**（本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!）**

**产品规格：96T/48T　　货号：mlC4149**

# Mlbio® 大鼠表皮生长因子受体（EGFR）试剂盒（ELISA）使用说明书
# Rat EGFR ELISA Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

网址：www.mlbio.cn

**免费电话：4008-898-798**
直线电话：021-54461730，021-54222852
企业 QQ：2881505719，2885086692
电子邮箱：2881505699@qq.com

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。

联系时请提供产品货号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

## 用 途

该试剂盒适用于检测体外血清、血浆或其他相关生物液体，对检测的样品进行定性/相对定量的统计分析。

## 基本性能

| 性 能 | |
|---|---|
| 灵敏度 | 0.031ng/ml |
| 检测范围 | 0.156→10ng/ml |
| 特异性 | 不与其它可溶性结构类似物交叉反应 |
| 重复性 | 板内变异系数小于 10% ，板间变异系数小于 15% |

## 检测原理

本试剂盒采用双抗体夹心SP-ELISA方法:将特异性的捕获抗体包被于高亲和力的酶标板上，酶标板中对应加入标准品及待测样品，样品及标准品中的靶蛋白被捕获，生物素化的检测抗体与靶蛋白结合， SP复合物与生物素化检测抗体结合，形成免疫复合物，检测过程中每一步经过洗涤液的彻底洗涤，游离的成分均被洗去，用底物TMB显色，TMB在过氧化物酶的作用下，若反应孔中有靶蛋白则显蓝色，加入终止液后变黄色，用酶标仪在450 nm处测OD值，靶蛋白浓度与OD值之间呈正比，根据OD值绘制标准曲线计算出样品中靶蛋白的含量，进而对检测的样品进行定性/相对定量的统计分析。

## 试剂盒组成及保存

未拆封的试剂盒可在 2-8℃保存 6 个月。

## 试剂盒组成

| 名　称 | 规格（48T） | 规格（96T） |
|---|---|---|
| **酶标板**<br>Coated Wells | 8×6 条 | 8×12 条 |
| **标准品**<br>Standard | 1 管 | 2 管 |
| **标准品及样品稀释液(5×)**<br>Standard & Sample Diluent　Buffer | 6ml | 12ml |
| **生物素化检测抗体(100×)**<br>Biotin-antibody (100×) | 60ul | 120ul |
| **生物素化抗体稀释液**<br>Biotinylated Antibody Diluent Buffer | 6ml | 12ml |
| **SP 复合物**<br>Streptavidin-HRP (100×) | 60ul | 120ul |
| **SP 复合物稀释液**<br>SP Complex Diluent Buffer | 6ml | 12ml |
| **TMB 显色液**<br>TMB Substrate | 6ml | 12ml |
| **终止液**<br>Stop Solution | 6ml | 12ml |
| **20×浓缩洗涤液**<br>Wash Buffer (20×) | 30ml | 30ml *2 |
| **封板膜**<br>Plate Sealer | 2 张 | 2 张 |
| **产品说明书** | 1 份 | 1 份 |

说明:所有试剂瓶盖须旋紧以防止蒸发和微生物的污染。试剂体积以实际发货版说明书为准。相关试剂在分装时会比标签上标明的体积稍多一些，请在使用时量取而非直接倒出。

## 试验所需自备物品

1. 酶标仪(450nm 波长滤光片)
2. 高精度移液器，EP 管及一次性吸头：0.5-10μL, 2-20μL, 20-200μL, 200-1000μL
3. 37℃恒温箱
4. 双蒸水或去离子水

## 样品收集方法

1. **血清：**

全血样品于室温放置 1 小时或 2-8℃过夜后于 2-8℃，1000×g 离心 20 分钟，取上清即可检测。

2. **血浆：**

抗凝剂推荐使用 EDTA-Na2，样品采集后 30 分钟内于 2-8℃，1000×g 离心 15 分钟，取上清即可检测。

3. **组织匀浆：**

用预冷的 PBS (0.01M, 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 1 g 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，可以对匀浆液进行反复冻融或超声破碎。最后将匀浆液于 2-8℃，5000×g 离心 5-10 分钟，取上清检测。

4. **细胞提取液：**

贴壁 细胞用冷的 PBS 轻轻清洗，然后用胰蛋白酶消化，1000×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 $10^6$ 个细胞中加入 150-200 μL PBS 重悬(推荐在 PBS 中加入蛋白酶抑制剂;若含量很低可减少 PBS 的体积)并通过反复冻融或超声使细胞破碎。

