Speedy™ 人IgA一步法ELISA检测试剂盒

请在实验前仔细阅读本说明书

产品货号： SE50339

规 格： 96T

灵敏度： 0.07 ng/mL

检测范围: 0.313-20 ng/mL

用 途： 此试剂盒用于定量检测血清、血浆、尿液、唾液以及母乳中的人IgA浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

目录

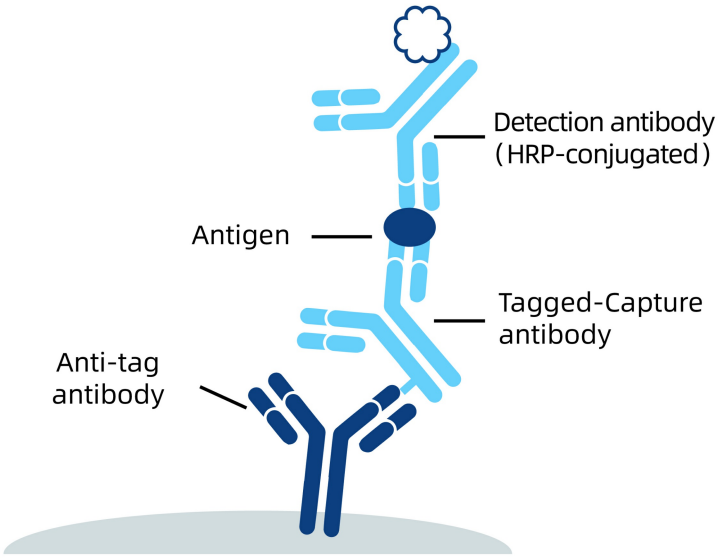
一：背景信息 3
二：检测原理 3
三：需自备的实验器材 3
四：试剂盒组分及储存 4
五：实验注意事项 4
六：样本准备 4
七：试剂准备 5
八：实验步骤 6
九：实验参数 7
9.1 参考标曲图 7
9.2 精密度 8
9.3 加标回收率 8
9.4 样本值 8
9.5 灵敏度 8
9.6 线性 9
9.7 特异性 10
十：参考文献 10

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

一：背景信息

免疫球蛋白A（IgA）是一种关键的抗体，在免疫系统的第一道防线中起着至关重要的作用，主要保护身体的黏膜表面，如呼吸道、消化道和泌尿生殖道。作为人体血清中含量第二多的免疫球蛋白亚型，同时也是唾液、泪液和母乳等外分泌物中的主要抗体，IgA具有特异性，可中和病原体，防止毒素和微生物附着于上皮细胞，并维持与人体天然菌群之间的健康平衡。

二：检测原理



抗标签抗体预先包被于板孔，可结合带标签的捕获抗体。抗原或样本、捕获抗体及辣根过氧化物酶（HRP）标记的检测抗体加入后，在溶液中形成夹心复合物。在HRP催化下，四甲基联苯胺（TMB）使底物溶液由无色变蓝，加入终止液后变黄。溶液颜色深浅与结合蛋白量成正比。测量波长为450 nm，校正波长为630 nm。

三：需自备的实验器材

3.1 酶标仪（可读取450nm和630nm双波长）；

3.2 高精度移液器及一次性移液器枪头；

3.3 洗板机（亦可手动洗板）；

3.4 EP管（用于稀释标准品及样本）；

3.5 吸水毛巾或滤纸（用于拍干）；

3.6 烧杯和量筒；

3.7 用于ELISA实验的数据分析的统计拟合软件（推荐四参数拟合方法），如：Origin，ELISA Calc等，也可使用Proteintech 公司数据分析网站：https: //www.ptgcn.com/products/elisa-kits/；

3.8 微孔板恒温振荡器。

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

四：试剂盒组分及储存

英文名称	中文名称	规格	数量
Microplate	预包被酶标板 - 96 孔板	8孔 × 12条	1 块
Protein standard	标准品 - 冻干粉状 *	40 ng/瓶	2 瓶
Capture Antibody (100×)	捕获抗体浓缩液（100×） **	60 uL/管	1 管
Detection antibody, HRP-Conjugated (100×)	HRP标记检测抗体浓缩液 （100×） **	60 uL/管	1 管
Sample Diluent PT 4B1	样本稀释液 PT 4B1	30 mL/瓶	2 瓶
Detection Diluent PT PB1	抗体稀释液 PT PB1	15 mL/瓶	1 瓶
Wash Buffer Concentrate (20×)	浓缩洗涤液（20×）	30 mL/瓶	1 瓶
Tetramethylbenzidine Substrate (TMB)	显色底物 TMB	12 mL/瓶	1 瓶
Stop Solution	终止液	12 mL/瓶	1 瓶
Plate Cover Seals	封板膜		4张
储存条件： 1：未开启试剂盒可在2-8°C条件下存放6个月或者在-20°C条件下存放1年 2：已开启试剂盒可在2-8°C存放7天 3：每次实验均使用新的标准品,使用后丢弃			

