



# INSTRUCTION MANUAL



**FOR RESEARCH USE ONLY; NOT FOR THERAPEUTIC OR DIAGNOSTIC APPLICATIONS!**

**PLEASE READ THROUGH ENTIRE procedure BEFORE BEGINNING!**

<http://zcibio.com>

---

仅供科研使用，不得用于临床检验。

## 透明质酸（HA）定量检测试剂盒（ELISA） 说明书

### 【产品名称】

通用名称：透明质酸（HA）定量检测试剂盒（ELISA）

英文名称：Hyaluronic acid（HA）ELISA KIT

货号：ZC-34892-J

### 【包装规格】

96T/48T

### 【预期用途】

仅供科研使用，定量检测血清、血浆、组织匀浆、细胞培养上清液中透明质酸（HA）的浓度。

### 【检验原理】

试剂盒采用酶联免疫分析方法。采用生物素标记HA，纯化的抗HA抗体包被微孔板，在竞争抑制反应中，一定量的固相抗体与生物素标记HA及非标记抗原（校准品或标本）进行抑制竞争反应，抗体与生物素标记的HA结合量受非标记抗原量所抑制，非标记抗原量多，抗体与生物素标记的HA结合就少，反之结合就多；反应平衡后，形成固相抗体-生物素化HA，再加入酶标记的亲合素，形成固相抗体-生物素化HA-酶标-亲合素复合物。经加底物显色后，用酶标仪在450nm波长下测定吸光度（OD值）。随着HA浓度的升高，OD值逐渐下降呈良好的线性关系。本试剂盒具有灵敏度高、特异性强、重复性好、操作简单、快速等特点，对血清中HA的减少或升高有可靠的检出性能。

---

## 试剂盒限制性

- 1、仅供科研使用，不得用于临床诊断。
- 2、在试剂盒标示的有效期内使用，过期产品不得使用。
- 3、跟其他厂家的试剂盒或者组分不能混用。
- 4、使用试剂盒配套的样品稀释液。
- 5、如果样本值高于最高标准品浓度值，请将样本适当稀释后，再重新测定。
- 6、待测样本中存在的人抗鼠等异嗜抗体会干扰检测结果，检测前，请排出该因素。
- 7、通过其他方法得到的检测结果，与本试剂盒测定结果不具有直接的可比性。

## 技术提示

- 1、混合蛋白溶液时，避免起泡。
- 2、加校准品与样本时，每个校准品浓度和样本都要更换移液枪头，公共组分应该悬臂加样，避免交叉污染。
- 3、合适的温育时间，和充分的洗涤步骤，是保证实验结果准确性的必要条件。
- 4、使用自动洗板机时，加入一个30秒浸泡的步骤，可以提高检测精度。
- 5、底物溶液为无色液体，保存过程中变为蓝色，代表底物溶液已经失效，不得使用。
- 6、终止液加样顺序与底物溶液加样顺序一致，加入终止液后，蓝色底物产物，会瞬间变为黄色。
- 7、实验中，用剩的板条，应立即放回自封袋中，密封（低温干燥）保存。
- 8、所有液体组分，使用前充分摇匀，严格按照说明书标明的时间、加样量及加样顺序进行温育操作。

## 试剂盒组分与保存

未开封的试剂盒保存在2-8度，不得使用过期试剂盒。

组分	数量	主要成分	开封后储存
校准品	0.35ml/管	--	2-8℃14天
包被微孔板	96T/48T	预包被固相抗体	2-8℃14天
HRP标记抗原	10mL	HRP标记的检测抗原	2-8℃180天
底物液A	6mL	0.01%过氧化氢	2-8℃180天
底物液B	6mL	0.1%TMB	2-8℃180天
终止液	6mL	2mol/L稀硫酸	2-8℃180天
20×浓缩洗涤液	25mL	0.05%Tween20	2-8℃180天
说明书	1份	--	--
自封袋	1个	--	--
不干胶	2片	--	--

标准品浓度依次为：200、100、50、25、12.5、0 ng/mL.