将提取液于 2-8℃，1500×g 离心 10 分钟，取上清检测。

5. **细胞培养上清或其他生物体液：**

收集液体后于 2-8℃，1000×g 离心 20 分钟，除去杂质及细胞碎片。取上清检测。

## 注意事项

■ **试剂盒注意事项**

1) 本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断。

2) 试验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。特别是检测血液或者其他体液样品时，请按国家生物试验室安全防护条例执行。

3) 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。

4) 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。

5) 消除板底残留的液体和手指印，否则影响 OD 值。

6) 底物显色液应呈无色或很浅的颜色。

7) 避免试剂和标本的交叉污染以免造成错误结果。

8) 在储存和温育时避免强光直接照射。

9) 平衡至室温后再打开密封袋以防水滴凝聚在冷板条上。

10) 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。

11) 检测使用的酶标仪需要安装能检测 450±10nm 波长的滤光片，光密度范围在 0-3.5 之间。建议使用时提前 15 分钟预热。

12) 请勿使用其他批号或其他来源的试剂混合或替代本试剂盒中的试剂。

13) 试验中所用的 EP 管和吸头均为一次性使用，严禁混用。

14) 请勿使用过期的试剂。

## ■ 样品注意事项

1) 收集血液的试管应为一次性无内毒素试管。避免使用溶血，高血脂样品。

2) 样品收集后在 1 周内进行检测可保存于 2-8℃，若不能及时检测，请按一次使用量分装，冻存于-20℃(1 个月内检测)，或-80℃(3 个月内检测)，避免反复冻融。在检测前 ,冷冻过的样本应缓慢地融化并离心除去冻融过程产生的沉淀物。室温混匀后使用。

3) 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围，建议实验前通过相关文献预估样本中待测物的浓度并通过预实验确定样本的实际浓度情况。如果样品中待测物浓度过高或者过低，请对样本做适当的稀释或者浓缩。

4) 若所检样本不在说明书所列样本之中，建议做预实验验证其检测有效性。

5) 若使用化学裂解液制备组织匀浆或细胞提取液，由于引入某些化学物质会导致 ELISA 测值出现偏差。

6) 某些重组蛋白可能与试剂盒中捕获或检测抗体不匹配而出现不能检测的情况。

## 样本稀释方案

请提前预估样本的浓度范围，如果您的检测样本需要稀释，参考稀释方案如下：

**稀释 100 倍：**一步稀释。取 5μL 样本到 495μL 通用稀释液内，做 100 倍稀释；

**稀释 1000 倍:** 两步稀释。取 5μL 样本到 95μL 通用稀释液内 ,做 20 倍稀释 ,再取 5μL 20 倍稀释样本到 245μL 通用稀释液内，做 50 倍稀释，总共稀释 1000 倍；

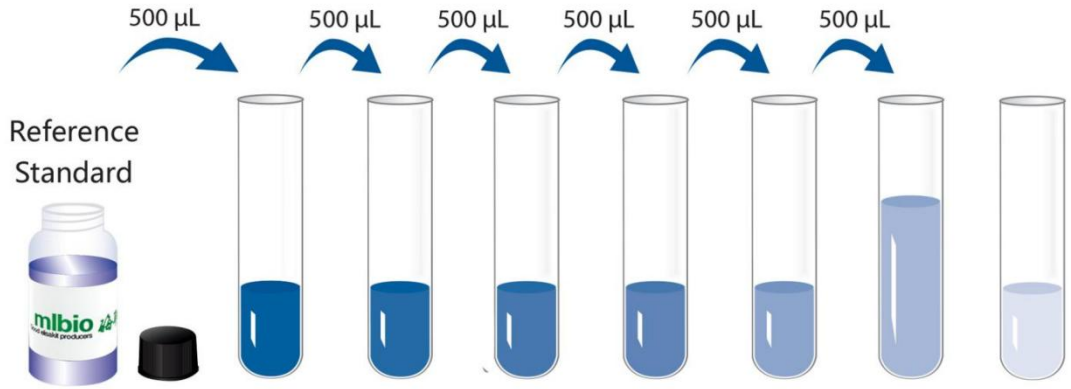
**稀释 100000 倍：**

三步稀释。取 5μL 样本到 195μL 通用稀释液内，做 40 倍稀释，再取 5μL 40 倍稀释样本到 245μL 通用稀释液内，做 50 倍稀释，最后取 5μL 2000 倍稀释样本到 245μL 通用稀释液内，做 50 倍稀释，总共稀释 100000 倍；

