

(本试剂盒仅作体外科研使用，不可用于临床诊断。)

Mouse CD8 Elisa Kit

货号：U96-2634E

小鼠 CD8 分子(CD8)酶联免疫吸附测定试剂盒使用说明书

产品保质期及产品批号见试剂盒外包装标签。

使用前请仔细阅读此说明书，如果有任何问题请及时联系我们！

电话：400-681-8582

QQ：1296725867

邮箱：service@scigebio.com

网址：www.yobibio.com

产品名称: **Mouse CD8 Elisa Kit**

产品中文名: 小鼠 CD8 分子(CD8)酶联免疫吸附测定试剂盒

产品货号: U96-2634E

规格: 48T/96T

种属: 小鼠

检测范围: **0.156—10ng/ml**

灵敏度: **<0.031ng/ml**

特异性: 检测小鼠 **CD8**, 且和其它类似物无明显交叉反应。

精密度: 板内变异系数均<9%, 板间变异系数均<10%。

保存温度: 4°C

有效期: 6 个月

用途: 用于体外定量检测小鼠血清、血浆或其他相关生物液体中 **CD8** 的浓度。

标准曲线对应浓度 (ng/ml) :

S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	Blank
10.0	5.0	2.5	1.25	0.62	0.31	0.156	0

检测原理:

本试剂盒采用双抗体夹心 ELISA 法。试剂盒提供的酶标板已包被捕获抗体，实验时将待检样品(或标准品)加入酶标板反应孔中，捕获抗体结合目的蛋白。加入生物素标记检测抗体与目的蛋白结合，再加入 SABC 与标记抗体结合，形成捕获抗体-目的蛋白-检测抗体-SABC 免疫复合物，游离成分均被洗去。加入显色底物(TMB)，TMB 在辣根过氧化物酶的催化下呈现蓝色，加终止液后变成黄色。用酶标仪在 450nm 波长处检测吸光度(OD)，目的蛋白浓度与 OD450 值之间呈正相关，通过绘制标准曲线计算出样品中目的蛋白的浓度。

试剂盒组分 (4°C 保存) :

内容物	规格	
	48T	96T
酶标板	8 孔×6 条	8 孔×12 条
标准品(S)	1 支	1 支
标准品/样本稀释液	12ml	12ml
生物素标记检测抗体(100×)	60 μ l	120 μ l
生物素标记检测抗体稀释液	6ml	12ml
SABC(100×)	60 μ l	120 μ l
SABC 稀释液	6ml	12ml
TMB 显色液(A/B)	6ml	12ml
终止液	3ml	6ml
30×洗涤缓冲液	30ml	30ml
封板膜	2 张	4 张
产品说明书	1 份	1 份

注意: 使用前请检查试剂盒的标签和数量与表格是否一致。所有试剂瓶盖须旋紧以防止蒸发和微生物的污染。试剂体积以实际发货版说明书为准。相关试剂在分装时会比标签上标明的体积稍多一些, 请在使用时量取使用而非直接倒出使用。

保存温度及有效期:

- 1、未拆封的试剂盒 4°C 保存, 6 个月内有效。
- 2、拆封后的试剂盒, 将未使用的酶标条用密封袋装好, 4°C 保存, 1 个月内有效。

需要自备的物品:

- 1、酶标仪 (含有 450nm 滤光片), 使用前请提前预热酶标仪。
- 2、系列高精度移液器及一次性吸头, 检测样品较多时, 建议使用多通道移液器。
- 3、37°C 恒温箱。
- 4、干净的 1.5ml 离心管。
- 5、蒸馏水或去离子水。
- 6、吸水纸。

