

本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断！

FineTest®

蛋白 A(Protein A)ELISA 试剂盒

Protein A Elisa Kit

产品货号：EU2662

版本号：V4.0

包装规格：96T

请勿将不同货号、不同批次号的试剂混用，否则试剂盒将无法正常工作
使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，可通过以下方式联系我们：

销售部电话 027-86697005

技术部电话 18064071591（ELISA 售后）

技术部电话 18107218793（ELISA 售前）

电子邮箱 sales2@fn-test.com

网 址 <https://www.fn-test.cn/>

复购时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

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。

如有更大包装需求可定制。

武汉菲恩生物科技有限公司.

湖北省武汉市东湖新技术开发区高新二路 388 号武汉光谷国际生物医药企业加速器 1.2 期 C22 栋一层、二层(430206)

适用种属: Universal

检测范围: 78.125-5000pg/ml

适用范围: 此 Protein A ELISA 检测试剂盒用于定量检测重组耐碱性蛋白 A，只能用于科研和生产，不能应用于人或动物疾病的诊断、治疗。本试剂盒提供一种样品的酸化处理方法，把蛋白 A 从 IgG 中分离出来，在人源化单抗浓度高达 3mg/mL 的情况下，蛋白 A 的检测限可至 78pg/mL 以下。

检测原理

本试剂盒采用双抗体夹心 ELISA 法，实验时长 2 小时。试剂盒中的酶标板已预先包被抗 Protein A 的抗体。将生物素-检测抗体加入孔板中，然后将酸化处理的标准品、适度稀释的待测样品分别加入相应孔中，孵育后洗去未结合的成分。加入 HRP-链霉亲和素(SABC)。再洗去未结合的成分，加入 TMB 显色底物，TMB 在辣根过氧化物酶(HRP)的催化下呈现蓝色，加反应终止液后变成黄色。用酶标仪在 450 nm 波长测 OD 值。通过绘制标准曲线计算样品中 Protein A 的浓度。目的物质的浓度与 OD450 值之间呈正比。

各组件及开启后保存条件

未启封的试剂盒，请保存在 2-8°C。开启后，保存条件见如下表格所示：

组件	名称	规格(96T)	开启后保存条件
E001	Elisa 酶标板(可拆卸) ELISA Microplate(Dismountable)	8 孔×12 条	将未使用的孔放入拉链铝箔袋中，并加入干燥剂，密封保存。可在 2-8°C 保存 1 个月
E002	浓缩标准品 Concentrated Standard	1 支/0.1ml	2-8°C (避光) 2-8°C
E003	生物素-抗体工作液 Biotin-labeled Antibody (Ready to use)	1 瓶 12ml	
E034	HRP-链霉亲和素工作液 HRP-Streptavidin (Ready to use)	1 瓶 12ml	
E024	TMB 显色底物 TMB Substrate	1 瓶 12ml	
E039	样品稀释液 Sample Dilution Buffer	1 瓶 30ml	
E035	酸化缓冲液 Denaturing Buffer	1 瓶 12ml	
E026	反应终止液 Stop Solution	1 瓶 12ml	
E038	浓缩洗涤液 10X Wash Buffer 10X	1 瓶 30ml	
E006	覆膜	5 张	
E007	说明书	1 份	

注意：试剂瓶内提供的液体试剂体积比标签标明的稍多。请使用移液器精确量取并做相应比例稀释。

所需器材和试剂

- 1、酶标仪(波长 450nm 滤光片)
- 2、自动洗板机或多道移液器/5ml 滴管(手工洗板用)
- 3、精密的单道(0.5-10 μ L, 5-50 μ L, 20-200 μ L, 200-1000 μ L)和多通道移液器(移液器使用前需校准)。
- 4、无菌的 EP 管及一次性吸头
- 5、吸水纸及加样槽
- 6、去离子水或蒸馏水

检测前试剂准备

提前 20 分钟从冰箱中取出试剂盒，平衡到室温(18-25°C)。如果试剂盒需分多次使用，请仅取出本次实验所需的酶标板条及标准品，剩余酶标板条和标准品需按指定条件保存。

1、洗液:

用去离子水或蒸馏水(推荐电阻率为 18M Ω 的超纯水)将 30ml 浓缩洗涤液稀释至 300ml 并混匀。或依实验所需，取适量浓缩洗涤液稀释至 10 倍体积并混匀，将未使用的溶液放回 2-8°C。

