



proteintech™

Antibodies | ELISA kits | Proteins

# 双抗夹心 ELISA Kit 操作手册

该产品仅适用科研，不适用于诊断及治疗。

# 目录 Content

I. 试剂盒组分及其存放条件.....	3
II. 实验器材准备 .....	4
III. 实验前准备 .....	4
IV. 操作步骤 .....	8
V. 数据分析 .....	11
VI. 限制说明 .....	11

## I. 试剂盒组分及其存放条件 \*

试剂盒组成	数量与规格	存放条件和时间
微孔板 (酶标板) Microplate - 已经预包被捕获抗体 (8 孔 x 12 条)	1 块	4°C 存放 6 个月
标准品 (Standard) - 蛋白冻干粉	2 瓶	4°C 存放 6 个月
检测抗体浓缩液 Detection Antibody (100 X) - 120 μL / 支	1 支	4°C 存放 6 个月
HRP 标记抗体浓缩液 HRP-conjugated antibody (100 X) - 120 μL / 支 或 HRP 标记链霉亲和素浓缩液 Streptavidin-HRP(100X) - 120 μL / 支 *	1 支	4°C 存放 6 个月
样本稀释液 (Sample Diluent) - 30 mL / 瓶	1 瓶	4°C 存放 6 个月
抗体稀释液 (Detection Diluent) - 30 mL / 瓶	1 瓶	4°C 存放 6 个月
裂解液 (Extraction Reagent) - 30 mL / 瓶 **	1 瓶	4°C 存放 6 个月
浓缩洗涤液 Wash buffer concentrate (20 X) - 30 mL / 瓶	1 瓶	4°C 存放 6 个月
TMB 显色液 - 12 mL / 瓶	1 瓶	4°C 存放 6 个月
终止液 (Stop Solution) - 12 mL / 瓶	1 瓶	4°C 存放 6 个月
封板膜	3 张	-

\* 每个试剂盒组分存在差别，具体请参考相应的说明书

\*\* 仅在样本类型是裂解液时提供

### 注意事项：

- » 不推荐使用过期试剂盒
- » 样本稀释液用于稀释标准品和样本，需根据不同的样本类型选择对应的样本稀释液
- » 抗体稀释液用于稀释检测抗体以及 HRP 标记抗体或 HRP 标记链霉亲和素

# 双抗夹心 ELISA Kit 操作手册

## II. 实验器材准备

1. 酶标仪（可读取450 nm和630 nm双波长）
2. 高精度移液器及一次性移液器枪头
3. 超纯水或去离子水
4. 洗板机（亦可手动洗板）
5. 塑料或者玻璃EP管（用于稀释标准品及样本）
6. 吸水毛巾或滤纸
7. 烧杯和量筒
8. 100 mM PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride) 存储液（1g PMSF溶于57mL异丙醇）
9. 用于ELISA实验的数据分析的统计拟合软件（推荐用4参数拟合分析方法），如：Orign, ELISA Calc等

## III. 实验前准备

### 1. 样本准备

#### 注意事项：

- » 所有生物样本需符合法律的相关规定。
- » 建议增加预实验以确定待检测样本的最佳稀释度，确保样本测值落在标准曲线内。

#### A. 血清

全血标本自然凝集 30 min 后 1000 × g 离心 15 min，取上清即可检测。上清可存放于 -20℃，避免反复冻融。

## B. 血浆

可用 EDTA 或肝素作为抗凝剂，标本采集后 30 min 内于 2-8℃ 1000×g 离心 15 min，或将标本放于 -20℃，避免反复冻融。

**(注意：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)**

## C. 细胞上清

收集细胞培养液，离心取上清，-20℃ 存放，避免反复冻融。

## D. 细胞裂解样本

1. 收集细胞后，用预冷的 10 mM PBS 洗 3 次，5000 × g 离心 5 min。
2. 细胞计数，离心弃上清；
3. 加 PMSF 至细胞裂解液中，终浓度为 1 mM；
4. 按每  $1 \times 10^7$  个细胞，加入 1 ml 细胞裂解液（含 PMSF），冰上裂解 30 min，其间上下颠倒使裂解更充分，超声波破碎处理；
5. 4℃，10000 × g 离心 10 min；
6. 检测细胞裂解样本总蛋白浓度；
7. 整个过程需在冰上操作，防止蛋白降解。

## E. 组织裂解样本

1. 加 PMSF 至细胞裂解液中，终浓度为 1 mM；
2. 预先将待检组织用剪刀剪碎，液氮研磨，再按每 100 mg 组织加 1 mL 裂解液，用研磨器进行研磨，得到的匀浆液可利用超声破碎处理；
3. 4℃，10000 × g 离心 10 min，取上清，-80℃ 存放；
4. 检测组织裂解样本总蛋白浓度；
5. 整个过程需在冰上操作，防止蛋白降解。