样品的收集和保存：

- 1、血清：全血样品于室温放置 2 小时或 4°C 过夜，然后 4°C，1,000×g 离心 15 分钟，取上清即可检测。或将上清置于≤-20°C 冷冻保存，避免反复冻融。
- 2、血浆：用 EDTA 或肝素钠抗凝管采集全血样品，采集后 30 分钟内置于 4°C 冰箱，1,000×g 离心 15 分钟，取上清即可检测。或取上清置于≤-20°C 冷冻保存，避免反复冻融。
- 3、组织匀浆：用预冷的 PBS (0.01mol/L, pH=7.4) 清洗组织，去除残留血液，冰上切割组织后称重。按组织重量(g): PBS 体积(ml)=1:9 的比例，加入 9 倍体积的 PBS(比如 1g 的组织样品加入 9ml 的 PBS，具体体积可根据实验需要适当调整，并做好记录)，加入玻璃匀浆器中，在冰上充分研磨。可以对匀浆液进行反复冻融或超声破碎以充分匀浆。最后将匀浆液于 4°C，3000×g 离心 15 分钟，取上清即可检测（如需要可取部分上清进行 BCA 蛋白定量）。或取上清置于≤-20°C 冷冻保存，避免反复冻融。
- 4、细胞裂解液：贴壁细胞用预冷的 PBS 轻轻清洗，胰蛋白酶消化，1,000×g 离心 5 分钟后收集细胞；悬浮细胞可直接离心收集。收集到的细胞用预冷的 PBS 洗涤 3 次。PBS 稀释细胞悬液，细胞浓度达到 10^6 个/ml 左右。通过反复冻融或超声破碎使细胞裂解。4°C，3,000×g 离心 15 分钟，取上清即可检测。或取上清置于≤-20°C 冷冻保存，避免反复冻融。
- 5、细胞培养上清或其他生物体液：收集液体后于 4°C，3000×g 离心 15 分钟，取上清即可检测。

样本处理相关试剂推荐：PBS 缓冲液（货号：U21-259B），0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化液（货号：U31-323C），0.25% 胰蛋白酶消化液（货号：U31-324C）。

注意事项：

- 1、本试剂盒仅供体外科研使用，不可用于临床诊断。
- 2、实验员请穿着实验服并佩戴一次性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，请严格按照国家生物试验室安全防护条例执行。
- 3、刚开启的酶标板孔中可能会有少许液体，此为正常现象，不会对实验结果造成任何影响。拆封后未使用的酶标条用密封袋装好，4°C条件下可保存一个月。
- 4、请勿重复使用已稀释过的标准品、生物素标记检测抗体、SABC。
- 5、酶标仪需要安装检测 450nm 波长的滤光片，建议使用酶标仪前 15 分钟预热。
- 6、请勿使用其他批号或其他来源的试剂混合或替代本试剂盒中的试剂。
- 7、试验中所用的离心管和吸头均为一次性使用，严禁混用。
- 8、请勿使用过期的试剂。
- 9、收集血液的试管应为一次性无内毒素试管。避免使用溶血，高血脂样品。
- 10、样品收集后若在 1 周内进行检测可保存于 4°C，若不能及时检测，应按一次使用量分装，冻存于 -20°C（1 个月内检测），或-80°C（3 个月内检测），避免反复冻融。在检测前，冷冻的样本应在室温缓慢融化后离心去除冻融过程产生的沉淀物。室温轻柔混匀后使用。
- 11、本试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
- 12、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。
- 13、若使用化学裂解液制备组织匀浆或细胞裂解液，由于引入某些化学物质可能会导致 ELISA 检测结果出现偏差。
- 14、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能检测的情况。
- 15、使用前 TMB 显色液应为无色透明溶液，如果发现颜色异常，请及时与我们联系。
- 16、初次使用试剂盒时，应将各种试剂管离心数分钟，以便试剂集中到管底。
- 17、实验过程中要严格避免酶标板干燥。
- 18、覆盖和揭开封板膜时应小心操作，避免液体溅出。

样本稀释原则：

请提前预估样品中目的蛋白的含量，以此决定是否对样品进行适当稀释检测，以便使样品中目的蛋白浓度处于本试剂盒的最佳检测范围内。

参考稀释方案如下：

- 1、待测样品目的蛋白含量超低：浓缩后检测。
- 2、待测样品目的蛋白含量低：直接原液检测。
- 3、待测样品目的蛋白含量中：稀释后检测。一般按 1:10 稀释，270 μ l 稀释液加 30 μ l 样品。
- 4、待测样品目的蛋白含量高：稀释后检测。一般按 1:100 稀释，297 μ l 稀释液加 3 μ l 样品。
- 5、待测样品目的蛋白含量超高：稀释后检测。一般按 1:1,000-1:10,000。