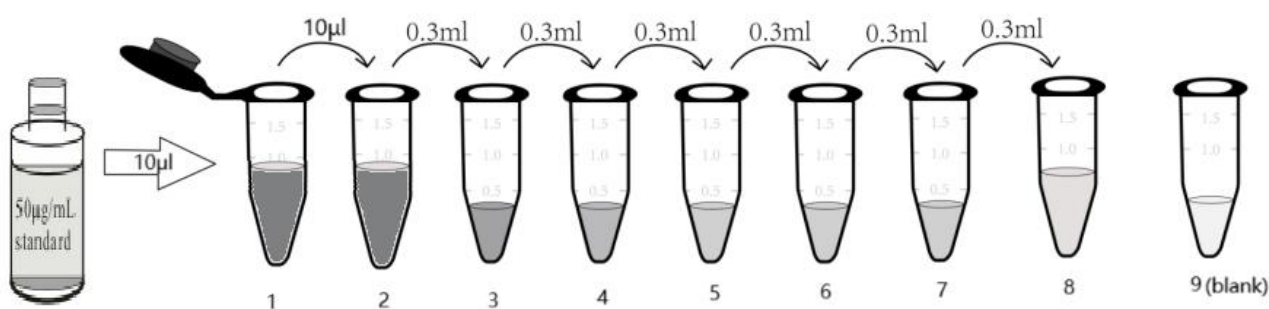
如果浓缩的洗涤液中形成了晶体，可以在 40°C 水浴中加热(加热温度不应超过 50°C)，直至晶体完全溶解，混匀后使用。

配制好的洗液，最好当天使用完，用不完的，可以保存在 2-8°C，不超过 48 小时。

2、标准品:

2.1、浓缩标准瓶的浓度为 50 μ g/mL，0.1ml

2.2、梯度稀释：取 9 个 EP 管，分别标记为 1-9 号管。取 990 μ L 样品稀释液加入到 1 和 2 管中，再取 300 μ L 样品稀释液加入到 3-9 号管中。取 10 μ L 浓缩标准品加入到 1 号管中，涡旋混匀后取 10 μ L 加入到 2 号管中涡旋混匀。然后取 2 号管 300 μ L 液体加入到 3 号管中涡旋混匀，再取 3 号管 300 μ L 液体至 4 号管中涡旋混匀，如此直至 8 号管。注意 9 号 EP 管中仅有样品稀释液。此时，从 2 号管到 9 号管这 8 个 EP 管中标准品的浓度分别为 5000pg/ml, 2500pg/ml, 1250pg/ml, 625pg/ml, 312.5pg/ml, 156.25pg/ml, 78.125pg/ml, 0pg/ml。标准品和样品准备好之后就进入样品处理程序。



