

注：如若标准品发生部分潮解，此为保存条件变化所致，并不影响组分的使用。标准品稀释液中可能会观察到蛋白沉淀，该沉淀不影响使用，可以忽略，或者可通过6,000×g离心5分钟去除沉淀。

【检测方法】

1) 将不需要的板条拆卸下来，放回装有干燥剂的铝箔袋，重新封好封口。在任何情况下，避免接触微孔板的内表面。

2) 每个酶标板上待用的孔加入300µl 1×洗液静置浸泡30秒。弃掉洗液之后，在吸水纸上将微孔板拍干。洗板完成之后，请立即使用微孔板，不要让微孔板干燥。

3) 加标准品：标准品孔加入100µl 2倍比稀释的标准品。空白孔加入100µl标准品稀释液(血清/血浆样本)或培养基(细胞培养上清样本)。

4) 加样本：**血清/血浆**：样本孔加入100µl预稀释的样本。**细胞培养上清**：样本孔加入100µl细胞培养上清。

5) 加检测抗体：每个待测孔加入50µl“检测抗体工作液”(参见试剂准备)。

6) 应保证标准品、样本和检测抗体的加样在15分钟内完成，是连续的，不能间断。

7) 孵育：使用封板膜封板。100-300转/分钟振荡（保证每孔溶液不撒出且能充分混匀即可），室温（25℃±3℃）孵育2小时。**孵育时均应封好封板膜。**

8) 洗涤：弃掉液体，每孔加入300µl洗液洗板，洗涤6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。

9) 加酶：每孔加入100µl“链霉亲和素工作液”(参见试剂准备)。

10) 孵育：使用新的封板膜封板。100-300转/分钟振荡（保证每孔溶液不撒出且能充分混匀即可），室温（25℃±3℃）孵育45分钟。

11) 重复步骤8）。

12) 加底物显色：每孔加入100µl显色底物，避光，室温（25℃±3℃）孵育5-30分钟。

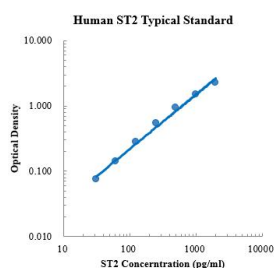
13) 加终止液：每孔加入100µl终止液。颜色由蓝色变为黄色。如果颜色呈现绿色或者颜色的变化明显不均匀，说明终止液与显色底物没有充分混匀，请轻轻叩击板框，充分混匀。**终止液的添加顺序应与显色底物的添加顺序相同。**

14) 检测读数：在30分钟之内，使用酶标仪进行双波长检测，测定450nm最大吸收波长和570nm或630nm参考波长下的OD值。校准后的OD值为450nm的测定值减去570nm或630nm的测定值。仅使用450nm测定会导致OD值偏高，并且准确度降低。

【标准曲线示例】

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。

| pg/ml | O.D. | Average | Corrected |
|---------|-------|---------|-----------|
| 0.00 | 0.032 | 0.031 | 0.032 |
| 31.25 | 0.103 | 0.108 | 0.106 |
| 62.50 | 0.177 | 0.167 | 0.141 |
| 125.00 | 0.336 | 0.292 | 0.283 |
| 250.00 | 0.603 | 0.526 | 0.533 |
| 500.00 | 0.905 | 0.949 | 0.941 |
| 1000.00 | 1.562 | 1.502 | 1.501 |
| 2000.00 | 2.269 | 2.277 | 2.273 |



【技术要点】

双抗夹心法ELISA试剂盒如何控制标曲显色？

5-30分钟显色时间为经验范围，每个具体的实验，可根据以下情况，确定大致的显色时间：

1) 肉眼观察：标曲S5孔有淡蓝色、Blank孔无明显蓝色时，即可终止；

2) 仪器判断：630nm左右波长下，标曲S1孔的OD值达到0.5-0.7、S5孔的OD值达到0.05-0.08、Blank孔的OD值小于0.05时，即可终止；

3) 高敏系列试剂盒因灵敏度更高，需严格控制显色时长，可较普通试剂盒适当缩短显色时间。

【局限性】

1) 任何标准品稀释、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。

2) 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。

【注意事项】

1) 本试剂盒用于科学研究，不能用于诊断治疗。

2) 所有的样本和试剂被认为具有潜在危害。实验时佩戴乳胶或一次性手套等防护措施。避免试剂直接接触皮肤和眼睛。如不慎接触，请立即用大量清水清洗。

3) 只有经过良好实验室培训的工作人员方可使用本试剂盒，请严格按照本说明书操作。

4) 为避免微生物的污染，以及试剂与样本间的交叉污染，请使用一次性枪头，不同的试剂，使用不同的枪头和加样槽；使用干净的容器配制试剂。

5) 请不要使用其他批号或其他来源的试剂替代本试剂盒中的试剂；请不要使用过期的试剂；在试剂盒的贮存或孵育过程请避免强光照射。

6) 显色底物避免与氧化试剂和金属接触；暴露于酸性环境会抑制结合。

7) 避免气溶胶的产生。

8) 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。

9) 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。

10) 推荐所有的检测样本和标准品在检测中设复孔。

【基本信息】

生产厂家：杭州联科生物技术股份有限公司

地址：浙江省杭州市萧山区闻堰街道时代大道4887号湘湖科创园15幢1层、2层

技术服务热线：400-6721-600

网址：www.liankebio.com