(仅供科研使用，不得用于临床诊断!)

人非磷酸化丙酮酸脱氢酶(NpPDH)ELISA 试剂盒

使用说明书

产品货号：BY-EH115659

规格：48T/96T

检测范围：7.5 ng/mL– 240 ng/mL。

灵敏度：最低检出剂量小于 1.0 ng/mL。

精密度：批内变异系数 CV%小于 10%；批间变异系数 CV%小于 15%。

回收率：回收率在 85%-115%之间。

特异性：本试剂盒识别天然和重组人非磷酸化丙酮酸脱氢酶(NpPDH)，与结构类似物无交叉。

稳定性：2℃-8℃保存，有效期 6 个月。

用途：用于检测血清、血浆、细胞培养上清液和组织等样本中人非磷酸化丙酮酸脱氢酶(NpPDH)的浓度。

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

官方热线：025-5229-8998

销售部电话：13914481711

技术电话：15950492658

公司网址：www.byabscience.cn

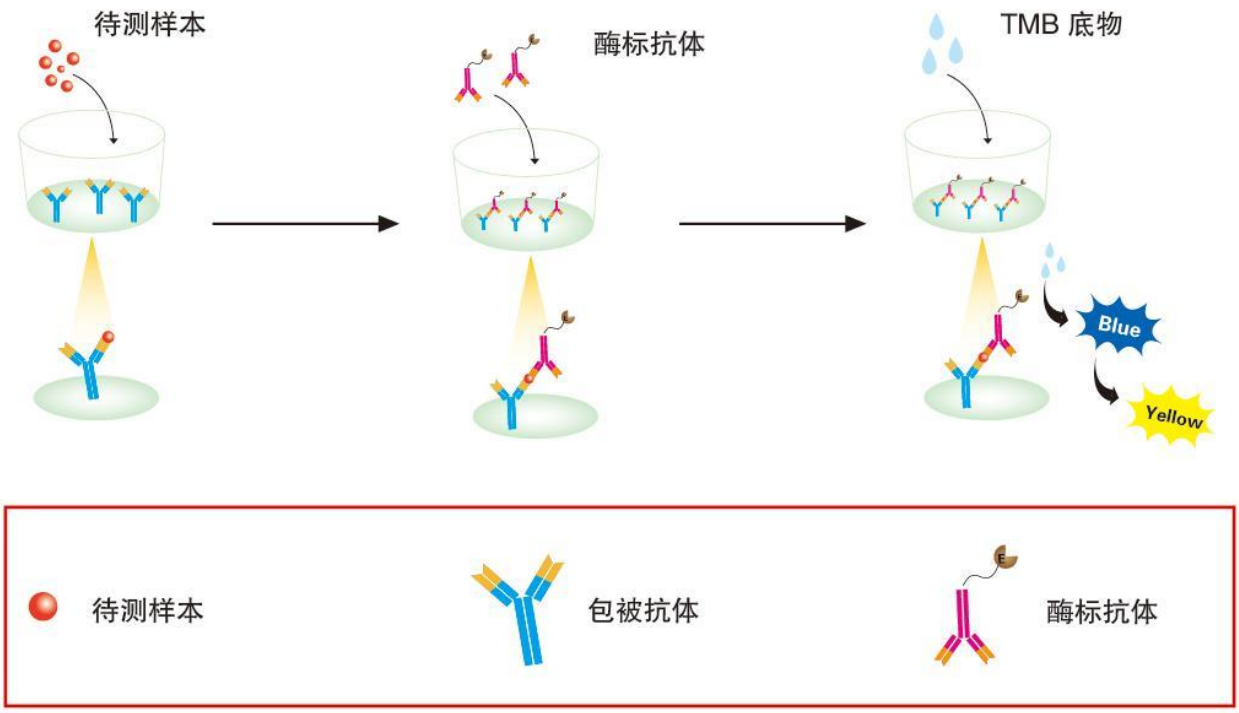
具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品货号、生产日期（见盒签），以便我们更高效为您服务。