Prepare standard solutions

3、样品处理

3.1、样品如需稀释，请用试剂盒内的样品稀释液在 96 孔板或 EP 管中进行稀释。

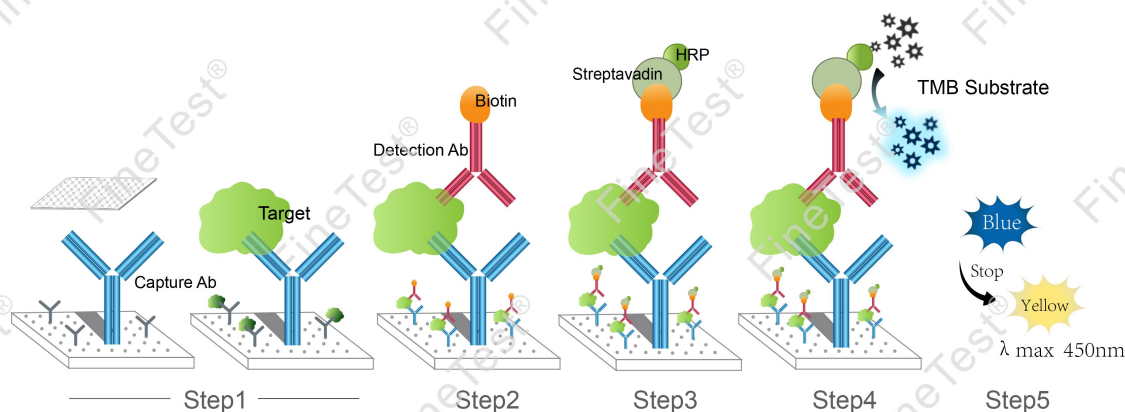
3.2、向每个样品处理孔（管）加入体积 100 μ L 的代测样本。

3.3、加入 100 μ L 的标准品和质控品到对应孔（管）内。

3.4、每个孔再加入 50 μ L 酸化液，用以移液器吹打至少 15 次混匀（如果用 EP 管，可将 EP 管涡旋数秒）。

3.5、室温放置 5-10min（使样品中 proteinA 和抗体酸化分离）。

操作步骤概要



步骤 1: 向孔中加入 100ul 生物素-抗体工作液，再加入 25ul 酸化处理好的标准品、样品、质控品和空白到对应的孔中。贴上覆膜，室温静置孵育 60 分钟。

洗板: 洗板 4 次。拍干。

步骤 2: 加入 100ul HRP-链霉亲和素(SABC)工作液，贴上覆膜，室温静置孵育 10 分钟。

洗板: 洗板 4 次。拍干。

步骤 4: 添加 100ul TMB 显色底物。贴上覆膜，室温静置孵育 10-20 分钟(请使用 TMB 显色精准控制方法)。

步骤 5: 添加 100ul 反应终止液。立即在 450nm 处读取 OD450 值并计算。

详细操作步骤

稀释样品和试剂时，需将它们完全混合。建议每次测试都绘制标准曲线。

- 1、 设定标准品孔、样品孔、空白孔，并记录其位置。为减小实验误差，建议将标准品和样品设置复孔。
- 2、 **加样:** 向每孔加入 100ul 生物素-抗体工作液，再向标准品孔中加入 25ul 酸化处理好的各梯度标准品，向样品孔中加入 25ul 适度稀释并酸化处理好的待测样品，向空白孔中加入 25ul 酸化处理好的样品稀释液。贴上覆膜，并在室温静置孵育 60 分钟。
- 3、 **洗板 4 次:** 取下覆膜，吸去或甩掉酶标板内的液体，在洁净的吸水纸上拍 2-3 次。每孔加入洗涤缓冲液 250ul，弃掉孔内液体，在吸水纸上拍 2-3 次。重复此洗板步骤 4 次。
- 4、 **加 HRP-链霉亲和素(SABC):** 向每孔加入 100ul SABC 工作液。贴上覆膜，室温静置孵育 10 分钟。
- 5、 **洗板 4 次:** 取下覆膜，用洗涤缓冲液洗 4 次，方法参考步骤 3。
- 6、 **加 TMB 显色底物:** 向每孔加入 100ul TMB 显色底物，贴上覆膜，在室温避光静置孵育 10-20 分钟。打开酶标仪预热 15min。(注意：不可使用配制 HRP 偶联物的加样槽。显色根据颜色的实际变化，反应时间可以缩短或延长，但不能超过 30 分钟。当标准孔中出现较好的蓝色梯度时，可以终止反应。显色强度不易太弱或过强，精准控制显色方法请查阅说明书第二页相关文件及二维码)
- 7、 **加反应终止液:** 显色后，孔内液体不可弃掉，向每孔加入 100ul 反应终止液。颜色将由蓝色立即变为黄色。添加终止液的顺序与添加 TMB 底物的顺序相同。
- 8、 **OD 值的测量:** 立即用酶标仪在 450nm 处读取 OD450 数值。(如果您的酶标仪有可以选择的校正波长，则设置为 570nm 或 630nm。校正读数值为 OD450 的值减去 OD570 或 OD630 的值。这种方式可以校正并去除非显色物质的 OD 值，从而获得更准确的检测结果。如果酶标仪没有 570nm 或 630nm 波长，则可使用原始 OD450 值。)

结果计算

- 1、取标准品和样品复孔的平均 OD450 值（使用原始 OD450 值或校正读数值），再减去空白孔的 OD450 值，作为计算值。
- 2、以浓度为横坐标，OD450 值为纵坐标，可使用四参数方程 4PL 绘制标准曲线(作图时去掉空白孔的值)。也可使用酶标仪自带的作图软件(如 Thermo FC 型号酶标仪 SkanIt RE 软件)，或 Curve Expert 1.3 or 1.4 专业软件(本公司网站可以免费下载使用)绘制标准曲线。
- 3、将样本的 OD450 值代入标准曲线，即可计算得到样品的浓度值。如果样品被稀释过，则需乘以相应的稀释倍数。

