（本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!）

人膜内氨酰氨基肽酶(ANPEP)酶联免疫吸附测定试剂盒

使用说明书

Human ANPEP ELISA Kit

产品货号：ZC-34210　　产品规格：96 Test

请在开始前通读整个过程！如有任何问题，请通过以下方式联系我们：

咨询电话　021-65681082
电子邮箱（技术）　zcibio@163.com
QQ 客服　2303713707
网址：　www.zcibio.com

具体保质期请见试剂盒外包装标签。

用途

该试剂盒采用“一步”夹心法酶联免疫吸附试验（ELISA）体外定量检测血清、血浆、组织、细胞或其他相关生物液体中 ANPEP 浓度。

灵敏性、检测范围、特异性和重复性

●检测范围：1 ng/mL – 32 ng/mL

●灵敏性：0.1 ng/mL

●特异性：可检测样本中的 ANPEP，且与其类似物无明显交叉反应。

●重复性：板内，板间变异系数均 < 10%。

检测原理

将目标抗体包被于 96 孔微孔板中，制成固相载体，向微孔中分别加入标准品或标本，其中的目标连接于固相载体上的抗体结合，然后加入辣根过氧化物酶标记的抗体，将未结合的抗体洗净后再次彻底洗涤后加入 TMB 底物显色。TMB 在过氧化物酶的催化下转化成蓝色，并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的目标呈正相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度（O.D.值），计算样品浓度。

试剂盒内容

名称	96 孔配置	48 孔配置	备注
微孔酶标板	8 孔×12 条	8 孔×6 条	2-8℃
标准品	0.3mL*6 管	0.3mL*6 管	-20℃（用不完）
样本稀释液	6mL	3mL	按说明书进行稀释
检测抗体-HRP	10mL	5mL	2-8℃
底物 A	6mL	3mL	2-8℃
底物 B	6mL	3mL	2-8℃
终止液	6mL	3mL	2-8℃
20×浓洗涤缓冲液	25ml	15ml	无
说明书	1 份	1 份	无
自封袋	1 个	1 个	无
封板膜	2 张	2 张	无

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，
3. EP 管及一次性吸头：0.5-10μL, 2-20μL, 20-200μL, 200-1000μL
4. 双蒸水或去离子水
5. 37℃恒温箱
6. 吸水纸

注意事项

1. 试验中请穿着实验服并戴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。
2. 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，按照上述表格中保存条件存放。
3. 检测使用的酶标仪需要安装能检测 450±10nm 波长的滤光片,光密度范围在 0-3.5 之间。
4. 不同批号的试剂盒组份不能混用(反应终止液除外)。
5. 试验中所用的 EP 管和吸头均为一次性使用，严禁混用。

样品收集方法

(具体处理方法参考官网：www.zcibio.com)

1. 血清：全血样品于室温放置 2 小时或 2-8℃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内毒素试管。
2. 血浆：抗凝剂推荐使用 EDTA 钠盐，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 (0.01 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。
4. 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 1×10^6 个细胞中加入 150-200μL PBS 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。
5. 细胞培养上清或其他生物体液： 1000×g 离心 20 分钟，除去杂质及细胞碎片。取上清检测。

样品注意事项

1. 样品收集后若在 1 周内进行检测的可保存于 2-8℃，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℃(3-6 个月内检测)，避免反复冻融。
2. 试剂盒检测范围不等同于样本的浓度范围，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(建议查阅文献后先做预实验，以确定稀释倍数)。
3. 若所检样本不在说明书所列样本之中，建议做预实验验证其检测有效性。
4. 若使用化学裂解液制备组织匀浆或细胞提取液,由于引入某些化学物质会导致 ELISA 测值出现偏差。
5. 若样本为细胞培养上清，因该类样本干扰因素较多，如：细胞状态、细胞数量、采样时间等，所以可能存在不被检出情况。
6. 某些重组蛋白可能与试剂盒中捕获或检测抗体不匹配而出现不被检出的情况.
7. 不能检测含 NaN3 的样品，因 NaN3 抑制辣根过氧化物酶的（HRP）活性。

试剂准备

1.使用前将试剂盒和标本缓慢均衡至室温(18-25℃) ，样本不能直接在 37℃溶解。

2.标准品 （冻干品）：试剂盒提供了已知浓度的 6 支标准品:

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6
ng/mL	1	2	4	8	16	32

经过大量正常标本检验，标本的正常浓度值均在试剂盒提供的检测范围内，实验过程中直接取 50μL 样本上样即可。当有部分样本值超过最大标准品浓度时，可用样本稀释液将标本进行适当稀释后再进行实验。

