# 肠激酶残留 ELISA 检测试剂盒

**产品简介：**

本试剂盒为双抗体夹心法检测抗原肠激酶，酶标板采用高亲和力抗肠激酶抗体作为包被物，检测时酶标板孔加入待检样品或标准品，再加入生物素化抗肠激酶抗体,反应后加入链霉亲和素 HRP，最后加入单组份 TMB 底物液。 如果待检样品中含有肠激酶，TMB 底物液在 HRP 催化下显色，加入终止液终止显色后，在酶标仪 $OD_{450}/OD_{630}$ 读取吸光值，吸光值大小与待检测样品中肠激酶浓度呈正相关，根据标准品浓度/吸光值绘制的标准曲线，可计算出待检样品中肠激酶含量。

注意：结构活性不佳的肠激酶可能不容易被本试剂盒检出，例如原核重组表达的肠激酶可能无法被试剂盒检出。

**适用范围：**

本产品适用于体外定量检测人血清、血浆，细胞培养液或其它相关生物液体中肠激酶含量。

**主要组分：**

| 组分名称 | 规格 | 保存条件 | 数量 |
|---|---|---|---|
| ELISA 酶标板(包被抗肠激酶抗体) | 96T | -20℃ | 1 |
| 标准品(肠激酶)5ng/ml | 0.5ml/支 | -20℃ | 2 |
| 生物素标记抗肠激酶抗体（100×） | 120ul | -20℃ | 1 |
| 链霉亲和素 HRP（100×） | 120ul | -20℃ | 1 |
| 通用稀释液 | 30ml | 4℃ | 1 |
| 浓缩洗涤液（25×） | 30ml | 4℃ | 1 |
| TMB 底物液 | 12ml | 4℃ | 1 |
| 反应终止液 | 12ml | 4℃ | 1 |
| 酶标板覆膜 | | | 5 |
| 产品说明书 | | | 1 |

**特别说明：**

1.打开包装后请及时检查所有物品是否齐全完整。

2.一周内使用可存于 4℃，需长时间保存或多次使用请按保存条件存放。

**样品收集:**

1.血清：全血样品于室温放置 2 小时或 4℃过夜后于 1000×g 离心 20 分钟，取上清即可检测，收集血液的试管应为一次性的无热原，无内毒素试管。

2.血浆：抗凝剂推荐使用 EDTA-$Na_2$，样品采集后 30 分钟内于 1000×g 离心 15 分钟，取上清即可检测。避免使用溶血，高血脂样品。

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（匀浆中裂解的红细胞会影响测量结果），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 1g 的组织样品对应 9mL 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，于冰上充分研磨。为了进一步裂解组织细胞，可以对匀浆液进行超声破碎，或反复冻融。最后将匀浆液于 5000×g 离心 5~10 分钟，取上清检测。

4.细胞培养上清：取细胞培养上清于 1000×g 离心 20 分钟，除去杂质及细胞碎片。取上清检测。

5.其它生物样品：1000×g 离心 20 分钟，取上清即可检测。

6.样品应清澈透明，悬浮物应离心去除。

7.样品收集后若在 1 周内进行检测的可保存于 4℃，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℃（6 个月内检测），避免反复冻融。

8.如果您的样品中检测物浓度高于标准品最高值，请根据实际情况，做适当倍数稀释（建议先做预实验，以确定稀释倍数）。

**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，双蒸水或去离子水

4.吸水纸

**检测前准备工作:**

1.请提前 20 分钟从冰箱中取出试剂盒，平衡至室温。

2.**洗涤液配制**：将浓缩洗涤液用双蒸水稀释(1:25)。未用完的放回 4℃。从冰箱中取出的浓缩洗涤液可能有结晶，属于正常现象，可用 40℃水浴微加热使结晶完全溶解后再配制洗涤液（加热温度不要超过 50℃，使用时洗涤液应为室温）。当日使用 。

3.**标准品配制**:浓度为 15ng/mL 然后根据需要用**通用稀释液** 进行 1：2 倍比稀释（注：不要直接在反应孔中进行倍比稀释）。建议配制成以下浓度：**15、7.5、3.75、1.875、0.9375、0.468、0.234、0ng/mL**，标准品&样品稀释液直接作为空白孔 0ng/mL

4.**生物素标记抗肠激酶抗体工作液**：实验前计算当次实验所需用量（以 **100μL/孔计**），用**通用稀释液稀释 100 倍，**实际配制时应多配制 100-200μL；

5.**链霉亲和素 HRP 工作液**：实验前计算当次实验所需用量（以 **100μL/孔计**），用**通用稀释液稀释 100 倍 ，** 实际配制时应多配制 100-200μL；