## 其他用品

- 1、酶标仪（450nm）
- 2、精密移液器及一次性吸头
- 3、蒸馏水
- 4、洗瓶或者自动洗板机
- 5、37℃水浴锅或恒温箱
- 6、500ml量筒

## 生物安全

- 1、检测必须符合实验室管理规范的规定，严格防止交叉污染，所有样品、洗弃液和各种废弃物都应按照传染物进行处置。
- 2、试剂盒的液体组分中，含有proclin-300防腐剂，可能引起皮肤过敏反应，避免吸入烟雾与皮肤接触。
- 3、底物液对皮肤、眼睛和上呼吸道有刺激作用，避免吸入烟雾。
- 4、戴上防护手套，实验完成后彻底洗手。

---

## 样品的采集和储存

以下只是列出样品采集和保存的一般指南。所有样本采集保存过程中，不得使用叠氮钠做为防腐剂。

- 1、**细胞培养上清**：4000rpm条件下离心20min，去除细胞颗粒和聚合物，上清液保存在-20℃以下，避免反复冻融。
- 2、**血清**：使用不含热原和内毒素的试管，操作过程中避免任何细胞刺激，4000rpm条件下离心20min，小心地分离出血清，保存在-20℃以下，避免反复冻融。
- 3、**血浆**：肝素，EDTA，或柠檬酸钠作为抗凝剂。在4000rpm条件下，离心20分钟取上清，血浆保存在-20℃以下，避免反复冻融。

样本收集后，无法一次检测完毕，请按一次用量分装冻存，避免反复冻融，使用时在室温下解冻，确保样品均匀充分解冻。

- 4、**组织匀浆**：用预冷的PBS (0.01 M, pH=7.4)冲洗组织，去除残留血液，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9 mL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，在冰上充分研磨。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5000×g离心 5-10分钟，取上清检测。
- 5、**细胞提取液**：贴壁细胞用冷的PBS轻轻清洗，然后用胰蛋白酶消化，1000×g离心5分钟后收集细胞；悬浮细胞可直接离心收集。收集的细胞用冷的PBS洗涤3次。每  $1 \times 10^6$  个细胞中加入150-200  $\mu$ LPBS重悬并通过反复冻融使细胞破碎(若含量很低可减少PBS的体积)。将提取液于1500×g离心10分钟，取上清检测。
- 6、**其他生物体液**：1000×g 离心20分钟，除去杂质及细胞碎片。取上清检测。

## 试剂准备

- 1、使用前，所有的组分都要至少复温60min，确保充分复温到室温。
- 2、**浓缩洗涤液**：从冰箱取出的浓缩洗涤液，会有结晶产生，这属于正常现象，水浴加热使结晶完全溶解。浓缩洗涤液与蒸馏水，按1:20稀释，即1份的浓缩洗涤液，添加19份的蒸馏水。
- 3、**底物**：底物液A和B，在使用前，按1:1体积充分混合，混合后15分钟内使用。

## 操作程序

所有试剂和组分都先恢复到室温，标准品、质控品和样品，建议做复孔。

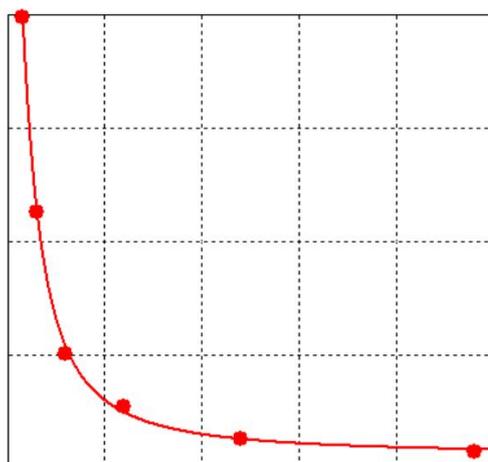
- 1、按前面说明书描述的方法，配制好试剂盒各种组分的工作液。
- 2、从铝箔袋中取出所需板条，剩余的板条用自封袋密封放回冰箱。

设置标准品孔、空白孔和样本孔，标准品孔各加不同浓度的标准品 $50\ \mu\text{L}$ ，空白孔不加，样本孔加待测样本 $50\ \mu\text{L}$ 。