实验原理

本试剂盒采用双抗体夹心酶联免疫吸附试验（ELISA）。在预包被抗人非磷酸化丙酮酸脱氢酶(NpPDH) 抗体（固相抗体）的微孔酶标板中，加入人非磷酸化丙酮酸脱氢酶(NpPDH) 校准品和待测样本，再加入 HRP 标记的抗人非磷酸化丙酮酸脱氢酶(NpPDH) 抗体（酶标抗体），经过温育与充分洗涤，去除未结合的组分，在微孔板固相表面形成固相抗体-抗原-酶标抗体的夹心复合物。加底物 A 和 B，底物在 HRP 催化下，产生蓝色产物，在终止液（酸性溶液）作用下，最终转化为黄色。在酶标仪 450nm 波长上测定吸光度（OD 值），吸光度（OD 值）与待测样品中人非磷酸化丙酮酸脱氢酶(NpPDH) 的浓度正相关。拟合校准品曲线，可以计算出样本中人非磷酸化丙酮酸脱氢酶(NpPDH) 的浓度。

实验原理图



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	48 孔配置	96 孔配置	开封后储存
预包被酶标板	48T	96T	**2-8℃14 天**
标准品	0.3mL*6 管	0.3mL*6 管	**2-8℃14 天**
样本稀释液	3 ml	6 ml	2-8℃180 天
HRP 标记抗体	5 ml	10 ml	**2-8℃14 天**
显色底物 A	3 ml	6 ml	2-8℃180 天
显色底物 B	3 ml	6 ml	2-8℃180 天
终止液	3 ml	6 ml	2-8℃180 天
20×洗液	15 ml	25 ml	2-8℃180 天
封板膜	2 张	2 张	
说明书	1 份	1 份	
自封袋	1 个	1 个	

校准品浓度依次为：240 、120 、60 、30 、15 、7.5 ng/mL。

注意：

1：使用前请检查试剂盒中试剂的标签和数量与表格是否一致。

2：如果试剂盒的组份需要再次使用，请确保上一次使用之后没有被污染。

3：酶标板单次未使用完，要谨记密封放到 2-8℃保存。

试验所需自备试验器材（不提供，但可协助购买）

1）能够检测 450 nm 吸光度的酶标仪

2）移液器及枪头、加样槽

3）37℃恒温箱或水浴锅

4）准备试剂用的试管、离心管、量筒等

5）蒸馏水或去离子水

6）涡旋振荡器、微孔板振荡器

注意事项

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，使用试剂盒配套的样品稀释液。

4）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。

5）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。

6）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。

7）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。

8）严格按照规定的时间和温度进行温育以保证准确结果。所有试剂都必须在使用前达到室温 20-25℃。使用后立即冷藏保存试剂。

9）洗板不正确可以导致不准确的结果。在加入底物前确保尽量吸干孔内液体。温育过程中不要让微孔干燥掉。

10）消除板底残留的液体和手指印，否则影响 OD 值。

11）底物显色液应呈无色或很浅的颜色。

12）避免试剂和标本的交叉污染以免造成错误结果。

13）在储存和温育时避免强光直接照射。

14）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。建议使用时提前 15 分钟预热。

15）试验中所用的 EP 管和吸头均为一次性使用，严禁混用。

样品的准备和保存

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。样品如果不立即分析，应分装后冷冻保存，且避免反复冻融。

细胞培养上清——离心去除沉淀，立即分析或分装后-20℃冷冻保存。

血清——用干净试管收集血液，室温凝固 30 分钟，离心 2000×g 20 分钟，收集血清。立即分析或分装后-20℃冷冻保存。

血浆——采用肝素、柠檬酸盐或 EDTA 抗凝，抽血后 30 分钟内在 2-8℃离心 2000×g 20 分钟。为消除血小板的影响，建议在 2-8℃进一步离心 10000×g 10 分钟。立即分析或分装后-20℃冷冻保存。

细胞裂解液——对于贴壁细胞，去除培养液，用 PBS、生理盐水或无血清培养液洗一遍。加入适量裂解液，用枪吹打数下，使裂解液和细胞充分接触。通常 10 秒后，细胞就会被裂解。对于悬浮细胞，离心收集细胞，用 PBS、生理盐水或无血清培养液洗一遍。加入适量裂解液，用枪吹打把细胞吹散，用手指轻弹以充分裂解细胞。充分裂解后，10000—14000×g 离心 3-5 分钟， 取上清。立即分析或分装后-20℃冷冻保存。