# 双抗夹心 ELISA Kit 操作手册

## F. 尿液

收集尿液后， $1000 \times g$  离心 20 min，取上清， $-20^{\circ}\text{C}$  或者  $-80^{\circ}\text{C}$  存放，避免反复冻融。

## G. 人乳

收集样本后， $10000 \times g$  离心 15 min，取澄清部分，浑浊液再次离心取澄清，收集澄清部分， $-20^{\circ}\text{C}$  存放，避免反复冻融。

## 2. 试剂准备

### 注意事项：

- » 实验前，需要将缓冲液试剂在室温平衡 20-30 min（检测抗体、HRP 标记抗体/HRP 标记链霉亲和素不需要平衡室温，即用即取）。

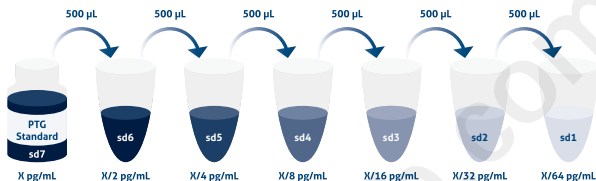
实验前，请仔细阅读以下内容

### A. 标准品

每次实验新溶解一瓶标准品。建议标准品和样品都做复孔检测（两个或两个以上重复孔）。

1. 每瓶冻干品，按说明书推荐的稀释液（Sample Diluent）加对应体积，做标记“sd7”，以此作为标准曲线的起始浓度  $X \text{ pg / mL}$ 。溶解后的冻干品需要在 30 min 内用完。
2. 在其余 EP 管中各加入 0.5 mL 对应的样本稀释液，按说明书中的标曲稀释图进行梯度稀释。梯度稀释时需充分混匀。
3. 用样本稀释液（Sample Diluent）作为“零孔”，标记“sd0”。

## 梯度稀释推荐：



X pg/mL: 每个试剂盒的梯度稀释都可以在相应的产品说明书中查看。

	梯度稀释	#样本稀释液
"sd7"	-	2000 µL**
"sd6"	500 µL	500 µL
"sd5"	500 µL	500 µL
"sd4"	500 µL	500 µL
"sd3"	500 µL	500 µL
"sd2"	500 µL	500 µL
"sd1"	500 µL	500 µL

\*\*具体请查看相应试剂盒说明书

## B. 检测抗体

**检测抗体 (100 ×) 浓缩液：**按稀释比例 1:100 稀释，稀释前根据预先计算好的每次实验所需的总量配制 (100 µL/孔)，实际配制时应多配制 0.1-0.2 mL。如 10 µL 检测抗体加 990 µL 抗体稀释液的比例配制，轻轻混匀。

**注意：**检测抗体 (100 ×) 浓缩液使用之前需要瞬时离心。

## 双抗夹心 ELISA Kit 操作手册

### C. HRP 标记抗体 /HRP 标记链霉亲和素

**HRP 标记抗体 /HRP 标记链霉亲和素 (100×) 浓缩液:** 按稀释比例 1:100 稀释, 稀释前根据预先计算好的每次实验所需的总量配制 (100  $\mu$ L/孔), 实际配制时应多配制 0.1-0.2 mL。如 10  $\mu$ L HRP 标记抗体加 990  $\mu$ L 抗体稀释液的比例配制, 轻轻混匀。

**注意:** HRP 标记抗体 /HRP 标记链霉亲和素 (100×) 浓缩液使用之前需要瞬时离心。

### D. 洗涤液

浓缩洗涤液 (20X) 使用之前需平衡室温。(如果洗涤液 (20x) 有晶体析出, 37°C 加热至晶体全部溶解。) 取 30 mL 浓缩洗涤液 (20×), 加入 570 mL 超纯水或去离子水, 得到洗涤液 (1×)。

## IV. 操作步骤

### 注意:

- » 试剂使用前需平衡室温
- » 每种试剂用前需混匀
- » 推荐上样时, 标准品、对照、所有样本都做复孔 (2个或2个以上的重复)
- » 每次实验, 必须做标准曲线



