

## Human Amphiregulin ELISA Kit

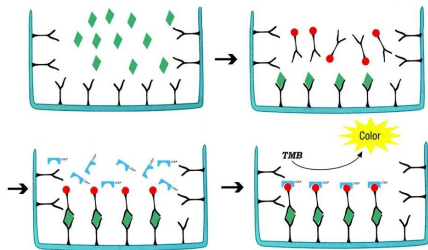
货号: BN50004

规格: 48T; 96T

本试剂盒用于定量检测人血清、血浆、细胞培养上清液等样本中天然和重组 Amphiregulin 浓度。**使用前请仔细阅读说明书并检查试剂组分。**

### 检测原理:

本实验采用双抗体夹心 ELISA。用抗人 Amphiregulin 单克隆抗体预包被酶标板, 加入适度稀释的样本和标准品, 其中的 Amphiregulin 会与其单抗结合, 洗去游离成分; 加入生物素化的抗人 Amphiregulin 抗体, 抗人 Amphiregulin 抗体与结合在单抗上的人 Amphiregulin 结合而形成免疫复合物, 洗去游离的成分; 加入辣根过氧化物酶标记的亲合素, 生物素与亲合素特异性结合, 洗去未结合的酶结合物; 加入显色剂, 若反应孔中有 Amphiregulin 辣根过氧化物酶会使无色的显色剂现蓝色; 加终止液变黄。在 450nm 下测 OD 值, Amphiregulin 浓度与 OD450 值之间呈正比, 可通过绘制标准曲线计算出标本中 Amphiregulin 浓度。



检测原理示意图

### 试剂盒组成:

试剂盒组成	96t	48t	配制
1a 标准品	2 支	1 支	按说明书进行稀释
1b 标准品和标本稀释液	1 瓶	1 瓶	即用型
2a 浓缩生物素化抗体	2 支	1 支	按瓶签标识进行稀释
2b 生物素化抗体稀释液	1 瓶	1 瓶	即用型
3a 浓缩酶结合物 (避光)	2 支	1 支	按瓶签标识进行稀释
3b 酶结合物稀释液	1 瓶	1 瓶	即用型
4 浓缩洗涤液 20×	1 瓶	1 瓶	按瓶签标识进行稀释
显色剂 (避光)	1 瓶	1 瓶	即用型
终止液	1 瓶	1 瓶	即用型
抗体包被板条	8×12	8×6	即用型
封板胶纸	4 张	2 张	即用型
说明书	1 份	1 份	

### 储存条件:

未启封的试剂盒	4℃保存, 请于保质期内使用。	
已 启 封 或 重 新 溶 解 的 试 剂	1b 标准品和标本稀释液	可以整盒放入 4℃ 储存 1 个月。 2a 浓缩生物素化抗体和 3a 浓缩酶结合物需用现配。
	2a 浓缩生物素化抗体 (100×)	
	2b 生物素化抗体稀释液	
	3a 浓缩酶结合物 (避光 100×)	
	3b 酶结合物稀释液	
	4 浓缩洗涤液 20×	
终止液	4℃或常温保存	
标准品	重溶后分装, -20℃存放一个月, 避免反复冻融。稀释后的标准品使用后应丢弃, 不得重复使用。	
抗体包被板条	实验中不用的板条应立即放回包装袋中, 密封干燥 4℃保存。	

以上储存条件均要求在试剂盒保质期内。

### 其它实验材料(不提供, 但可协助购买):

1. 酶标仪(450nm)
2. 高精度可调移液器及吸头: 0.5-10,2-20,20-200,200-1000μl。  
一次检测样品较多时, 最好用多通道移液器
3. 自动洗板机或洗瓶
4. 37℃ 温箱
5. 双蒸水或去离子水
6. 坐标纸
7. 量筒