组织匀浆——用预冷的 PBS (0.01M, pH=7.4)冲洗组织，去除残留血液（匀浆中裂解的红细胞会影响测量结果），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 9mL 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，于冰上充分研磨。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。最后将匀浆液于 5000×g 离心 5~10 分钟，取上清检测。

尿液——用无菌管收集，离心 2000×g 20 分钟。仔细收集上清。如有沉淀形成，应再次离心。

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。

3、设置标准品孔、0 值孔、空白孔和样本孔，标准品孔各加不同浓度的标准品 50μL，0 值孔加样本稀释液 50μL，空白孔不加，样本孔加待测样本 50μL。

4、除空白孔外，标准品孔、0 值孔和样本孔，加入辣根过氧化物酶（HRP）标记的检测抗体 100 μL。

5、用封板膜盖住反应板，37℃水浴锅或恒温箱避光孵育 60min。

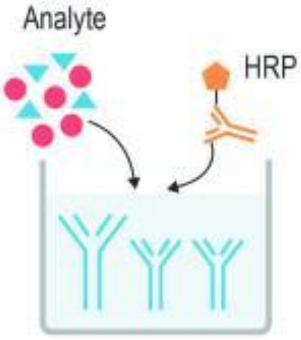
6、揭开封板膜，弃去液体，吸水纸上拍干，每孔加满洗涤液，静置 20S，甩去洗涤液，吸水纸上拍干，如此重复 5 次。若使用自动洗板机，请按洗板机操作程序进行洗板，添加浸泡 30s 的程序，可以提高检测的精度。洗板结束，加底物前，要在干净不掉屑的纸上，充分拍干反应板。

（提示：为获得理想的实验结果，必须彻底移除残留液体。洗板完成之后，请立即进行下步操作，不要让微孔板干燥。）

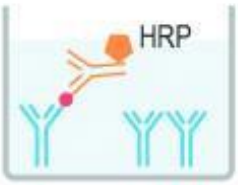
7、将底物 A 和 B 按 1:1 体积充分混合，所有孔中加入底物混合液 100μL。用封板膜盖住反应板，37℃水浴锅或恒温箱避光孵育 15min。

8、所有孔加入终止液 50μL，在 450nm 波长酶标仪上读取各孔吸光度（OD 值）。

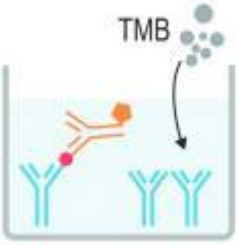
[操作流程图]



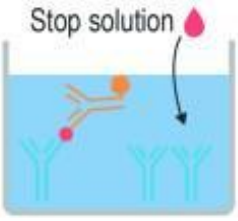
1. 对应板孔中加入50μL标准品工作液或样本后，立即每孔加入100ulHRP酶标抗体工作液，37°C孵育60分钟