样品 1000 倍稀释：分两步稀释。取 5 μ l 样品转移至 95 μ l 稀释液内，记作 A 液，此为 20 倍稀释；再取 A 液 5 μ l 转移至 245 μ l 稀释液内，此为 50 倍稀释，总共稀释 1,000 倍。

样品 10,000 倍稀释：分三步稀释。取 5 μ l 样品转移至 195 μ l 稀释液内，记作 A 液，此为 40 倍稀释；再取 A 液 5 μ l 转移至 245 μ l 稀释液内，记作 B 液，此为 50 倍稀释；最后取 B 液 60 μ l 转移至 240 μ l 稀释液内，此为 5 倍稀释，总共稀释 1,000 倍。

每步稀释时取液量不少于 3 μ l，稀释倍数不超过 100 倍。每步稀释都需混合均匀，避免产生气泡。

血清、血浆、灌洗液、尿液、胸水、唾液等体液建议原液检测（个别指标除外），以上方案仅作参考，最好做预实验以确定稀释倍数，并详细记录。

洗板方法：

手工洗板：

吸去（不可触及板壁）或甩掉酶标板内的液体，在实验台上铺垫几层吸水纸，酶标板朝下用力拍打几次，每孔加入 1×洗涤缓冲液 300 μ l，浸泡 1-2 分钟，重复此过程数次。

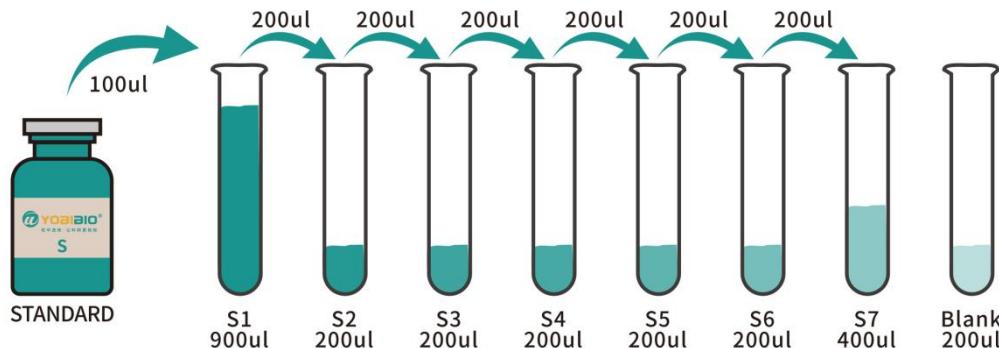
自动洗板：

- 1、洗板前，应检查洗液瓶、蒸馏水瓶是否充足，废液瓶是否满瓶。
- 2、在自检过程中，注意观察洗液灌注是否通畅，排液是否通畅。
- 3、在洗板过程中，应注意观察每个反应孔是否灌满且无外溢，每孔吸水是否吸尽，并且要保证洗液在孔内放置的时间。