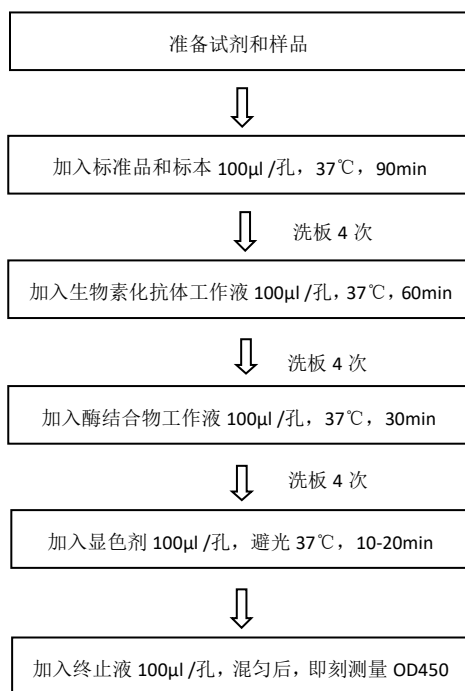
### 注意事项:

1. 试剂盒保存在 2-8℃, 除复溶后的标准品, 其它成分不可冷冻。
2. 浓缩生物素化抗体(2a)、浓缩酶结合物(3a)装量极少, 运输中颠簸和可能的倒置会使液体沾到管壁或瓶盖。使用前请离心处理以使附着于管壁或瓶盖的液体沉积到管底。
3. **不同批号试剂不可混用。**
4. 为避免交叉污染请使用一次性吸头。
5. 终止液和显色剂具腐蚀性, 避免皮肤及粘膜直接接触, 一旦接触到这些液体, 请尽快用大量水冲洗。
6. 使用干净的塑料容器配制洗涤液, 使用前充分混匀试剂盒里的各种成份及样品。
7. 洗涤酶标板时应充分拍干, 不要将吸水纸直接放入酶标反应孔中吸水。

本产品仅用于科研



**操作流程图:**



**操作要点提示:**

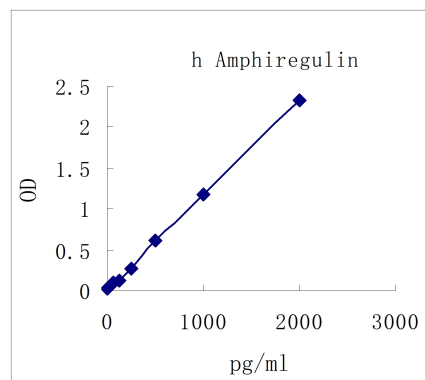
1. 配制各种试剂时要充分混匀, 但要避免产生大量泡沫, 以免加样时加入大量的气泡, 产生加样误差。
2. 为避免交叉污染, 在加入不同浓度的标准品、不同样品、不同试剂时谨记及时更换吸头。
3. 为了确保准确的结果, 在每次孵育前均需使用新封板胶纸封住反应孔。
4. 显色剂在添加之前, 应保持无色, 请勿使用已变为蓝色的显色溶液。最佳显色时间对标准曲线很重要, 肉眼可见前 3-4 孔有梯度蓝色, 后 3-4 孔差别不明显, 零孔无蓝色出现即可终止。
5. 每次检测均要做标准曲线, 根据样品待测因子的含量, 适当稀释或浓缩样本, 最好做预实验。

**结果判断:**

1. 每个标准品和标本的OD值应减去空白孔的OD值, 如果做复孔, 求其平均值。
2. 使用计算机软件以吸光度OD值为纵坐标(Y), 相应的Amphiregulin标准品浓度为横坐标(X), 生成相应的标准曲线, 样品的Amphiregulin含量可根据其OD值由标准曲线换算出相应的浓度。
3. 若标本 OD 值高于标准曲线上限, 应当适当稀释后重测, 计算浓度时应乘以稀释倍数算标本含量。
4. 参考数据:

标准品浓度 (pg/ml)	OD值1	OD值2	平均值	矫正值
0	0.036	0.035	0.036	—
31.25	0.063	0.073	0.068	0.032
62.5	0.082	0.091	0.087	0.051
125	0.134	0.125	0.130	0.094
250	0.262	0.258	0.260	0.224
500	0.598	0.606	0.602	0.566
1000	1.181	1.178	1.180	1.144
2000	2.323	2.327	2.325	2.289