2. 弃掉板内液体，洗板5次



3. 每孔加入底物A溶液50ul，底物B溶液50ul



4. 每孔加入50μL终止液

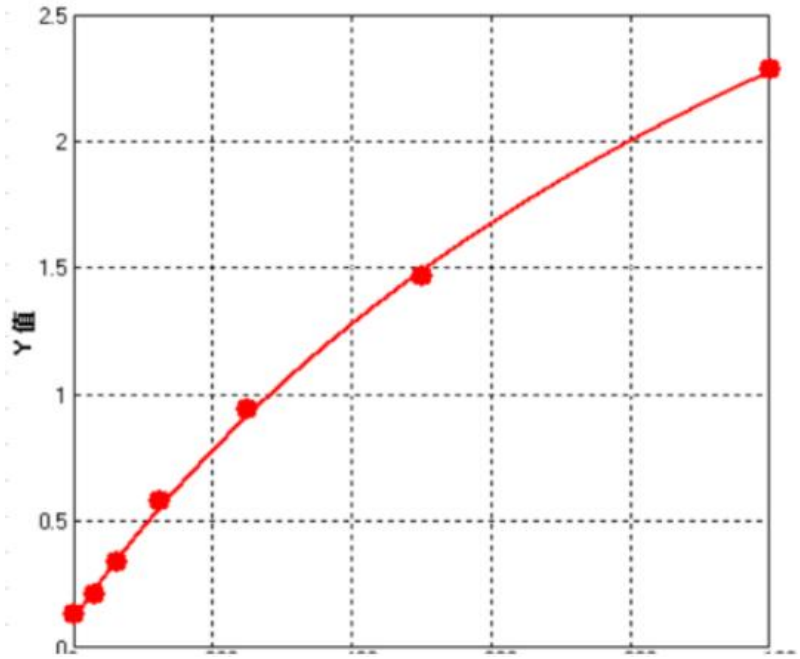
5. 立即在450nm波长下读数，处理数据

结果计算

9、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-pl），创建标准曲线方程，通过样本的吸光度（OD 值），利用方程计算样品的浓度值。【用 ELISA Calc 软件计算，标曲建议使用四参数拟合，但不是唯一拟合方式】

10、如果样品被稀释，通过上述方法测的的浓度值，要乘以稀释倍数，才是样品的最终浓度。

注意：实验者需根据自己的实验建立标准曲线。每次检测，每块酶标板都必须设立标准曲线。以下曲线仅供参考！



（标曲示意图，仅供参考）

[问题分析]

若实验效果不好，请及时对显色结果拍照，保存实验数据，保留所用板条及

未使用试剂，然后联系我公司技术支持为您解决问题。同时您也可以参考以下资料：

[问题解答]

问题描述	可能原因	相应对策相应对策
标准曲线梯度差	吸液或加液不准	检查移液器及吸头
	平衡时间太短	保证充足的平衡时间
	洗涤不完全	保证洗涤时间和洗涤次数及每孔的加液量
显色很弱或无色	孵育时间太短	保证充足的孵育时间
	实验温度不正确	使用推荐的实验温度
	试剂体积不够或漏加	检查吸液及加液过程，保证所有试剂按顺序足量添加
	稀释不正确	
	酶标记物失活或底物失效	混合酶结合物和底物，通过迅速显色来检查判断
读数数值低	酶标仪设置不正确	在酶标仪上检查波长及滤光片设置
		提前打开酶标仪预热
变异系数大	加液不正确	检查加液情况
背景值高	检测抗体的工作浓度过高	使用推荐的稀释倍数
	酶标板洗涤不完全	保证每步清洗完全；如果用自动洗板机，请检查所有的出口是否有堵塞；是否使用试剂盒配备的洗涤液
	洗液有污染	配制新鲜的洗液
灵敏度低	ELISA 试剂盒保存不当	按说明书要求保存相关试剂
	读数前未终止	OD 读数前应在每孔中加入终止液

声明

1. 限于现有条件及科学技术水平，尚不能对所有原料进行全面的鉴定分析，本产品可能存在一定的质量技术风险。

2. 本试剂盒在研发过程中去除/降低了生物学样本中的一些内源性干扰因素，并非所有可能影响的因素均已去除。

3. 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等因素密切相关，本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，请使用者使用前充分考虑到样本可能的使用量，预留充足的样本。

4. 为了达到好的实验结果，请只使用本公司试剂盒内提供的试剂，不要混用其他制造商的产品，严格按照说明书操作。

5. 由于操作过程中试剂制备以及酶标仪参数设置不正确，可能导致结果异常，实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器。

6. 即使是相同人员操作也可能在两次独立实验中得到不同的结果，为保证结果的重现性，需要控制实验过程中每一步的操作。

7. 试剂盒发货前会经过严格的质检，然而，因为运输条件、实验设备差异等等因素影响，用户检测结果可能跟出厂数据不一致。

8. 本试剂盒未与其他厂家同类试剂盒或不同方法检测同一目的物的产品进行对比，所以不排除检测结果不一致的情况。

9. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。