每步稀释时取液量不少于 **3 μL**，稀释倍数不超过 100 倍。每步稀释都需混合均匀，避免起泡。

## 检测前准备工作:

1. 提前 20 分钟从冰箱中取出试剂盒，平衡至室温(18-25℃)。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和试剂，剩余板条和试剂需按照指定条件保存。
2. 洗涤液配置：用蒸馏水 1:20 稀释（例：1ml 浓缩洗涤液加入 19ml 的蒸馏水）。
3. 标准品配制:取 7 支 EP 管，分别标注 S1,S2,S3,S4,S5,S6，blank,每管中加入 500 μL **1×**标准品及样品稀释液,从试剂盒标准品管中吸取 500μL 移至第一管 S1 中，混匀后吸取 500ul 移至第二管 S2 中，如此反复作对倍稀释，从第六管 S6 中吸出 500ul 弃去，第七管为空白对照。标准曲线浓度为: 10、5、2.5、1.25、0.625、0.3125、0.15625、0 ng/ml。




4. 生物素化抗体工作液配置:使用前 20 分钟，用生物素化抗体稀释液将 100×生物素化抗体稀释成 1×工作液，根据所需用量配置，当日使用，剩余弃之。

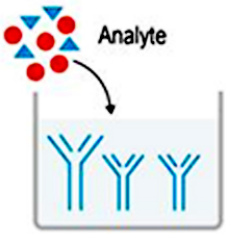
5. SP 复合物工作液配置:使用前 20 分钟，用 SP 复合物稀释液将 100×SP 复合物稀释成 1×工作液，根据所需用量配置，当日使用，剩余弃之。

6. 如果您检测的样本中靶蛋白浓度高于标准品最高值，建议重新检测，请根据实际情况，适当倍数稀释(建议做预实验，以确定稀释倍数)。

## 操作步骤

1. 加样：空白孔加入 50μl 1×标准品/样品稀释液，其余孔各加入标准品或待测样品 50ul，将反应板混匀后置 37℃，50 分钟。
2. 洗板:用 **1×**洗涤液将反应板充分洗涤 3 次 ,每孔加入 **1×**洗液 350μl ,每次震荡/浸泡 1-2 分钟，向滤纸上印干。
3. 空白孔加入 100ul 生物素化抗体稀释液 ,其余孔各加入 **1×**的生物素化抗体工作液 100ul，混匀后置 37℃，40 分钟。
4. 洗板：同上。
5. 每孔加入 SABC 复合物工作液 100ul，混匀后置 37℃，30 分钟。
6. 洗板:用 **1×**洗涤液将反应板充分洗涤 5 次 ,每孔加入 **1×**洗液 350μl ,每次震荡/浸泡 1-2 分钟，向滤纸上印干。
7. 每孔加入 TMB 显色液 90ul，混匀后置 37 ℃暗处反应 10-25 分钟（具体显色时间根据显色结果而定）。
8. 每孔加入 100ul 终止液，混匀，30 分钟内用酶标仪在 450nm 处测吸光值。每孔加入 100ul 终止液，混匀，30 分钟内用酶标仪在 450nm 处测吸光值。

## 操作一览表

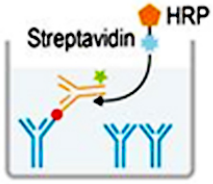



1. 加样：空白孔加入50μl 1×标准品/样品稀释液，其余孔各加入标准品或待测样品50ul，将反应板混匀后置37℃，50分钟。

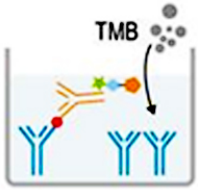
2. 洗板：用1×洗涤液将反应板充分洗涤3次，每孔加入1×洗液350μl，每次震荡/浸泡1-2分钟，向滤纸上印干。

3. 空白孔加入100ul生物素化抗体稀释液，其余孔各加入1×的生物素化抗体工作液100ul，混匀后置37℃，40分钟。

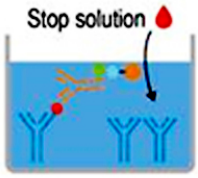
4. 洗板：同上。



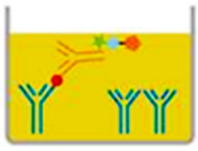

5. 每孔加入SABC复合物工作液100ul，混匀后置37℃，30分钟。




6. 洗板：用1×洗涤液将反应板充分洗涤5次，每孔加入1×洗液350μl，每次震荡/浸泡1-2分钟，向滤纸上印干。




7. 每孔加入TMB显色液90ul，混匀后置37 ℃暗处反应10-25分钟（具体显色时间根据显色结果而定）。



8. 每孔加入100ul终止液，混匀，30分钟内用酶标仪在450nm处测吸光值。每孔加入100ul终止液，混匀，30分钟内用酶标仪在450nm处测吸光值。

## 结果判断

1. 计算标准品和样本复孔的平均 OD 值并减去空白孔的 OD 值作为校正值。以浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，在双对数坐标轴上拟合四参数逻辑函数的标准曲线，作图时去掉空白组的值

