

## Human P-AKT1 Elisa Kit

### 检测原理:

攸碧艾的 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	12ml	12ml
生物素化检测抗体 (100×)	60ul	120ul
生物素化检测抗体稀释液	6ml	12ml
SABC (100×)	60ul	120ul
SABC 稀释液	6ml	12ml
TMB 显色液 (A/B)	各 3ml	各 6ml
终止液	3ml	6ml
30×浓缩洗涤液	30ml	30ml
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 1:30 稀释 (例:1ml 浓缩洗涤液加入 29ml 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,在第一管中加入标准品溶液 (50000.0pg/ml) 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至 S7,第八管为空白对照。配置好的标准曲线浓度为:5000.0、2500.0、1250.0、625.0、312.5、156.25、78.0、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 **100x**生物素化抗体稀释成 **1x**工作液,根据所需用量配置,当日使用,剩余弃之。
5. SABC 工作液配置:使用前 20 分钟,用 SABC 稀释液将 **100x**SABC 稀释成 **1x**工作液,根据所需用量配置,当日使用,剩余弃之。
6. 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。
7. 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 $^{\circ}$ C, 50 分钟。
2. 洗板:用 **1x**洗涤液将反应板充分洗涤 3 次,每孔加入 **1x**洗液 300  $\mu$ 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 **1x**的生物素化抗体工作液 100 $\mu$ l,混匀后置 37 $^{\circ}$ C, 50 分钟。
4. 洗板:同上。
5. 每孔加入 SABC 工作液 100 $\mu$ l,混匀后置 37 $^{\circ}$ C, 30 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 $^{\circ}$ 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 50 $\mu$ 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 22.5pg/ml。
2. 特异性:不与其他蛋白、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 $^{\circ}$ 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!