 请先中和, 再加入次氯酸钠。

5. 技术要点

- 1) 加校准品与样本时, 每个校准品浓度和样本都要更换移液枪头, 公共组分应该悬臂加样, 避免交叉污染。
- 2) 在应用自动洗板机时, 加入洗液之后, 设置 30 秒的浸泡程序, 或者在不同的洗涤步骤将微孔板掉转 180 度, 这样可以提高分析的准确度。
- 3) 为保证结果的精确性, 孵育时封好封板膜。
- 4) 显色底物在添加之前应是无色的。保持显色底物始终处于避光态。
- 5) 终止液的添加顺序应与显色底物的添加顺序相同。
- 6) 添加终止液之后, 底物的颜色应由蓝色转变为黄色。如果底物呈现绿色, 说明终止液与显色底物没有充分混匀。
- 7) 在任何情况下, 避免接触微孔板的内表面。
- 8) 实验中, 用剩的板条, 应立即放回自封袋中, 密封(低温干燥)保存。

三、检测准备与步骤

1. 样本采集与贮存

细胞培养上清

2000 × g条件下离心20分钟, 去除细胞颗粒和聚合物, 上清液保存在- 20℃以下, 避免反

复冻融。

血清样本

离心管收集血清。血样凝集 30 分钟后， $2000 \times g$ 离心 10 分钟。吸取血清样本之后即刻检测，或者分装， -20°C 以下贮存，避免反复冻融。

血浆样本

EDTA、枸橼酸钠或肝素抗凝收集血浆样本。 $2000 \times g$ 离心 20 分钟收集样本。即刻检测，或者分装， -20°C 以下贮存，避免反复冻融。

组织样本

用预冷的PBS (0.01 M, pH=7.4) 冲洗组织，去除残留血液，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9 mL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，在冰上充分研磨。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 $5000 \times g$ 离心 5-10分钟，取上清检测。

细胞提取液样本

贴壁细胞用冷的PBS轻轻清洗，然后用胰蛋白酶消化， $1000 \times g$ 离心5分钟后收集细胞；悬浮细胞可直接离心收集。收集的细胞用冷的PBS 洗涤3次。每 1×10^6 个细胞中加入150-200 μL PBS重悬并通过反复冻融使细胞破碎(若含量很低可减少PBS的体积)。将提取液于 $1500 \times g$ 离心 10分钟，取上清检测。

注意：1) 避免样本的反复冻融，在检测前，冷冻样本应缓慢地恢复至室温，轻柔混匀。

2) 本试剂盒可能适用于其它生物学样本，但是未充分验证。

2. 试剂准备

1) 用前，所有的组分都要至少复温30min，确保充分复温到室温。

2) 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。

3. 检测步骤

1) **试剂、样本平衡：**检测之前请将所有的试剂、样本平衡至室温，标准品、质控品和样品，建议做复孔。

配置工作液：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。

2) **加标准品、样本：**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50 μL ，样本孔加待测样本50 μL ，空白孔不加。

3) **加 HRP 标记抗体：**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100 μL 。

4) **孵育：**使用封板膜封板，37℃水浴锅或恒温箱温育60分钟。

5) **洗涤：**弃掉液体，每孔加入300 μL 洗液洗板，静置20s，洗涤5次。每次洗板，在吸水纸上拍干。为获得理想的实验性能，必须彻底移除残留液体。

6) **加底物显色：**每孔加入50 μL 显色底物A、B 各50 μL ，37℃水浴锅或恒温箱温育15分钟。

7) **加终止液：**每孔加入50 μL 终止液。颜色由蓝色变为黄色。如果颜色呈现绿色或者颜色的变化明显不均匀，请轻轻叩击板框，充分混匀。

8) **检测读数：**在 15分钟之内，使用450nm酶标仪进行检测读数。

4. 废物处理

所有使用或未使用的试剂，所有污染性的一次性材料，应当遵循传染性或潜在传染性产品的处理程序，每个实验室都有责任根据其实验的类型和危险性级别，进行废物和污物的处理，同时要严格依照有关规定对待所有的废物和污物。

四、分析

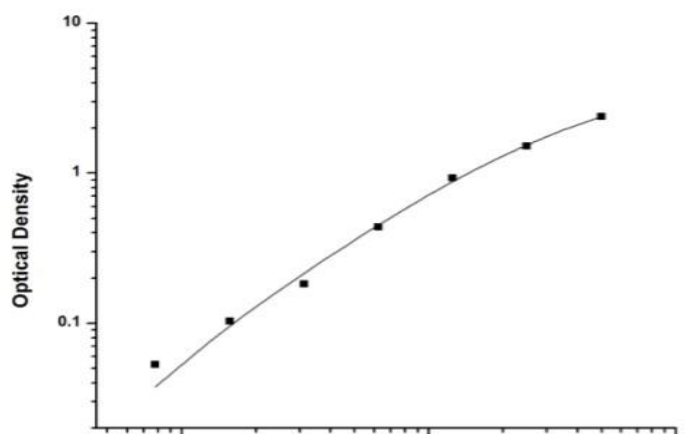
1. 结果计算

1) 复孔的值通常在20%的差异范围内结果才有效，复孔平均值可作为测量值。

2) 每个标准品或样品的吸光度值应减去本底校正孔的吸光度值(如果没有做校正孔，则不需要减去)。

3) 检测完成后，以标准品浓度做为纵坐标，对应的吸光度(OD值)作为横坐标，利用计算机软件，采用多项式曲线拟合，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。

4) 如果样品被稀释，通过上述方法测得的浓度值，要乘以稀释倍数，才是样品的最终浓度。



(示意图, 仅供参考)

2. 试剂盒的性能

1) 物理性能

试剂盒的各液体组分应澄清透明、无沉淀或者絮状物。微孔板铝箔袋应真空包装，无破损漏气。

2) 剂量反应曲线线性

标准品剂量反应曲线相关系数r值，大于等于0.99。

3) 精密度

批内精密度：三组已知的高、中、低浓度样品，进行二十次在不同板块内精度评估。批内变异系数CV%小于8%。

批间精密度：三组已知的高、中、低浓度样品，进行二十次在不同板块内精度评估。批间变异系数CV%小于12%。

4) 检测范围

0.625 IU/L - 20 IU/L

5) 灵敏度

最低可检测浓度为0.1 IU/L。

6) 特异性

本试剂盒识别天然和重组鱼碱性磷酸酶（ALP；AKP）。

7) 稳定性

2℃-8℃保存，有效期6个月。

说明

由于现有条件及科学技术水平尚不能对所有供货商提供的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。

1. 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密切相关，请务必准备充足的标本备份。
2. 不同批次的同一产品可能会有少许差别，如：检测限、灵敏度以及显色时间等，请依据试剂盒内说明书进行实验操作，网站电子版说明书仅作参考。
3. 只有全部使用本试剂盒配套试剂才能保证检测效果，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。
4. 本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用该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的可能使用量，预留充足的样本。
5. 使用化学裂解液制备的组织匀浆或细胞提取液可能会由于某些化学物质的引入导致ELISA实验结果偏差。
6. 若样本为细胞培养上清，因该类样本干扰因素较多，如：细胞状态、细胞数量、采样时间等，所以可能存在检测不出的情况。
7. 某些天然蛋白或重组蛋白，包括原核及真核重组蛋白，可能因为与本产品所使用的检测抗体及捕获抗体不匹配，而不被检测出。