## 操作流程：

**注意：不同试剂盒操作流程有所差异，具体可参考试剂盒说明书**

1. 提前准备好所有的试剂、样本、标准品工作液【参照Ⅲ.实验前准备 1. 样本准备，Ⅲ.实验前准备 2. 试剂准备（包括标准品的准备）】。
2. 根据实验用量，取出需要用到的酶标板条，剩余板条用封板膜封住板孔，加入干燥剂连同铝箔袋密封放 4℃，并于一周之内用完。
3. 加样，分别设零孔、标准孔、待测样品孔。零孔加样品稀释液 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孔底部，尽量不触及孔壁。（确保上样不间断，5-10 min上完样本）。
4. 酶标板加上盖或覆膜，湿盒放置，**孵育温度及时间请参照说明书**。
5. 洗涤
  - i. 揭开封板膜（动作轻柔，避免动作过大导致液体溢出串孔）；
  - ii. 弃液体；
  - iii. 毛巾或者滤纸将板内残留液体拍出；
  - iv. 用**洗涤液（1×）**洗涤板条4次，每孔350-400 μL，最后一次洗涤后，确保板内无残留液体，避免毛巾或者滤纸纤维进入板内，板条也不能长时间放室温导致干透。
6. 每孔加100 μL **1×检测抗体**（Detection Antibody）（参照Ⅲ. 实验前准备 2.试剂准备），盖上封板膜，湿盒放置，37℃ 1h。重复步骤5

## 双抗夹心 ELISA Kit 操作手册

7. 每孔加100  $\mu$ L **1  $\times$  HRP标记抗体** (HRP-Conjugate Antibody) / HRP标记链霉亲和素 (Streptavidin-HRP) (参照 III. 实验前准备 2. 试剂准备), 盖上封板膜, 湿盒放置, 37 $^{\circ}$ C 40 min. 重复步骤5
8. 显色: 每孔加TMB显色液100  $\mu$ L, 37 $^{\circ}$ C (不需要置于湿盒环境) 避光显色 15-20 min (如果颜色偏浅, 可适当延长显色时间, 不超过30 min)。
9. 终止: 每孔加终止溶液100  $\mu$ L, 此时蓝色变为黄色。终止液的加入顺序应与TMB显色液的加入顺序一致。(注意: **眼睛和皮肤避免接触终止液**)。
10. 读数: 以630 nm为校正波长, 用酶标仪在450 nm波长测量各孔的光密度 (OD值)。在加终止液后5 min内进行读数。

### 操作流程说明\*:

步骤	试剂	体积	孵育时间	洗涤次数	备注
1-5	标准品和样本	100 $\mu$ L	60 or 120 min	4 次	37 $^{\circ}$ C或4 $^{\circ}$ C孵育, 盖封板膜
6	检测抗体 (1 $\times$ )	100 $\mu$ L	60 min	4 次	37 $^{\circ}$ C孵育, 盖封板膜
7	HRP 标记抗体 /HRP 标记链霉亲和素 (1 $\times$ )	100 $\mu$ L	40 min	4 次	37 $^{\circ}$ C孵育, 盖封板膜
8	TMB 显色液	100 $\mu$ L	10-30 min	不洗涤	37 $^{\circ}$ C孵育, 避光
9	终止液	100 $\mu$ L	0 min	不洗涤	-
10	以 630 nm 为校正波长, 在 450 nm 波长下读数, 加样后 5 min 内读数。				

\*具体操作流程请参考试剂盒说明书

## V. 数据分析

每个标准品和样本的 OD 值需减去零孔的 OD 值，如设置复孔，则应取其平均值。以标准品的浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，使用专业曲线制作软件进行四参数拟合（4 PL），如 Origin、ELISACalc 等。根据样品的 OD 值由标准曲线推算出相应的浓度，再乘以稀释倍数。

## VI. 限制说明

1. 检测抗体浓缩液和HRP标记抗体/HRP标记链霉亲和素浓缩液使用之前需瞬时离心。
2. 不要使用过期试剂盒。
3. 本产品只用于科研，不适用于临床。
4. 严格按照本操作手册的说明，不允许用其它试剂来替换本产品的任何组分。
5. 若样本浓度过高，超过了标曲范围，则样本需要用**样本稀释液**做进一步稀释，确保稀释后的OD值在标曲范围内。
6. 建议标准品和样品都做复孔（2个或2个以上重复），尽量避免实验误差。



**proteintech™**

Antibodies | ELISA kits | Proteins

**Proteintech Group Inc**

5400 Pearl Street, Suite 300  
Rosemont, IL 60018, USA  
Phone: (1-888-478-4522) (toll free in USA)  
Fax: 1(847) 928-2189  
E-MAIL: [Proteintech@ptglab.com](mailto:Proteintech@ptglab.com)

**Proteintech Europe Ltd**

4th Floor, 196 Deansgate  
Manchester  
M3 3WF, United Kingdom  
Tel: +44-(161)-839-3007  
Fax: +44-(161)-241-3103  
E-MAIL: [Europe@ptglab.com](mailto:Europe@ptglab.com)

**Wuhan Sanying Biotechnology Ltd**

D3-3, No.666 Gaoxin Avenue  
Wuhan East Lake Hi-tech Development Zone  
Wuhan, Hubei, China  
Tel: 027-8753-1629 or 400-6900-926  
Fax: 027-8753-1627  
E-MAIL: [Proteintech-CN@ptglab.com](mailto:Proteintech-CN@ptglab.com)