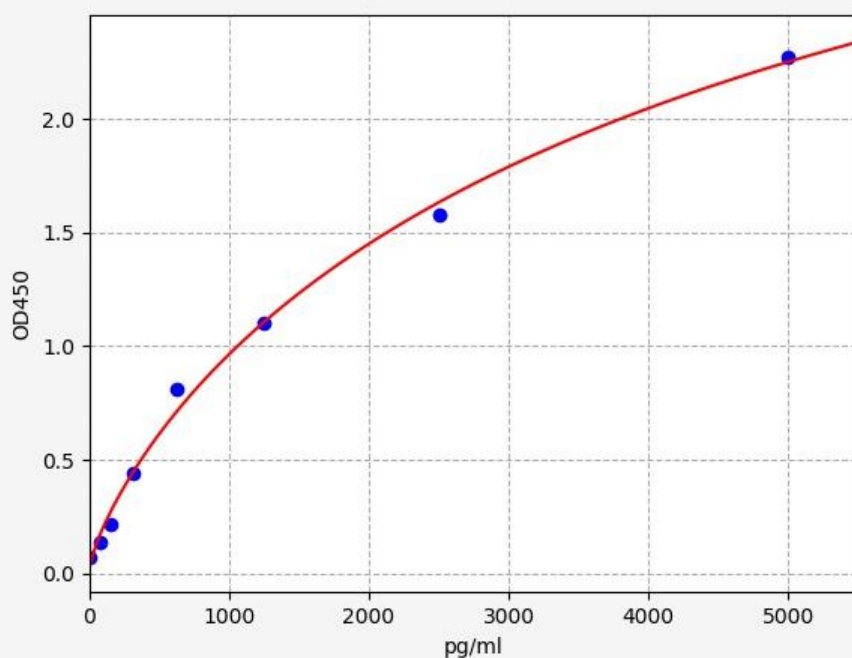
不同方法绘制标准曲线的说明

- 1、线性图：一个坐标轴表示抗原的浓度，另一个表示读数 OD450 值。 R^2 值在此通常用于确定拟合，数值大于 0.99 表示拟合非常好。然而，线性图往往会压缩曲线下端上的数据点，导致计算结果不准确。
- 2、半对数图：帮助抵消线性图引起的下端压缩。半对数图使用浓度的对数与读数的关系。这种方法通常会得到数据点分布更均匀的 s 形曲线。
- 3、对数/双对数图：为低到中浓度范围提供良好的线性。但范围的高端则容易失去线性。
- 4、四或五参数方程(4PL 或 5PL)曲线：方法更复杂，考虑了其他参数，比如最大值和最小值，因此需要更复杂的计算。4PL 假设拐点周围对称，而 5PL 考虑了不对称的情况，通常更适合免疫分析。如果您的软件允许，则 4-PL 和 5-PL 将适用于大部分 ELISA 校正标准曲线。

实验数据及标准曲线

因具体实验环境及操作存在差异，以下实验数据和标准曲线仅供参考，实验人员需根据自己的实验建立标准曲线。

STD.(pg/ml)	OD-1	OD-2	Average	Corrected
0	0.07	0.072	0.071	0
78.125	0.136	0.14	0.138	0.067
156.25	0.214	0.22	0.217	0.146
312.5	0.433	0.445	0.439	0.368
625	0.799	0.823	0.811	0.74
1250	1.084	1.116	1.1	1.029
2500	1.556	1.602	1.579	1.508
5000	2.24	2.304	2.272	2.201



结果分析：

- 1、精密度：在样品浓度大于 300pg/ml 的时候，检测变异系数小于 10%；样品浓度小于 300pg/ml 的时候，检测变异系数略大于 10%。
- 2、建议检测具体样品的时候，采用添加质控品的方法来监测样品基质效应对检测结果的影响。
- 3、本试剂盒的灵敏度为 20pg/ml。
- 4、勾状效应：本试剂盒是双抗夹心一步法，产生勾状效应的浓度为 10μg/ml。

声明

- 5、 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。
- 6、 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。
- 7、 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。
- 8、 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。
- 9、 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。
- 10、 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。
- 11、 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。不同批次间试剂盒间的差异也可能来自上述原因。
- 12、 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。
- 13、 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。