

大鼠钙调素(CAM)酶联免疫吸附测定试剂盒

使用说明书

产品编号: E0640r

EIAab

www.eiaab.cn

本试剂盒仅供体外研究使用、不用于临床诊断!

预期应用

ELISA 法定量测定大鼠血清、血浆或其它相关生物液体中 CAM 含量。

实验原理

用纯化的 CAM 抗体包被微孔板, 制成固相载体, 往微孔中依次加入标本或标准品、生物素化的 CAM 抗体、HRP 标记的亲合素, 经过彻底洗涤后用底物(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 CAM 呈正相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度 (O.D.值), 计算样品浓度。

试剂盒组成及试剂配制



- 1、**酶标板**: 一块 (96 孔)
- 2、**标准品** (冻干品): 2 瓶, 请临用前 15 分钟内配制。每瓶以样品稀释液稀释至 0.5ml, 盖好后室温静置大约 10 分钟, 同时反复颠倒/搓动以助溶解, 其浓度为 100 ng/ml, 然后做系列倍比稀释 (**注: 不要直接在板中进行倍比稀释**), 分别配制成 100 ng/ml, 50 ng/ml, 25 ng/ml, 12.5 ng/ml, 6.25 ng/ml, 3.12 ng/ml, 1.56 ng/ml, 样品稀释液直接作为空白孔 0 ng/ml。如配制 50 ng/ml 标准品: 取 0.3ml (不要少于 0.3ml) 100 ng/ml 的上述标准品加入含有 0.3ml 样品稀释液的 Eppendorf 管中, 混匀即可, 其余浓度以此类推。
- 3、**样品稀释液**: 1×20ml。
- 4、**检测稀释液 A**: 1×10ml。
- 5、**检测稀释液 B**: 1×10ml。
- 6、**检测溶液 A**: 1×120 μ l/瓶 (1:100)。临用前以**检测稀释液 A** 1:100 稀释 (如: 10 μ l 检测溶液 A / 990 μ l 检测稀释液 A), 充分混匀, 稀释前根据预先计算好的每次实验所需的总量配制 (100 μ l/孔), 实际配制时应多配制 0.1-0.2ml。
- 7、**检测溶液 B**: 1×120 μ l/瓶 (1:100)。临用前以**检测稀释液 B** 1:100 稀释。稀释方法同检测溶液 A。
- 8、**底物溶液**: 1×10ml/瓶。
- 9、**浓洗涤液**: 1×30ml/瓶, 使用时每瓶用蒸馏水稀释 25 倍。
- 10、**终止液**: 1×10ml/瓶 (2 mol/L H₂SO₄)。
- 11、**覆膜**: 5 张
- 12、**使用说明书**: 1 份

自备物品

- 1、酶标仪（建议仪器使用前提前预热）
- 2、微量加液器及吸头，EP管
- 3、蒸馏水或去离子水，滤纸

标本的采集及保存

- 1、血清：全血标本请于室温放置 2 小时或 4°C 过夜后于 1000×g 离心 20 分钟，取上清即可检测，或将上清置于 -20°C 或 -80°C 保存，但应避免反复冻融。
- 2、血浆：可用 EDTA 或肝素作为抗凝剂，标本采集后 30 分钟内于 1000×g 离心 15 分钟，取上清即可检测，或将上清置于 -20°C 或 -80°C 保存，但应避免反复冻融。
- 3、其它生物标本：请 1000×g 离心 20 分钟，取上清即可检测，或将上清置于 -20°C 或 -80°C 保存，但应避免反复冻融。



注：以上标本均应密封保存，4°C 保存应小于 1 周，-20°C 不应超过 1 个月，-80°C 不应超过 2 个月；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。

操作步骤

实验开始前，各试剂均应平衡至室温，试剂不能直接在 37°C 溶解；试剂或样品配制时，均需充分混匀，混匀时尽量避免起泡。实验前应预测样品含量，如样品浓度过高时，应对样品进行稀释，以使稀释后的样品符合试剂盒的检测范围，计算时再乘以相应的稀释倍数。

- 1、加样：分别设空白孔、标准孔、待测样品孔。空白孔加样品稀释液 100 μl，余孔分别加标准品或待测样品 100 μl，注意不要有气泡，加样时将样品加于酶标板底部，尽量不触及孔壁，轻轻晃动混匀，酶标板加上盖或覆膜，37°C 温育 2 小时。为保证实验结果有效性，每次实验请使用新的标准品溶液。
- 2、弃去液体，甩干，不用洗涤。每孔加检测溶液 A 工作液 100 μl（临用前配制），酶标板加上覆膜，37°C 温育 1 小时。
- 3、弃去孔内液体，甩干，洗板 3 次，每次浸泡 1-2 分钟，大约 400 μl/每孔，甩干（也可轻拍将孔内液体拍干）。
- 4、每孔加检测溶液 B 工作液（临用前配制）100 μl，加上覆膜，37°C 温育 1 小时。
- 5、弃去孔内液体，甩干，洗板 5 次，方法同步骤 3。
- 6、每孔加底物溶液 90 μl，酶标板加上覆膜 37°C 避光显色（反应时间控制在 15-30 分钟，当标准孔的前 3-4 孔有明显的梯度蓝色，后 3-4 孔梯度不明显时，即可终止）。
- 7、每孔加终止溶液 50 μl，终止反应，此时蓝色立转黄色。终止液的加入顺序应尽量与底物液的加入顺序相同。
- 8、立即用酶标仪在 450nm 波长测量各孔的光密度（O.D.值）。