检测前准备工作：

- 1、实验前 30 分钟将所有试剂和样品平衡至室温（不能加热使其融解）。如果试剂盒需分多次使用，请仅取出本次实验所需的酶标条和试剂，剩余酶标条和试剂需按照要求保存好。已经倒出的试剂请勿倒回瓶中，避免瓶中试剂污染，试剂配制或样品稀释时，切记要混合均匀。
- 2、每次检测都应该做标准曲线，实验员应该预估样品中目的蛋白的含量，以此决定是否对样品进行适当稀释检测，以便使样品中目的蛋白浓度处于本试剂盒的最佳检测范围内。
- 3、当样品需要稀释时，如果标准品/样品稀释液不够用，可以用 1×PBST 替代，请提前准备好 1×PBST。
- 4、配制洗涤液 (1×): 用蒸馏水或者去离子水 1:30 稀释 30×缓冲洗涤液 (1ml 缓冲洗涤液加入 29ml 的蒸馏水或去离子水)，当稀释液或洗涤液不够用，可以用 1×PBST 替代。提示：从冰箱中取出的 30×缓冲洗涤液可能有结晶析出，属于正常现象，请先温育至室温，轻轻混匀至结晶完全溶解再进行洗涤液配制操作。配置好的洗涤液 (1×) 仅作一次性使用，当日使用完毕。
- 5、配制检测抗体工作液：实验前计算当次实验所需用量（以 100μl/孔计算），实际配制时应多配制 100-200μl。使用前 15 分钟，将生物素标记检测抗体 (100×) 于 800×g 离心 1 分钟，用生物素标记检测抗体稀释液将生物素标记检测抗体 (100×) 稀释成 1×检测抗体工作液（比如：10μl 100×检测抗体 +990μl 抗体稀释液）。现配现用。
- 6、配制 SABC 工作液：实验前计算当次实验所需用量（以 100μl/孔计算），实际配制时应多配制 100-200μl。使用前 15 分钟，将 SABC 于 800×g 离心 1 分钟，用 SABC 稀释液将 SABC (100×) 稀释成 1×SABC 工作液（比如：10μl 100×SABC+990μl SABC 稀释液）。现配现用。
- 7、配制 TMB 显色液：实验前计算当次实验所需用量（以 100μl/孔计算），实际配制时应多配制 100-200μl。使用前 5 分钟，将 TMB 显色液 A 液和 B 液 1:1 混合均匀，避光放置备用，在储存和显色时均避免强光照射。

标准品工作液：取 8 个 1.5ml 离心管，分别标记 S1、S2、S3、S4、S5、S6、S7、Blank。第一管 S1 中加入标准品/样品稀释液 900μl，第二至第八管中分别加入标准品/样品稀释液 200μl。在第一管 S1 中加入标准品 (S) 溶液 100μl，置于漩涡混合器上混匀后吸出 200μl，移至第二管，如此反复作对倍稀释至第七管 (S7)，第八管为空白对照。（标准品的用量及标准曲线范围也可根据自己需要配制）



提示:

- 1、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间隔如果太大, 将会导致不同的“孵育”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(包括标准品及所有样品)最好控制在 10 分钟内。
- 2、孵育: 为防止样品蒸发, 实验时请将封板膜封好, 以避免液体蒸发, 洗板后应尽快进行下步操作, 任何时候都应避免酶标板处于干燥状态, 同时应严格遵守孵育时间和温度。
- 3、洗涤: 充分的洗涤非常重要, 在每次洗过程中, 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。
- 4、显色时间的控制: 说明书中显色时间供参考, 因用户实验室条件差异, 最佳显色时间会有所不同, 加入底物后请定时观察反应孔的颜色变化(比如每隔 5 分钟观察一次), 如颜色较深, 请提前终止反应。当标准曲线有明显梯度且 S7 孔肉眼可见淡淡的蓝色时便可终止反应, 避免反应过强从而影响酶标仪光密度读数。

本试剂盒中使用了酸作为终止液, 具有腐蚀性, 使用时应避免接触衣物或眼、手等皮肤暴露部位。

检测流程:

- 1、加样: 空白孔加入 50 μ l 标准品/样品稀释液, 其余孔各对应加入标准品或待测样品 50 μ l 将酶标板用封板膜封好, 轻轻混匀后置 37°C, 孵育 50 分钟。
- 2、洗板: 用洗涤液 (1 \times) 将酶标板充分洗涤 3 次, 每孔加入洗涤液 300 μ l, 每次浸泡/震荡 1-2 分钟, 倒掉或者吸去后在吸水纸上拍干。

3、孵育抗体：空白孔中加入 100 μ l 的抗体稀释液，其余孔中各加入检测抗体工作液 100 μ l，将酶标板用封板膜封好，轻轻混匀后静置于 37°C，孵育 50 分钟。