3.从试剂盒中取出的浓缩洗涤液可能有结晶，属于正常现象；放置室温，轻摇均匀，待结晶完全溶解后再配置洗涤液。可将 25ml 浓缩洗涤液用蒸馏水或去离子水稀释配置成 500ml 工作浓度的洗涤液，未用完的放回 4℃（48T 配制成 300ml 备用）。

4. 20×洗涤缓冲液的稀释：蒸馏水按 1：20 稀释，即 1 份 20× 洗涤缓冲液加 19 份蒸馏水。

注:标准品使用时要轻轻充分混匀，避免气泡。为保证实验结果的准确请使用微量吸管，并校准微量加液器。请依据所需的量精确吸取。

5.请勿重复使用已用过的标曲、下一次实验需重新定标。

操作步骤

注：根据待测样品数量加上标准品的数量决定所需的板条数。每个标准品和空白孔建议做复孔,每个样品根据自己的数量来定，能使用复孔的尽量做复孔。

第一步：试剂盒室温平衡 30min ，然后从铝箔袋中取出所需板条，剩余板条用自封袋密封放回 4℃。

第二步：设置标准品孔和样本孔，标准品孔各加不同浓度的标准品 50μL。

第三步：样本孔中加入待测样本 50μL；空白孔不加。

第四步：除空白孔外，标准品孔和样本孔中每孔加入辣根过氧化物酶（HRP）标记的检测抗体 100μL，用封板膜封住反应孔，37℃水浴锅或恒温箱温育 60min。

第五步：弃去液体，吸水纸上拍干，每孔加满洗涤液（350μL），静置 1min，甩去洗涤液，吸水纸上拍干，如此重复洗板 5 次（也可用洗板机洗板）。

第六步：每孔加入底物 A、B 各 50μL，37℃避光孵育 15min。

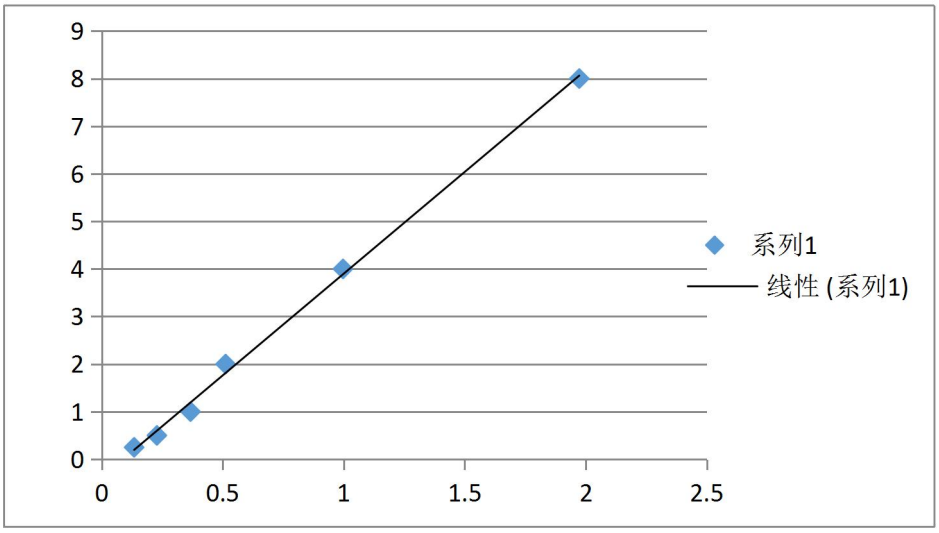
第七步：每孔加入终止液 50μL，15min 内，在 450nm 波长处测定各孔的 O.D 值。

