# 人抗父体淋巴细胞毒性抗体(APCA)ELISA 试剂盒

# (ELISA) 使用说明书

- 本试剂盒用于体外定量检测血清、血浆、组织匀浆及相关液体样本中人抗父体淋巴细胞毒性抗体(APCA)的含量。
- 有效期：6 个月
- 保存条件：2-8℃
- 本试剂盒仅供科研使用，不得用于临床诊断

**实验原理实验**

试剂盒采用双抗体一步夹心法酶联免疫吸附试验（ELISA）。往预先包被人抗父体淋巴细胞毒性抗体(APCA)捕获抗体的包被微孔中，依次加入标本、标准品、HRP 标记的检测抗体，经过温育并彻底洗涤。用底物 TMB 显色，TMB 在过氧化物酶的催化下转化成蓝色，并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的人抗父体淋巴细胞毒性抗体(APCA)呈正相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度（OD 值），计算样品浓度。

**样品收集、处理及保存方法**

1）血清 操作过程中避免任何细胞刺激。使用不含热原和内毒素的试管。收集血液后 1000×g 离心 10 分钟将血清和红细胞迅速小心地分离。

2）血浆 EDTA、柠檬酸盐、肝素血浆可用于检测。1000×g 离心 30 分钟去除颗粒。

3）细胞上清液 1000×g 离心 10 分钟去除颗粒和聚合物。

4）组织匀浆 将组织加入适量生理盐水捣碎。1000×g 离心 10 分钟，取上清液

5）保存------如果样品不立即使用，应将其分成小部分-70 ℃保存，避免反复冷冻。尽可能的不要使用溶血或高血脂血。如果血清中大量颗粒，检测前先离心或过滤。不要在 37℃或更高的温度加热解冻。应在室温下解冻并确保样品均匀地充分解冻。

**注：标本溶血会影响最后检测结果，因此溶血标本不宜进行此项检测。**

**需要而未提供的试剂和器材**

1. 酶标仪（450nm）

2. 高精度加样器及枪头：0.5-10uL、2-20uL、20-200uL、200-1000uL

3. 37℃恒温箱

4. 蒸馏水或去离子水

**试剂盒组成**

| 试剂盒成份（2-8℃保存） | 96孔配置 | 48孔配置 | 配制 |
|---|---|---|---|
| 96/48人份酶标板 | 1块板（96T） | 半块板（48T） | 即用型 |
| 塑料膜板盖 | 1块 | 半块 | 即用型 |
| 标准品 | 1瓶（0.6ml） | 1瓶（0.3ml） | 按说明书进行稀释 |
| 空白对照 | 1瓶（1.0ml） | 1瓶（0.5ml） | 即用型 |
| 标准品稀释缓冲液 | 1瓶（5ml） | 1瓶（2.5ml） | 即用型 |
| 生物素标记的抗TXA2抗体 | 1瓶（6ml） | 1瓶（3.0ml） | 即用型 |
| 亲和链酶素-HRP | 1瓶（10ml） | 1瓶（5.0ml） | 即用型 |
| 洗涤缓冲液 | 1瓶（20ml） | 1瓶（10ml） | 按说明书进行稀释 |
| 底物A | 1瓶（6.0ml） | 1瓶（3.0ml） | 即用型 |
| 底物B | 1瓶（6.0ml） | 1瓶（3.0ml） | 即用型 |
| 终止液 | 1瓶（6.0ml） | 1瓶（3.0ml） | 即用型 |
| 标本稀释液 | 1瓶（12ml） | 1瓶（6.0ml） | 即用型 |

**备注：**

1. 标准品浓度依次为：80、40、20、10、5、2.5 U/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50μL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。

**注意事项**

1. 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。

2. 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。

3. 消除板底残留的液体和手指印，否则影响 OD 值。

4. 底物显色液应呈无色或很浅的颜色，已经变蓝的底物液不能使用。

5. 避免试剂和标本的交叉污染以免造成错误结果。

6. 在储存和温育时避免强光直接照射。

7. 平衡至室温后再打开密封袋以防水滴凝聚在冷板条上。

8. 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。

9. 不能使用过期产品。

10. 如果可能传播疾病，所有的样品都应管理好，按照规定的程序处理样品和检测装置。

**试剂准备**

试剂盒从冷藏环境中取出应在室温平衡后方可使用。20×洗涤缓冲液的稀释：蒸馏水按 1：20 稀释，即 1 份 20×洗涤缓冲液加 19 份蒸馏水。

**操作步骤**

1. 从室温平衡 20min 后的铝箔袋中取出所需板条，剩余板条用自封袋密封放回 4℃。

2. 设置标准品孔和样本孔，标准品孔各加不同浓度的标准品 50μL；

3. 样本孔中加入待测样本 50μL；空白孔不加。

4. 除空白孔外，标准品孔和样本孔中每孔加入辣根过氧化物酶（HRP）标记的检测抗体 100μL，用封板膜封住反应孔，37℃水浴锅或恒温箱温育 60min。

5. 弃去液体，吸水纸上拍干，每孔加满洗涤液（350μL），静置 1min，甩去洗涤液，吸水

纸上拍干，如此重复洗板 5 次（也可用洗板机洗板）。

6. 每孔加入底物 A、B 各 50μL，37℃避光孵育 15min。

7. 每孔加入终止液 50μL，15min 内，在 450nm 波长处测定各孔的 OD 值。

**实验结果计算**

以所测标准品的 OD 值为横坐标，标准品的浓度值为纵坐标，在坐标纸上或用相关软件绘制标准曲线，并得到直线回归方程，将样品的 OD 值代入方程，计算出样品的浓度。

**试剂盒性能**

1. 检测范围：2.5 U/L – 80 U/L。

2. 灵敏度：最低检测浓度小于 0.1 U/L。

3. 特异性：不与其它可溶性结构类似物交叉反应。

4. 重复性：板内变异系数小于 10% ，板间变异系数小于 15% 。

**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。