4、洗板：同步骤 2。

5、孵育 SABC：空白孔中加入 100 μ l 的 SABC 稀释液，其余孔中各加入 SABC 工作液 100 μ l，将酶标板用封板膜封好，轻轻混匀后静置于 37°C，孵育 30 分钟。

6、洗板：同步骤 2。

7、显色：每孔加入提前配制好的 TMB 混合液 100 μ l，将酶标板用封板膜封好，轻轻混匀后静置于 37°C，暗处反应 8-20 分钟，反应结果为蓝色。

8、终止反应：每孔加入 50 μ l 终止液，轻轻混匀，此时蓝色转为黄色，20 分钟内用酶标仪在 450nm 处检测 OD 值。

结果判断与计算：

1、空白孔设为对照孔，所有的标准品和样品的 OD 值减去空白孔的 OD 值后，得到的数据可以直接在坐标纸上画出曲线，如空白孔吸光值(OD)值低于 0.1 时，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。

3、如 S1 检测 OD 值超出酶标仪检测范围时，可以舍弃其值进行统计分析，不影响实验结果。

回收率：

分别于血清及血浆样本中加入已知蛋白，重复测定并计算其均值，回收率为测定值与理论值的比率，通过测试均在回收范围内。

样本类型	回收率范围(%)
血清	88-96
EDTA 抗凝血浆	87-96
肝素钠抗凝血浆	83-95

线性范围：

在血清及血浆样本中加入一定量的目的蛋白，并倍比稀释待测样本，线性范围即为稀释后样本中目的蛋白含量的测定值与理论值的比率。

精密度：

精密度用样品测定值的变异系数 CV 表示。 $CV(\%) = SD/\text{mean} \times 100$ 。SD 值是标准差(Standard Deviation)，是离均差平方的算术平均数的算术平方根，用 σ 表示，标准差也被称为标准偏差，或者实验标准差。

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，批内差： $CV < 9\%$ 。

批间差：

选取 3 个不同批次的试剂盒分别对低、中、高值定值样本进行定量测定，每个样本使用同试剂盒重复测定 8 次，分别计算不同浓度样本的平均值及 SD 值，批间差： $CV < 10\%$ 。

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、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。

声明：

1、本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用该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的可能使用量，预留充足的样本。最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境密切相关。

2、由于现有条件及科学技术水平尚不能对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，如实验失败，使用者自己承担风险，公司不承担试剂盒以外的任何实验失败损失。

3、若所检样本不包含在说明书所列样本之中，建议进行预实验，验证其有效性，并注意留存样本。

4、使用化学裂解液制备的组织匀浆或细胞提取液可能会由于某些化学物质的引入导致 ELISA 实验结果偏差。

5、细胞培养上清样品，因该类样本干扰因素较多，包括细胞状态、细胞活力、细胞数量，以及采样时间等因素，所以可能存在检测不出的情况。



6、某些天然蛋白或重组蛋白，包括原核及真核重组蛋白，可能因为与本产品所使用的检测抗体及捕获抗体不匹配，而不被检测出。

7、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为准，网站电子版说明书仅作参考。

8、只有全部使用试剂盒中的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结果。

9、在储存运输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污染，导致试剂失效或污染而结果不准确。

10、刚开启的酶标板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，酶标板在使用时从包装袋里取出，请勿提前取出。

11、在样本制备以及操作的每个过程中的变化都可能导致不同的实验结果，所以为了提高实验结果的可重复性，实验的每一步操作都需要严格控制。

12、试剂盒在出厂前均经过严格质检，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增大的情况。

13、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蛋白的产品做对比，所以不排除检测结果不一致的情况。

14、用于制备试剂盒中抗体的免疫原通常为重组蛋白，但由于制备重组蛋白所选取的片段、表达系统、纯化方式等各有不同，所以我们无法保证该试剂盒可用于其他公司重组蛋白的检测。

15、该试剂盒可能不适用于一些实验本身有效性不确定的特殊实验样品的检测，例如基因敲除实验等样品。

16、该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。

问题分析：

如实验结果不理想，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，填写售后服务表格（网上下载填写），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：

