

# Human Legumain (total) ELISA Kit

## 检测原理:

攸碧艾 (YOBIBIO) 的 ELISA 试剂盒采用“夹心法”:将捕获抗体包被于酶标板上, 捕获样品及标准品中的靶蛋白, 生物素化的检测抗体与靶蛋白结合, SABC 复合物与生物素化检测抗体结合, 形成免疫复合物, 加入 TMB 显色液后, 若反应孔中有靶蛋白则显蓝色, 加入终止液变黄色, 检测过程中游离的成分均被洗去, 用酶标仪在 450 nm 处测 OD 值, 靶蛋白浓度与 OD 值之间呈正比, 通过绘制标准曲线计算出标本中靶蛋白的浓度。

## 试剂盒组分: (保存温度 4°C)

名称	规格 (48 T)	规格 (96 T)
预包被酶标板	8×6 条	8×12 条
标准品	1 支	1 支
标准品/样品稀释液	10ml	15ml
生物素化检测抗体 (100×)	1 支	1 支
生物素化检测抗体稀释液	6ml	12ml
SABC 复合物	6ml	12ml
TMB 显色液 (A/B)	各 3ml	各 6ml
终止液	6ml	12ml
20×浓缩洗涤液	30ml	60ml
封板胶纸	2 张	4 张
产品说明书	1 份	1 份

本试剂盒适用于血清、血浆、组织匀浆、细胞培养上清及其它生物体液。

## 标本收集与试剂准备:

- 血清、血浆样本收集应使用一次性的无热原, 无内毒素试管 (EDTA、柠檬酸盐、肝素抗凝均可), 血清、血浆避免使用溶血, 高血脂标本, 标本悬浮物应离心去除, 使标本清澈透明。待测样本应尽早检测, 2-8°C 保存 48 小时; 更长时间须冷冻 (-20°C 或 -80°C) 保存, 避免反复冻融。
- 洗涤液配置: 用蒸馏水 1:20 稀释 (例: 1ml 浓缩洗涤液加入 19ml 的蒸馏水)
- 标准品配制: 取 8 个 1.5ml 离心管, 分别标注 S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, blank, 第一管 S1 中加入标准品/样品稀释液 900ul, 第二至第八管中分别加入标准品/样品稀释液 200ul, 在第一管中加入 (20000pg/ml) 标准品溶液 100ul 置于漩涡混合器上混匀后用加样器吸出 200ul, 移至第二管, 如此反复作对倍稀释, 从第七管中吸出 200ul 弃去, 第八管为空白对照。标准曲线浓度为: 2000、1000、500、250、125、62.5、31.25、0 pg/ml (标准品的用量及标准曲线范围也可根据自己需要配置)。



4. 生物素化抗体工作液配置:使用前 20 分钟, 用生物素化抗体稀释液将 **100×**生物素化抗体稀释成 **1×**工作液, 根据所需用量配置, 当日使用, 剩余弃之。
5. TMB 显色液的配置: 使用前 10 分钟, 将 TMB 显色液 A 液和 B 液 1: 1 混合, 避光放置备用。
6. 如果您检测的样本中靶蛋白浓度高于标准品最高值, 建议重新检测, 请根据实际情况, 适当倍数稀释(建议做预实验, 以确定稀释倍数)。

### 检测程序:

1. 加样: 空白孔加入 50  $\mu$ l 标准品/样品稀释液, 其余孔各加入标准品或待测样品 50 $\mu$ l, 将反应板混匀后置 37°C, 40 分钟。
2. 洗板: 用 **1×**洗涤液将反应板充分洗涤 4-6 次, 每孔加入 **1×**洗液 350  $\mu$ l, 每次震荡/浸泡 1-2 分钟, 向滤纸上印干。
3. 空白孔加入 100 $\mu$ l 生物素化抗体稀释液, 其余孔各加入 **1×**的生物素化抗体工作液 100 $\mu$ l, 混匀后置 37°C, 30 分钟。
4. 洗板: 同上。
5. 每孔加入 SABC 复合物工作液 100 $\mu$ l, 混匀后置 37°C, 20 分钟。
6. 洗板: 同上。
7. 每孔加入提前配置好的 TMB 混合液 100 $\mu$ l, 混匀后置 37°C 暗处反应 10-20 分钟(具体显色时间根据显色结果而定)。
8. 每孔加入 100 $\mu$ l 终止液, 混匀, 30 分钟内用酶标仪在 450nm 处测吸光值。

### 结果判断与计算:

1. 所有 OD 值建议减除空白孔值后再进行计算, 如空白孔 OD 低于 0.1, 也可以直接计算。
2. 以标准品浓度作横坐标, OD 值作纵坐标, 手工绘制或用软件绘制标准曲线, 根据样品 OD 值计算出相应含量, 再乘以稀释倍数即可。

### 试剂盒性能:

1. 灵敏度: 可测浓度小于 6.25pg/ml。
2. 特异性: 同时可检测重组或天然的人 Legumain (total), 不与人其它细胞因子有交叉反应。
3. 重复性: 板内, 板间变异系数均小于 10%。

### 注意事项

1. 在试验中标准品和样本检测时建议作双孔检测, 每次检测都应做标准曲线。
2. 洗涤过程很关键, 洗涤不充分将导致精确度误差及 OD 值错误地升高, 从冰箱中取出的浓缩洗涤液可能有结晶, 属于正常现象, 37°C 水浴使结晶完全溶解后再配制洗涤液。
3. 检测时所有试剂都要恢复到室温, 板条开封后剩余板条需封好, 放回袋中 1 个月内用完。
4. 试剂盒使用超敏 TMB 溶液, 显色过深时会出现沉淀状, 属正常现象, 混匀即可, 不影响结果判读。
5. 说明书以试剂盒内纸质版为准, 本试剂盒仅用于科研, 不能用于临床诊断!