* 使用对应的样本稀释液对标准品进行复溶，详见7.4部分，复溶过程避免产生气泡

** 开盖前请离心

五：实验注意事项

5.1 避免皮肤接触终止液以及TMB 显色液；

5.2 在实验过程中，注意穿戴个人防护装备，如实验服，手套，口罩和护目镜；

5.3 请勿将不同批次的试剂进行混用，过期产品请勿使用；

5.4 在使用自动洗板机时，板孔加入洗涤液之后，设置30秒的浸泡程序，以提高分析的精确度。

六：样本准备

6.1 血清：全血标本室温凝固 30 min后1000×g 离心15 min，取上清立即使用或分装后-20°C存放，避免反复冻融。

6.2 血浆: 可用EDTA、肝素或柠檬酸盐作为抗凝剂，标本采集后1000×g 离心15 min，立即使用或分装后-20°C存放，避免反复冻融(注意：标本溶血会影响检测结果，因此溶血标本不宜进行检测)。

6.3 尿液: 收集尿液后，1000×g离心20 min，取上清，立即使用或分装后-20°C存放，避免反复冻融。

6.4 唾液: 收集唾液后10000×g 离心5 min，取上清立即使用或分装后-20°C存放，避免反复冻融。

6.5 母乳: 收集样本后，在2-8°C条件下1000×g离心15 min，取澄清部分，重复此过程2次，立即使用或分装后-20°C存放，避免反复冻融。

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

七：试剂准备

7.1 洗涤液（1×）的配制：

如果洗涤液（20×）有晶体析出，37°C加热至晶体全部溶解。按1:20稀释倍数进行稀释：如取30 mL 浓缩洗涤液（20×），加入570 mL 超纯水或去离子水，得到1×洗涤液。

7.2 抗体混合液（1×）的配制：

开盖前瞬时离心，将捕获抗体和检测抗体稀释分别按1:100比例稀释到到同一管稀释液中，配制成检测所需的工作液。例如：将50 uL包被抗体浓缩液（100×）和50 uL检测抗体浓缩液（100×）加入 4900 uL抗体稀释液，混匀配制成1×抗体混合液。

7.3 待检测样本：

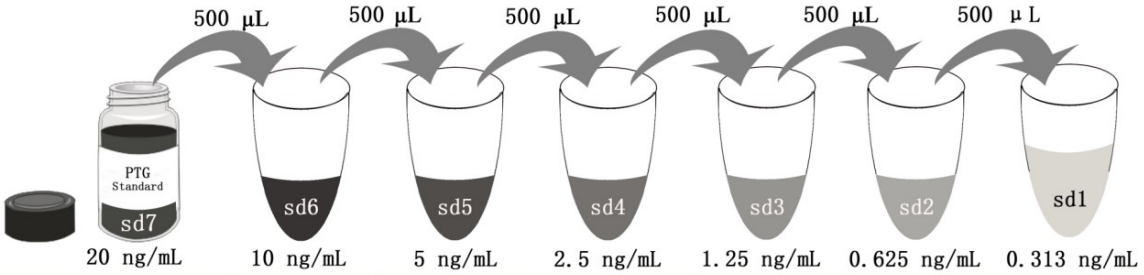
不同的样本使用相应的样本稀释液进行稀释，样本最低稀释比为1:2，即每个样本孔中最多加入样本原液25 uL。

如果样本检测值超过标曲最高范围，可将样本进一步稀释后再进行实验，使样本的检测值处于标曲范围内，不同样本的稀释倍数需自行优化。

稀释比推荐如下：人血清和血浆样本1:400000或1:800000稀释；尿液样本1:80或1:160稀释；唾液样本1:8000或1:16000稀释；母乳样本1:40000或1:80000稀释；样品采集、处理和储存的差异可能导致测值的改变。

7.4 梯度稀释的标准品：

使用2 mL PT 4B1 样本稀释液复溶标准品，具体操作如下:



Add # µL of Standard diluted in the previous step	—	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL
# µL of Sample Diluent PT 4B1	**2000 µL**	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL
	"sd7"	"sd6"	"sd5"	"sd4"	"sd3"	"sd2"	"sd1"