2. 若样品 OD 值高于标准曲线上限，应适当稀释后重测并在计算样本浓度时乘以相应的稀释倍数。

## 性 能

### ■ 精密度

板内精密度：低，中，高浓度样本分别在 1 块板子上检测 20 次。

板间精密度：低，中，高浓度样本分别在 3 块板子上检测 20 次。

| | 批内变异系数 | | | 批间变异系数 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 样本 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| 数量 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 |
| 平均值(ng/mL) | 2.50 | 4.90 | 16.80 | 2.50 | 4.70 | 18.20 |
| 标准差 | 0.10 | 0.20 | 0.60 | 0.20 | 0.30 | 0.70 |
| 变异系数 (%) | 4.00 | 4.08 | 3.57 | 8.00 | 6.38 | 3.85 |

### ■ 回收率

分别往不同样本中添加已知浓度的人 CRP，做回收实验，得出回收率范围和平均回收率。

| 样本类型 | 回收率范围 (%) | 平均回收率 (%) |
|---|---|---|
| 血清(n=8) | 90-102 | 95 |
| 血浆(EDTA)(n=8) | 85-97 | 90 |
| 细胞培养基(n=8) | 88-103 | 94 |

### ■ 线性

将添加有人 CRP 的样本分别稀释 2 倍，4 倍，8 倍，16 倍做回收实验，得出回收率范围及平均回收率。

| | | 血清 (n=5) | 血浆(EDTA) (n=5) | 细胞培养基(n=5) |
|---|---|---|---|---|
| 1:2 | 回收率范围(%) | 95-111 | 92-106 | 98-109 |
| | 平均回收率(%) | 103 | 98 | 103 |
| 1:4 | 回收率范围(%) | 97-112 | 85-96 | 90-105 |
| | 平均回收率(%) | 105 | 91 | 97 |
| 1:2 | 回收率范围(%) | 98-111 | 86-100 | 93-111 |
| | 平均回收率(%) | 105 | 93 | 101 |
| 1:2 | 回收率范围(%) | 99-113 | 87-101 | 98-114 |
| | 平均回收率(%) | 105 | 92 | 104 |

## 声 明

1. 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。

2. 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。

3. 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。

4. 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。

5. 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。

6. 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。

7. 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。

8. 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。

## 问题分析

若实验效果不好，请及时对显色结果拍照，保存实验数据，保留所用板条及未使用试剂，然后联系我公司技术支持为您解决问题。同时您也可以参考以下资料：

| 问题描述 | 可能原因 | 相应对策相应对策 |
|---|---|---|
| 标准曲线梯度差 | 吸液或加液不准 | 检查移液器及吸头 |
| | 标准品稀释不正确 | 溶解标准品时稍微旋转瓶身，轻轻混匀使粉末完全溶解 |
| | 洗涤不完全 | 保证洗涤时间和洗涤次数及每孔的加液量 |
| 显色很弱或无色 | 孵育时间太短 | 保证充足的孵育时间 |
| | 实验温度不正确 | 使用推荐的实验温度 |
| | 试剂体积不够或漏加 | 检查吸液及加液过程，保证所有试剂按顺序足量添加 |
| | 稀释不正确 | |
| | 酶标记物失活或底物失效 | 混合酶结合物和底物，通过迅速显色来检查判断 |
| 读数数值低 | 酶标仪设置不正确 | 在酶标仪上检查波长及滤光片设置 |
| | | 提前打开酶标仪预热 |
| 变异系数大 | 加液不正确 | 检查加液情况 |
| 背景值高 | 检测抗体的工作浓度过高 | 使用推荐的稀释倍数 |
| | 酶标板洗涤不完全 | 保证每步清洗完全；如果用自动洗板机，请检查所有的出口是否有堵塞；是否使用试剂盒配备的洗涤液 |
| | 洗液有污染 | 配制新鲜的洗液 |
| 灵敏度低 | ELISA 试剂盒保存不当 | 按说明书要求保存相关试剂 |
| | 读数前未终止 | OD 读数前应在每孔中加入终止液 |