数据仅供参考, 不同用户最佳显色时间会有所不同



本图仅供参考, 应以同次试验标准品所绘标准曲线为准

**结果重复性:**

板间, 板内变异系数均<10%。

**灵敏度:**

最低检测人 Amphiregulin 剂量小于 15 pg/ml。最低检出量测定方法: 20 个零标准的平均 OD 值增加两个标准差, 再计算相应的浓度。

**ELISA检测常见问题分析及解决办法:**

问题	可能原因	解决办法	问题	可能原因	解决办法
无颜色	不同试剂盒或不同批号的试剂混合	重新检查试剂的标签, 确保所有组分都属于正使用的试剂盒中的。不能混用不同试剂盒或不同批号的试剂。	全部板子变成规则的蓝色	不充分的洗涤/洗涤步骤被遗漏使没结合的 HRP 仍有残留	最好使用洗板机充分洗涤 检查每孔是否有残留的洗液或加样量是否准确
	漏加酶	检查操作流程, 注意不要漏加		太多的酶结合物	检查稀释度, 必要时进行效价测定
	HRP 酶污染了叠氮钠	使用新配制的试剂, 禁含叠氮钠		封板膜或试剂容器被重复使用, 导致 HRP 残留, 使 TMB 底物产生非特异蓝色	使用新封板膜, 每步使用不同的试剂容器
	试剂配制/使用有误	重做试验, 严格按说明书操作, 每次配制和使用前看清标签	高 CV 值花板	操作不慎或洗涤不充分	按说明书洗板、加样和显色, 洗板尤为重要 确定每两步骤间酶标板应保持湿润 使用封板膜封口, 注意每步使用新鲜的封板膜
超过有效期的产品可能会产生很弱的信号	检查产品有效期	出现干板, 没有使用封板膜、封板膜重复使用		检查并校准移液器, 每次取样必须更换吸头	
缩短孵育时间能使实验信号变弱	检查孵育时间	移液器不准确, 吸头重复使用		检查稀释度, 必要时进行效价测定 检查稀释度, 必要时进行效价测定 延长底物孵育时间	
显色弱	使用了被污染的试剂	检查试剂是否被污染	标准曲线可得到, 但两点之间区别很差 (低或平的曲线)	酶结合物不足 检测抗体不足	检查稀释度, 必要时进行效价测定 检查稀释度, 必要时进行效价测定
	仪器设定不正确, 滤光片不匹配	仪器是否设定正确, 滤光片的使用等	板子显色不足		使用推荐品牌的底物溶液
	洗涤操作不规范	洗涤不充分, 使用手工洗板常出现			标准曲线很好, 但没有任何期望的阳性信号
		洗瓶洗涤, 每孔应完全充满洗涤缓冲液, 倾出时应迅速	若用洗板机, 应校准并设定足够充满每孔的体积量。板内侧不应接触设备	标本基质遮盖检测	将标本至少做 1:2 相应的稀释, 或进行系列稀释
		检查每孔是否有残留的洗液或每孔加样量的体积是否准确	可在两次洗板之间加 30 秒的浸泡	标准曲线很好, 但标本的判读值很高	标本中含的待检物质水平超过实验范围
	高背景	实验中孵育温度和时间不适当	确定每一试验步骤的孵育温度和时间是否适当	边缘效应	工作环境温度不均衡
酶加量过多		加酶前查看移液器调节量是否准确 检查稀释度, 若必要时进行效价测定	漂移	实验过程中出现间断	整个实验应连续操作, 在实验开始前将所有的标准品和标本做适当的准备。
		试剂没有按说明书平衡至室温		在所有试剂加入孔前, 确保它们已平衡至室温, 除非说明书中有另外的要求。	
			是否可更改试剂盒所提供的操作步骤?		一般厂商为确保最高的灵敏度, 对试剂盒都进行了优化, 为确保每一试剂盒实验的规范性应按说明书操作。
			是否可混用不同批次试剂盒中的试剂?		不可以, 绝大多数试剂在每批试剂盒中是特异的, 若有问题可与厂家或代理商联系。
			是否可增加或减少标本的体积?		商品化的试剂盒所需加入的标本体积是优化的, 应按说明书操作, 不建议更改所加标本体积。
			是否可重新确定自己的标准曲线的点?		可以。说明书上有建议制备标准曲线时标准品的稀释度, 可改变稀释倍数和增加曲线的点, 但是必须在实验范围内, 高于试剂盒中最高标准品的点和低于灵敏度以下的点是无效的。