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

八：实验步骤

实验前，需要将所需试剂在室温平衡20-30 min（捕获抗体浓缩液和HRP标记检测抗体浓缩液不需要平衡室温，即用即取）； 在进行标准品、样本以及不同试剂加样时，更换枪头，避免接触微孔板的内表面，不同的试剂，使用不同的加样槽；

8.1 根据实验用量，取出需要用到的酶标板条，剩余板条加入干燥剂放入铝箔袋密封后存放于4°C，并于一周之内用完；

8.2 加样，分别设零孔、标准孔、待测样本孔。零孔加样本稀释液50 µL，余孔分别加梯度稀释的标准品或待测样本50 µL/孔，注意不要产生气泡（建议标准品和样本都做复孔，尽量避免实验误差，确保上样不间断，5-10 min 完成加样）；

8.3 每孔加50 µL 抗体混合液（1×）(参照试剂准备部分7.2)，盖上封板膜，恒温振荡器上37°C 400 rpm 孵育 1 h（若无恒温振荡器，此步骤建议37°C静置孵育2 h）；

8.4 洗涤

1） 揭开封板膜（动作轻柔，避免动作过大导致液体溢出串孔），弃液体，拍干；

2） 洗涤液（1×）洗涤板条，每孔350-400 µL，洗涤后，甩掉液体拍干板条，重复此步骤4次，避免异物进入板孔；

8.5 显色：每孔加TMB显色液100 µL，恒温振荡器上37°C 400 rpm 孵育15-20 min（如果颜色偏浅，可适当延长显色时间，不超过30 min；保持显色底物始终处于避光状态，显色底物在加样前应是无色透明，如有变色，请勿使用）；

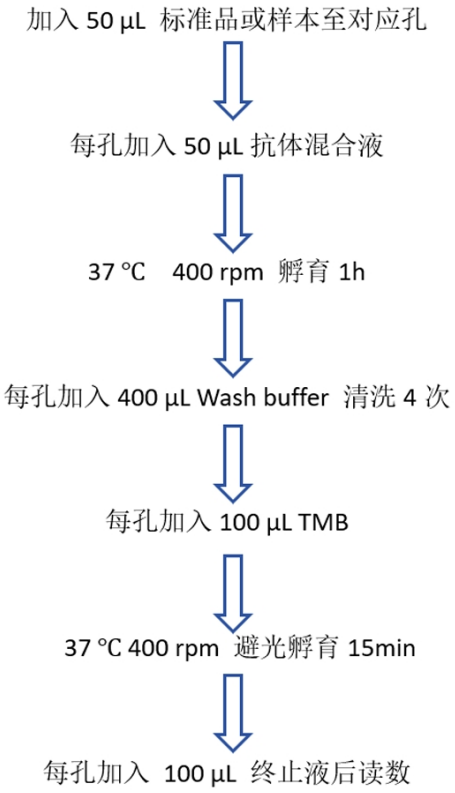
8.6 终止：每孔加终止液100 µL，蓝色变黄色。终止液与TMB显色液的加样顺序一致；（注意：眼睛和皮肤避免 接触终止液）

8.7 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)。加入终止液后5 min内进行读数，若无630 nm波长，也可直接使用450 nm波长读数；

8.8 数据分析: 每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值，设置复孔，取其平均值。以标准品的浓度为横坐标，OD值为纵坐标，使用专业软件（如Origin、ELISACalc等）进行四参数拟合（4-PL），根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度，乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

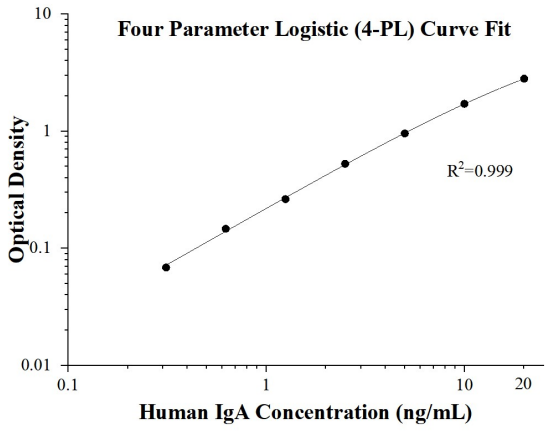
USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