标准曲线差

可能原因	相应用策
标准品溶液配制有误	吸液或加液不准，检查移液器及吸头，确认是否进行正确稀释。
标准品复溶不当	开盖前先离心，检查复溶后是否存在不溶物。
标准品已降解	按推荐方式保存和处理标准品。
洗涤不完全	保证洗涤时间和洗涤次数及每孔的加液。
曲线的标度不适合	尝试使用不同标度绘制曲线。
移液器加样误差	正确使用经过校准的移液器。

无信号

可能原因	相应用策
靶标含量低于检测范围	减小样品的稀释倍数或浓缩样品。
样品类型不适用	对于没有验证过的样品类型，检测信号可能减弱；或没有使用验证过的样品类型作为阳性对照同时进行检测。
检测缓冲液的相容性	确保检测缓冲液与靶标兼容。
样品制备不正确	确保进行正确的样品制备/稀释。 样品可能与微量滴定板测定形式不兼容。
抗体不足	尝试不同的抗体浓度稀释。
孵育温度过低	使用前应处于室温，或实验方案所建议的温度。
波长不正确	确认波长，再次读板。
孔板被强力洗涤	检查并确保自动洗涤系统的压力正确。 如果手动洗涤，则轻轻吸取冲洗缓冲液。
孔变干	测定开始后，不要让孔变干。 将所有的孵育步骤使用封口膜或胶带密封孔板。
酶反应的显色速度慢	使用前配制底物溶液。确保母液未过期或污染。延长孵育时间。
试剂盒没有充分平衡	试剂盒室温平衡至少 20 分钟，确保所有试剂已平衡至室温。

背景偏高

可能原因	相应用对策
孔洗涤不充分	按照实验方案建议进行洗涤。
洗涤缓冲液污染	制备新鲜的洗涤缓冲液。
检测试剂过多	确保试剂被正确稀释或者减少检测试剂的推荐浓度。
封闭缓冲液无效	尝试不同的封闭剂和或将封闭剂添加到洗涤缓冲液。
孵育/洗涤缓冲液盐浓度改变	增加盐浓度可能会降低非特异性和/或减弱脱靶相互作用。
读板前加入终止液后时间太长	加入终止液后立即读板。
高抗体浓度	尝试不同的稀释度, 以获得最优结果。
底物孵育在光下进行	底物孵育应避光进行。
加入底物后有沉淀生成	增大样品的稀释倍数或降低底物浓度。
孔板脏	清洁孔板底部。
显色液变质或试剂过期	检查试剂盒有效期, 在有效期内使用。
孵育时间和温度的改变	按照说明书上推荐的时间和温度操作。
封板膜重复使用	及时更换使用过的封板膜。

灵敏度偏低

可能原因	相应用对策
ELISA 试剂盒保存不当	按推荐方式保存所有试剂。
靶标不足	浓缩样品或降低样品稀释度。
检测试剂失活	确保报告酶/荧光素具有预期的活性。
酶标仪设置不正确	在检测中, 确保酶标仪设置为正确的吸收波长或激发/发射波长。
微量滴定板吸附靶标的效果不佳	将靶标共价结合到微量滴定板。
样品类型不兼容质 (例如血清与细胞提取物)	对于未来验证过的样品种属, 检测信号可能减弱或没有。使用验证过的样品类型作为阳性对照同时进行检测。
缓冲液或样品成分干扰	确认试剂中是否存在干扰性化合物
混合或混用不同试剂盒的试剂	避免混合来自不同试剂盒的试剂。
试剂盒没有充分平衡	试剂室温平衡至少 20 分钟, 确保所有试剂已平衡至室温。

变异系数大

可能原因	相应用对策
孔中有气泡	读板前，确保不存在气泡。
孔洗涤不均/未充分洗涤	检查洗板机的所有管口是否畅通。使用推荐方法进行洗涤。
试剂混匀不充分	确保所有试剂充分混匀。
边缘效应	确保孔板和所有试剂处于室温。
样品制备或保存条件不一致	确保样品制备保持一致，使用最优的样品保存条件（例如尽可能减少反复冻融）。