6.**TMB 底物液:**使用前，提前放置室温平衡

**洗涤方法:**

1.自动洗板机：每孔加入洗涤液 350μL，注入与吸出间隔 60 秒。

2.手工洗板：甩尽孔内液体，在洁净的吸水纸上拍干，每孔加洗涤液 350μL，浸泡 1-2 分钟，吸去（不可触及板壁）或甩掉酶标板内的液体，在厚的吸水纸上拍干。

**操作步骤:**

实验开始前，各试剂均应平衡至室温；试剂或样品配制时，均需充分混匀，并尽量避免起泡。

1.加样：分别设空白孔、标准品孔、待测样品孔。空白孔加样品稀释液 100μL，标准品孔分别加入依次梯度稀释标准品，待测样品孔加待测样品 100μL，给酶标板覆膜，37℃孵育 60 分钟。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.弃去孔内液体，甩干，洗板 3 次，每次浸泡 1-2 分钟，大约 350μL/每孔，甩干并在吸水纸上轻拍将孔内液体拍干。立即每孔加入配好的**生物素标记的抗**肠激酶**抗体工作液** 100μL（在使用前 15 分钟内配制），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。给酶标板覆膜，37℃孵育 60 分钟。为保证实验结果有效性，每次实验请使用新的标准品溶液。

3.弃去孔内液体，甩干，洗板 3 次，每次浸泡 1-2 分钟，大约 350μL/每孔，甩干并在吸水纸上轻拍将孔内液体拍干；

4.立即每孔加入配好的**链霉亲和素 HRP 工作液** 100μL（在使用前 15 分钟内配制），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。给酶标板覆膜，37℃孵育 45 分钟;

5.弃去孔内液体，甩干，洗板 3 次，每次浸泡 1-2 分钟，大约 350μL/每孔，甩干并在吸水纸上轻拍将孔内液体拍干；

6.每孔加 TMB 底物溶液(TMB)100μL，酶标板加上覆膜 37℃避光孵育 15 分钟左右（根据实际显色情况酌情缩短或延长，但不可超过 30 分钟。当标准孔出现明显梯度时，即可终止）。

7.每孔加终止液 100μL，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（OD 值）。应提前打开酶标仪电源，预热仪器，设置好检测程序。

9.实验完毕后将未用完的试剂按规定的保存温度放回冰箱保存至有效期结束。

**注意事项:**

1.保存：试剂盒中各试剂请按说明书提示合理存放。在储存及温育过程中避免将试剂暴露在强光中。所有试剂瓶盖须旋紧以防止蒸发和微生物的污染，否则可能会出现错误的结果。

2.酶标板：刚开启的酶标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。暂时不用的板条应拆卸后放入备用铝箔袋，按推荐温度存放!

3.加样：加样或加试剂时，第一个孔与最后一个孔的加样时间间隔如果太大，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。每次的加样时间最好控制在 10 分钟内。推荐设置复孔。

4.温育：为防止样品蒸发，实验时必须给酶标板覆膜；洗板后应尽快进行下步操作，避免酶标板处于干燥状态；严格遵守给定的温育时间和温度。

5.洗涤：洗涤过程中反应孔中残留的洗涤液应在吸水纸上拍干，勿将滤纸直接放入反应孔中吸水。在读数前要注意清除底部残留的液体和手指印，以免影响酶标仪读数。

6.显色时间的控制：加入底物后请定时观察反应孔的颜色变化（比如每隔 5 分钟），如梯度已很明显，请提前加入终止液终止反应，避免颜色过深影响酶标仪读数。

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。

8.混匀：充分轻微混匀对反应结果尤为重要，最好使用微量振荡器(使用最低频率)，如无微量振荡器，可在反应前手工轻轻敲击酶标板框混匀。

9.安全：试验中请穿着实验服并带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。

10.不同批号的试剂盒组份不能混用（洗涤液和反应终止液除外）

11.试验中所用的 EP 管和吸头均为一次性使用，严禁混用，否则将影响试验结果!

**结果判断:**

1.以标准品的浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，绘制标准曲线。如有设置复孔，则应取其平均值计算。以标准品的浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，绘出标准曲线。亦可以 OD 值为横坐标，标准品的浓度为纵坐标，绘出标准曲线。

2.推荐使用专业的曲线制作软件，如 **Curve Expert 1.4** 或 **ELISA Calc 软件**，在软件界面既可根据样品 OD 值，由标准曲线查出相应的浓度，乘以稀释倍数；亦可将样品的 OD 值代入标准曲线的拟合方程式，计算出样品浓度，再乘以稀释倍数，即为样品的实际浓度。

3.若样品 OD 值高于标准曲线上限，应适当稀释后重测，计算浓度时应乘以稀释倍数。

**灵敏度、检测范围、特异性和重复性:**

●灵敏度：最小可测 117pg/mL。

●检测范围：0.234-15 ng/mL。

●特异性：与其它蛋白无交叉反应。

●重复性：板内，板间变异系数均<10%。

检测过程中可能出现检测值过高超过试剂盒检测范围，此时应该进一步稀释样本重新实验。

***本试剂仅供实验室研究使用**