操作流程如下：



九：实验参数

9.1 参考标曲图



(ng/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.0874 0.0876	0.0875	-
0.313	0.1536 0.1583	0.1560	0.0685
0.625	0.2341 0.2345	0.2343	0.1468
1.25	0.3532 0.3476	0.3504	0.2629
2.5	0.6015 0.6286	0.6151	0.5276
5	1.0348 1.0549	1.0449	0.9574
10	1.7912 1.8104	1.8008	1.7133
20	2.8973 2.8897	2.8935	2.8060

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

9.2 精密度

板内精密度: 3个不同浓度的样本在板内重复测定 8 次;

板间精密度: 3个不同浓度的样本在板间重复测定 16 次。

板内精密度 (CV内)				
样本	数量	平均值 (ng/mL)	标准差	变异系数CV%
1	8	9.39	0.48	5.11
2	8	2.58	0.19	7.36
3	8	1.36	0.02	1.47

板间精密度 (CV 间)				
样本	数量	平均值 (ng/mL)	标准差	变异系数CV%
1	16	9.39	0.40	4.26
2	16	2.58	0.14	5.43
3	16	1.39	0.04	2.88

9.3 加标回收率

样本稀释后，在标曲范围内选择高、中、低3个浓度，进行人IgA的加标回收率实验，结果如下:

样本类型	稀释倍数	平均值 (%)	范围 (%)
人血浆	1:1600000	103	101-106
	1:3200000	110	109-111
尿液	1:320	93	89-98
	1:640	97	96-98
唾液	1:32000	91	88-97
	1:64000	103	94-117
母乳	1:80000	95	92-99
	1:160000	99	97-101

9.4 样本值

人血浆/尿液/唾液/母乳 - 应用本试剂盒，检测人血浆、尿液、唾液和母乳样本中人IgA的浓度。

样本类型	均值 (ug/mL)	范围 (ug/mL)
人血浆样本 (n=16)	2665.85	1331.47-4077.47
尿液样本 (n=7)	0.97	0.33-1.80
唾液样本 (n=8)	78.63	32.99-136.11
母乳样本 (n=7)	208.39	74.02-368.84

9.5 灵敏度

用20个重复的零孔平均OD值加上两倍标准差得到的OD值带入标准曲线拟合出对应的浓度值，此试剂盒中人IgA的灵敏度为0.07 ng/mL。

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

9.6 线性

用对应样本稀释液稀释样本，使稀释后的检测值处于标曲范围内，线性数据如下：

（人血浆样本预先稀释200000倍，尿液样本预先稀释40倍，唾液样本预先稀释4000倍，母乳样本预先稀释20000倍。）

		人血浆	尿液	唾液	母乳
1:2	均值（%）	100	100	100	100
	范围（%）	-	-	-	-
1:4	均值（%）	103	102	98	100
	范围（%）	101-105	101-103	94-101	100-101
1:8	均值（%）	103	98	101	103
	范围（%）	101-104	97-99	98-104	100-105
1:16	均值（%）	109	98	106	102
	范围（%）	104-113	95-101	102-110	100-104

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

9.7 特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组人IgA。

加入50 ng/mL以下类似物或干扰物，无明显交叉反应：

Human：

IgM

IgE

IgD

IgG1-IgK

IgG2-IgK

IgG3-IgK

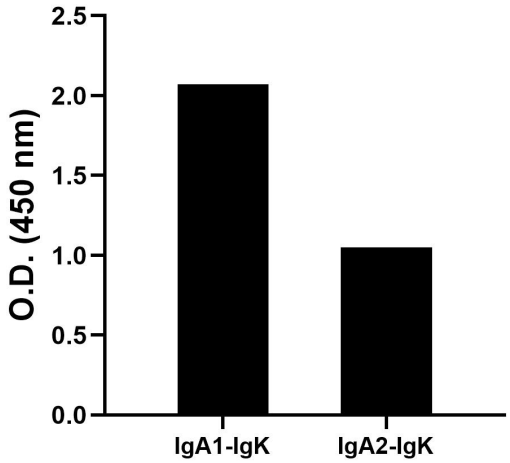
IgG4-IgK

加入12.5 ng/mL以下类似物或干扰物，有交叉反应：

Human：

IgA1-IgK

IgA2-IgK



十：参考文献

1. Rodrigues JC, Haas M, Reich HN. Clin J Am Soc Nephrol. 2017;12(4):677-686.

2. Nihei Y, Suzuki H, Suzuki Y. Front Immunol. 2023;14:1165394. Published 2023 Apr 11.

3. de Sousa-Pereira P, Woof JM. Antibodies (Basel). 2019;8(4):57. Published 2019 Dec 5.

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com