

## 人 SERPINA1双抗夹心ELISA抗体对试剂盒

请在实验前仔细阅读本说明书

**产品货号:** PA00054

**规格:** 5/10 plates

**用途:** 此试剂盒用于开发定量检测天然样本和重组样本中人 SERPINA1浓度的双抗夹心试剂盒

**说明:** 此试剂盒包含足够的材料, 在满足按说明书叙述方法稀释试剂、按说明书要求操作分析、  
使用说明书推荐的耗材及试剂的条件下, 可以在至少5个或10个96孔板上完成ELISA实验

**技术提示:** 采用高品质的牛血清白蛋白是保证实验质量的关键  
可添加适量动物血清来对样本稀释液进行优化

本产品仅用于科学研究, 不适用于临床诊断.

## 其他所需实验器材

96孔板：金灿华或赛普

封板膜

PBS：137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.2-7.4, 0.2 µm filtered

CBS：15 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 34 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 9.6, 0.2 µm filtered (货号：PR10006)

洗涤液：0.05% Tween® 20 in PBS, pH 7.2-7.4 (货号：PR10007)

通用稀释液：0.05% Tween® 20, 1% BSA in PBS, pH 7.2-7.4, 0.2 µm filtered (货号：PR10008)

显色底物TMB (货号：PK10004)

终止液：2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (货号：PR10009)

以上材料推荐辅助试剂盒 (货号：PK10029) 包含：包被液、洗涤液、通用稀释液、双组分TMB显色底物、终止液、板贴、96孔板。也可根据货号单独购买。

## 试剂盒组分及储存

将未开封试剂盒储存在-20°C，请勿使用已过期试剂盒

| 中文名称                      | 规格(5 plates) | 规格(10 plates) | 配制及储存                  |
|---------------------------|--------------|---------------|------------------------|
| 人SERPINA1捕获抗体浓缩液(500×) ** | 130 µL/支     | 250 µL/支      | 具体配制及储存方法<br>请参照C of A |
| 人SERPINA1检测抗体浓缩液(500×) ** | 130 µL/支     | 250 µL/支      |                        |
| 人SERPINA1标准品 - 冻干粉状 *     | 20 µg/瓶      | 20 µg/瓶       |                        |
| HRP标记二抗浓缩液(500×) **       | 130 µL/支     | 250 µL/支      |                        |

\* 使用通用稀释液对标准品进行复溶，复溶过程避免产生气泡；复溶后分装成数管冻存于-80°C至-20°C，避免反复冻融

\*\* 开盖前请离心

## 实验注意事项

避免皮肤接触终止液以及TMB显色液；

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；

请勿将不同批次的试剂进行混用，过期产品请勿使用；

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。

## 试剂准备

### 兔抗人SERPINA1捕获抗体(1×):

开盖前瞬时离心, 按1:500比例进行稀释, 稀释前根据预先计算实验所需的总量配制(100 μL/孔), 实际配制时应多配制1-2 mL。如24 μL捕获抗体浓缩液(500×)加12 mL CBS稀释液进行配制, 轻轻混匀。

### 小鼠抗人SERPINA1检测抗体(1×):

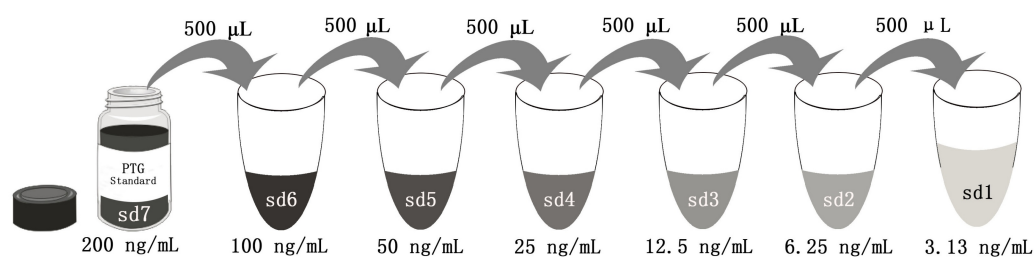
开盖前瞬时离心, 按1:500比例进行稀释, 稀释前根据预先计算实验所需的总量配制(100 μL/孔), 实际配制时应多配制1-2 mL。如24 μL检测抗体浓缩液(500×)加12 mL 通用稀释液进行配制, 轻轻混匀。

### HRP标记二抗(1×):

开盖前瞬时离心, 按1:500比例进行稀释, 稀释前根据预先计算实验所需的总量配制(100 μL/孔), 实际配制时应多配制1-2 mL。如24 μL HRP标记二抗浓缩液(500×)加12 mL 通用稀释液进行配制, 轻轻混匀。

### 人SERPINA1标准品:

使用1 mL 通用稀释液复溶标准品并稀释至200 ng/mL, 用通用稀释液2倍梯度稀释, 具体操作如下:



## 实验步骤

实验前, 需要将所需试剂在室温平衡20-30 min(抗体浓缩液、HRP标记二抗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。

1 包被: 每孔加100 μL捕获抗体(1×)(参照试剂准备部分)至96孔板中, 盖上覆膜, 4°C孵育过夜。

2 封闭:

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) 每孔加入200 μL通用稀释液, 盖上覆膜, 37°C孵育2 h;

3 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, 避免异物进入板孔以及板条干燥;

4 加样: 分别设零孔、标准孔、待测样本孔。零孔加样本稀释液100 μL, 余孔分别加梯度稀释的标准品或待测样本100 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), 酶标板盖上覆膜, 37°C孵育2 h;

5 重复步骤3;

6 每孔加100 μL 检测抗体(1×)(参照试剂准备部分), 盖上封板膜, 37°C孵育1 h;

7 重复步骤3;

8 每孔加100 μL HRP标记二抗(1×)(参照试剂准备部分), 盖上封板膜, 37°C孵育40 min;

9 重复步骤3;

10 显色: 每孔加TMB显色液100  $\mu$ L, 37°C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; 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);

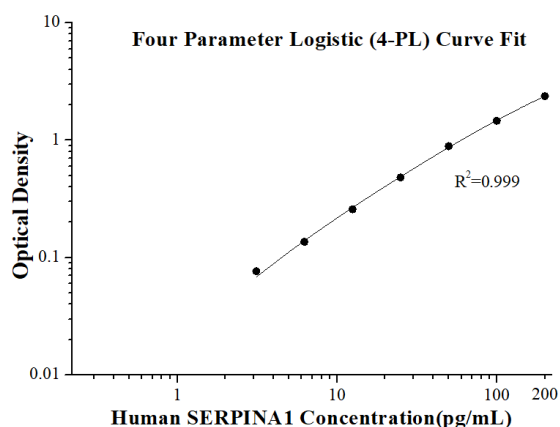
11 终止: 每孔加终止液100  $\mu$ L, 蓝色变黄色。终止液与TMB显色液的加样顺序一致; (注意: 眼睛和皮肤避免接触终止液)

12 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;

13 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。

## 实验参数

### 参考标曲图



### 特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组人SERPINA1, 加入50 ng/mL以下细胞因子, 无明显交叉反应

Human:

Serpin A3

Serpin A4

Serpin A5

Serpin A9

Serpin C1

Serpin F2

Mouse:

Serpin D1

## 常见问题分析

### 标准曲线不佳

用于配制稀释液的BSA纯度不佳

标准品储存不当或配制不准确

洗板不完全或加样量不准确

孵育时间或温度不准确

### 重复性不好

洗板不完全或加样量不准确

试剂混合不均匀

### 显色低或不显色

用于配制稀释液的BSA纯度不佳

孵育时间或温度不准确

底物加入量不足