注：

- 1、试剂准备：所有试剂在使用前应平衡至室温，使用后请立即按照说明书要求保存试剂。实验操作中请使用一次性的吸头，避免交叉污染。
- 2、加样：加样或加试剂时，第一个孔与最后一个孔加样之间的时间间隔如果太大，将会导致不同的“预温育”时间，从而明显地影响到测量值的准确性及重复性。一次加样时间（包括标准品及所有样品）最好控制在 10 分钟内。推荐设置复孔进行实验。
- 3、温育：为防止样品蒸发，实验时将加上盖或覆膜的酶标板置于湿盒内，以避免液体蒸发；洗板后应尽快进行下步操作，任何时候都应避免酶标板处于干燥状态；同时应严格遵守给

定的温育时间和温度。

- 4、**洗涤**：洗涤过程中反应孔中残留的洗涤液应在滤纸上拍干，勿将滤纸直接放入反应孔中吸水，同时要消除板底残留的液体和手指印，避免影响最后的酶标仪读数。
- 5、**试剂配制**：Detection A 及 Detection B 在使用前请手甩几下或少时离心处理，以使管壁或瓶盖的液体沉积到管底。标准品、**检测溶液 A** 工作液、**检测溶液 B** 工作液请依据所需的量配制使用，并使用相应的稀释液配制，不能混淆。请精确 配制标准品及工作液，尽量不要微量配制（如吸取**检测溶液 A** 时，一次不要小于 10 μ l），以避免由于不准确稀释而造成浓度误差；请勿重复使用已稀释过的标准品、**检测溶液 A** 工作液、**检测溶液 B** 工作液。
- 6、**反应时间的控制**：加入底物后请定时观察反应孔的颜色变化（比如，每隔 10 分钟），如颜色较深，请提前加入终止液终止反应，避免反应过强从而影响酶标仪光密度读数。
- 7、**底物**：底物请避光保存，在储存和温育时避免强光直接照射。

洗板方法

- 1、手工洗板方法：将推荐的洗涤缓冲液至少 0.4ml 注入孔内，浸泡 1-2 分钟，吸去（不可触及板壁）或甩掉酶标板内的液体，在实验台上铺垫几层吸水纸，酶标板朝下用力拍几次；根据需要，重复此过程数次。
- 2、自动洗板：如果有自动洗板机，应在熟练使用后再用到正式实验过程中。

特异性

本试剂盒可同时检测重组或天然的大鼠 CAM，且与其它相关蛋白无交叉反应。

计算

各标准品及样本 O.D.值扣除空白孔 O.D.值后作图（七点图），如设置复孔，则 应取其平均值计算。以标准品的浓度为纵坐标（对数坐标），O.D.值为横坐标（对数坐标），在对数坐标纸上绘出标准曲线。推荐使用专业制作曲线软件进行分析，如 curve expert 1.3，根据样品 O.D.值，由标准曲线查出相应的浓度，乘以稀释倍数；或用标准物的浓度与 O.D.值计算出标准曲线的回归方程式，将样品的 O.D.值代入方程式，计算出样品浓度，再乘以稀释倍数，即为样品的实际浓度。

检测范围：1.56 ng/ml - 100 ng/ml，绘制标准曲线请取用以下浓度值：100 ng/ml，50 ng/ml，25 ng/ml，12.5 ng/ml，6.25 ng/ml，3.12 ng/ml，1.56 ng/ml。

最低检测限：0.39 ng/ml

说明



- 1、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。
- 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密切相关，请务必准备充足的标本备份。
- 3、只有全部使用 USCNLIFE™ 试剂才能保证检测效果，因为所有试剂都是有关联的，不能混用其他制造商的产品。只有严格遵守 USCNLIFE™ 试剂的实验说明才会得到最佳的检测结果。
- 4、在储存及温育过程中避免将试剂暴露在强光中。所有试剂瓶盖须盖紧以防止蒸发和微生物的污染，因为蛋白水解酶的干扰将导致出现错误的结果。

- 5、试剂盒保存：请收到试剂盒后尽快将标准品、检测溶液 A 和检测溶液 B 保存于-20°C，其余试剂短期保存请置于 4°C，长期保存则置于-20°C。开封后的酶标板要密封加干燥剂后保存于-20°C，避免潮湿。
- 6、浓洗涤液会有盐析出，稀释时可在水浴中加温助溶。
- 7、刚开启的酶联板孔中可能会有少许水样物质，此为正常现象，不会对实验结果造成任何影响。
- 8、有效期：6 个月。
- 9、本操作说明适用于 48T 试剂盒，但 48T 试剂盒所有试剂减半。