- 3、除空白孔外，标准品孔和样本孔，加入辣根过氧化物酶（HRP）标记的检测抗原 $100\ \mu\text{L}$ 。
- 4、用封板膜盖住反应板， $37^\circ\text{C}$ 水浴锅或恒温箱温育60min。
- 5、揭开封板膜，弃去液体，吸水纸上拍干，每孔加满洗涤液，静置20S，甩去洗涤液，吸水纸上拍干，如此重复5次。若使用自动洗板机，请按洗板机操作程序进行洗板，添加浸泡30s的程序，可以提高检测的精度。洗板结束，加底物前，要在干净不掉屑的纸上，充分拍干反应板。
- 6、将底物A和B按1:1体积充分混合，所有孔中加入底物混合液 $100\ \mu\text{L}$ 。用封板膜盖住反应板， $37^\circ\text{C}$ 水浴锅或恒温箱温育15min。
- 7、所有孔加入终止液 $50\ \mu\text{L}$ ，在酶标仪上读取各孔吸光度（OD值）。

## 结果计算

- 1、以标准品浓度做为横坐标，对应的吸光度（OD值）作为纵坐标，利用计算机软件，采用四参数Logistic曲线拟合（4-p1），创建标准曲线方程，通过样品的吸光度（OD值），利用方程计算样品的浓度值。
- 2、如果样品被稀释，通过上述方法测的浓度值，要乘以稀释倍数，才是样品的最终浓度。



（示意图，仅供参考）

---

## 试剂盒性能指标

### 1、物理性能

试剂盒的各液体组分应澄清透明、无沉淀或者絮状物。微孔板铝箔袋应真空包装，无破损漏气。

### 2、剂量反应曲线线性

校准品剂量反应曲线相关系数 $r$ 值，大于等于0.9900。

### 3、精密度

批内精密度：三组已知的高、中、低浓度样品，进行二十次在同一个板块内精度评估。批内变异系数CV%小于10%。

批间精密度：三组已知的高、中、低浓度样品，进行二十次在不同板块内精度评估。批间变异系数CV%小于15%。

### 4、灵敏度

最低检出剂量小于1.0 ng/mL。

### 5、回收率

三组已知的高、中、低浓度样品，进行五次在同一个板块内回收率评估，回收率在85%-115%之间。

### 6、特异性

本试剂盒识别天然和重组人透明质酸（HA），与结构类似物无交叉。

### 7、稳定性

2°C-8°C保存，有效期6个月。

### 8、检测范围

6.25 ng/mL - 200 ng/mL

### ELISA法手工测定的影响因素

ELISA 法具有灵敏度高、特异性强、重复性好的特点，并具有操作简便、无放射性危害的优点，因而多年来广泛应用于血站和医院的实验室中，但在测定中常会出现一些误差和问题。我们通过几年的实验观察，认为影响结果的因素有如下方面。

#### 1. 试验仪器

(1) 加样器是否经过校正，酶免测定血清用量很少，如手工加样器的性能不好，吸取样品不精确，会使结果忽高忽低。

(2) 每次洗板前，应检查洗板机针孔有无堵塞。

#### 2. 操作

(1) 检测前先将试剂盒从冰箱取出置室温平衡 20min 后使用，试剂用完及时放回冰箱冷藏，以免造成试验结果假性降低。

(2) 加样时注意勿触及包被板底部，以免擦伤包被物使抗体（抗原）脱落而影响实验结果的准确性。

(3) 洗涤不充分，会使结果假性增高，过分洗涤呈假阴性。

(4) 比色时应保持包被孔底部无异物、无水汽，特别是冬季板从 37℃ 水浴箱取出时，底部留有水汽，应将板底擦干后进行比色，水汽或孔内气泡也会使 OD 值升高。

(5) 抗原与抗体反应达到完全平衡，依赖于温度与时间。温度高于 45℃ 易引起失活及标记物脱落，温度低于 4℃，影响反应速度。总之，由于 ELISA 实验的影响因素较多，在实际工作中必须操作规范、仔细，避免和排除各种因素的影响，使之得到准确可靠的检验结果。