注

1. 准备: 准备一次实验所需要的酶标条，其他的可从微孔板上拆下，密封，按照说明书要求保存，以备下次使用。
2. 加样:实验操作中请使用一次性的吸头，避免交叉污染。加样时注意不要有气泡，将样品加于酶标板底部，尽量不触及孔壁，轻轻晃动混匀，加样或加试剂时，第一个孔与最后一个孔加样之间的时间间隔如果太大，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。因此，一次加样时间（包括标准品及所以样品）最好控制在 10 分钟内。
3. 温育：为防止样品蒸发，实验时请将加上盖或覆膜的酶标板置于湿盒内，以避免液体蒸发，洗板后应尽快进行下一步操作，任何时候都应避免酶标板处于干燥状态，同时应严格遵守给定的温育时间和温度。
4. 洗涤: 充分的洗涤非常重要，在每次洗涤过程中，都要将洗涤液完全甩干。洗涤过程中反应孔中残留的洗涤液应在滤纸上拍干，勿将滤纸直接放入反应孔中吸水，同时要消除板底残留的液体和手指印，避免影响最后的酶标仪读数。如果有自动洗板机，应在熟练使用后再用到正式实验过程中。
5. 反应时间的控制: 加入显色液后请定时观察反应孔的颜色变化，如颜色较深，请提前加入终止液终止反应，避免反应过强从而影响酶标仪光密度读数。
6. 底物：底物请避光保存，在储存和温育时避免强光直接照射。

结果判断

各标准品及样本 O.D.值扣除空白孔 O.D.值后作图（5 点图），如设复孔，则应取其平均值计算。以标准品的浓度为纵坐标（或对数坐标），O.D.值为横坐标（或对数坐标），绘出标准曲线（最佳方程式应依回归方程计算的 R2 值来定，以 R2 值越趋近于 1 为好）。推荐使用专业制作曲线软件进行分析，如 curve expert 1.30，根据样品 O.D.值，由标准曲线查出相应的浓度，再乘以相应稀释倍数(没有稀释不需要乘)，即为样品实际浓度。



精密度

精密度用样品测定值的变异系数 CV 表示。CV（%）=SD/mean×100

批内差：取同批次试剂盒对低、中、高值定值样本进行定量检测，每份样本连续测定 20 次，分别计算不同浓度样本的平均值及 SD 值。

批间差：选取 3 个不同批次的试剂盒分别对低、中、高值定值样本定量测定，每个样本使用同一试剂盒重复测定 8 次，分别计算不同浓度样本的平均值及 SD 值。

批内差: CV<10% Inter-批间差: CV<13%

稳定性

经测定，试剂盒在有效期内按推荐温度保存，其活性降低率小于 5%。

为减小外部因素对试剂盒破坏前后检测值的影响，实验室的环境条件需尽量保持一致，尤其是实验室内温度、湿度及温育条件。其次由同一实验员来进行操作可减少人为误差。

警告

本试剂盒中使用了稀硫酸作为终止液，其具有轻微腐蚀性，使用时应避免接触衣物或眼、手等皮肤暴露部位。

友情提醒

试剂盒使用完毕后，请妥善处理相关耗材，避免环境污染！

说明

1. 由于现有条件及科学技术水平尚不能对所有供货商提供的所有原料进行全面的鉴定与分析，本产品可能存在一定的质量技术风险。
2. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及当时的实验环境密切相关，请务必准备充足的标本备份。
3. 不同批次的同一产品可能会有少许差别，如：检测限、灵敏度以及显色时间等，请依据试剂盒内说明书进行实验操作，网站电子版说明书仅作参考。
4. 只有全部使用本试剂盒配套试剂才能保证检测效果，不能混用其他制造商的产品。只有严格遵守本试剂盒的实验说明才会得到最佳的检测效果。
5. 在储存及温育过程中避免将试剂暴露在强光中。所有试剂瓶盖须盖紧以防止蒸发和微生物的污染，因为蛋白水解酶的干扰将导致出现错误的结果。
6. 请勿提前将酶标板从包装袋里拿出，应在开始试验时取出。
7. 由于操作者的不熟练、操作失误或读数仪程序选用错误等有可能导致错误结果的产生。请使用者使用该产品前仔细阅读说明书，调试好酶标仪，请使用配备有 450±10nm 滤光片的酶标仪，且该酶标仪测量范围在 0.001-3.000 O.D.或以上。
8. 同一使用者在使用同一产品时，如不同时间订购，也可能会因批次的少量差异产生不同的结果，因此建议使用者在每次使用前均进行预实验。
9. 试剂盒在出厂前均经过严格检测，但由于运输条件及各实验室条件差异，可能会造成实验结果与出厂结果不一致或不同批次试剂盒批间差大的情况，对于这种情况会酌情处理。
10. 本试剂盒与其他厂家试剂盒或不同方法检测同一目的的蛋白的产品作对比，平行检测可能会存在检测结果不一致的情况。
11. 本操作说明同样适用于 48T 试剂盒，但 48T 试剂盒所有试剂减半。

关于订购详情或技术支持，欢迎来电、来函、传真或电邮

中国丨上海茁彩生物科技有限公司