

PANNARASE 核酸酶 ELISA 检测试剂盒说明书



检测原理：

本 ELISA 试剂盒采用基于双抗体夹心法的酶联免疫吸附检测技术。将抗 PANNARASE 核酸酶的单克隆抗体包被在酶标板上；分别加入梯度稀释的标准品和预稀释的样本，标准品和样本中的 PANNARASE 核酸酶会与酶标板上的包被抗体充分结合。洗板后加入生物素化抗 PANNARASE 核酸酶抗体，该抗体会与板子上包被抗体捕获的标准品和样本中的 PANNARASE 核酸酶发生特异性结合；洗板后加入辣根过氧化物酶（HRP）标记的链霉亲和素，生物素与链霉亲和素会发生高强度的非共价结合；洗板后加入显色剂底物 TMB，若反应孔中样品存在不同浓度的 PANNARASE 核酸酶，则 HRP 会使无色 TMB 变成不同深浅（正相关）的蓝色物质，加入终止液后反应孔会变成黄色；最后，在 $\lambda_{\max}=450\text{ nm}$ （OD=450 nm）处测定反应孔样品吸光度（OD），样本中的 PANNARASE 核酸酶与 OD 成正比，通过四参数拟合软件绘制标准曲线便可计算出样本中 PANNARASE 核酸酶的浓度。

注意事项：

1. 试剂盒应在有效期内使用，请不要使用过期的试剂。
2. 试剂盒未使用时应保存在 2-8 °C 冰箱，已复溶但未用完的标准品，请丢弃。
3. 试剂盒使用前请在室温恢复 30 min，且充分混匀试剂盒里的各种成份及制备的样品。
4. 在试验中标准品和样本建议作复孔检测，且加入试剂的顺序应保持一致。
5. 为避免交叉污染，请在试验中使用一次性试管，枪头，封板膜及洁净塑料容器。
6. 浓缩生物素化抗体和浓缩酶结合物的体积较少，在运输过程中微量液体会沾到管壁及瓶盖，使用前请离心处理（5-10 S 即可），使管壁上的液体集中在管底部。取用时，请用移液器小心吹打几次。
7. 除了试剂盒中的浓缩洗涤液和终止液可以通用外，请不要使用其他来源试剂盒内含的试剂代替本试剂盒中的某单个组分。
8. 为保证结果准确，每次检测均需做标准曲线。
9. 如果样本中的靶标物检测浓度高于标准品的最高值，请将样品做适当倍数稀释后检测，建议正式实验前做预实验以确定稀释倍数。

安全提示：

试剂盒中的终止液为酸性溶液，操作人员在使用时请戴上手套并注意防护；在操作过程中也要避免试剂接触皮肤和眼睛，如果不慎接触，请用大量清水清洗。



试剂盒组成及储存:

试剂盒组成	规格 (96T)	保存条件
抗体预包被酶标板	8*12	2-8℃
标准品	2 支	-20℃
SR1 标准品/样本稀释液	16 mL/瓶	2-8℃
浓缩生物素化抗体	60 μL(200×)	2-8℃
SR2 生物素化抗体稀释液	16 mL/瓶	2-8℃
浓缩酶结合物 (避光)	120 μL(100×)	2-8℃
SR3 酶结合物稀释液	16 mL/瓶	2-8℃
浓缩洗涤液 (20×)	30 mL/瓶	2-8℃
显色底物 (避光)	12 mL/瓶	2-8℃
终止液	12 mL/瓶	2-8℃
封板胶纸	4 张	
说明书	1 份	

自备实验器材 (可提供)

1. 酶标仪 (主波长 450 nm, 参考波长 630 nm)
2. 高精度移液器及一次性吸头: 0.5-10, 2-20, 20-200, 200-1000 μL
3. 洗板机或洗瓶
4. 双蒸水, 去离子水, 量筒等

试剂准备:

1. 试剂回温: 首先在实验前 30 min 将试剂盒, 待测样本放置于室温下, 浓缩洗涤液如出现结晶, 请放入 37℃ 温浴直到结晶全部溶解。
2. 配制洗涤液: 预先计算出稀释后的洗涤液使用体积, 然后用双蒸水或去离子水将 20 倍浓缩洗涤液稀释成 1 倍应用液, 未用完的浓缩洗涤液放入 4℃ 冰箱保存。
3. 标准品梯度稀释: 加入标准品 / 样本稀释液 2mL 至冻干标准品中 (浓度为 10 ng/mL), 静置 10-30 分钟待其完全溶解后轻轻混匀, 按照以下浓度: 10、5、2.5、1.25、0.625、0.3125、0.15625 ng/ml 进行 2 倍稀释。10ng/mL 作为标准曲线的最高点浓度, 标准品 / 样本稀释液 (0ng/mL) 作为空白孔。复溶过的标准品未用完的不建议再次使用。
4. 生物素化抗体工作液: 预先计算出试验所需用量, 用检测抗体稀释液 (SR2) 将 200 倍抗体浓缩液稀释成 1 倍应用工作液 (稀释前充分混匀), 请在 30 分钟内加入到反应孔中。



生物素化抗体工作液具体稀释方法如下：

板条	浓缩生物素化抗体 (1:200) : μL	抗体 HRP 稀释液: μL
2	10	1990
4	20	3980
6	30	5970
8	40	7960
10	50	9950
12	60	11940

5. 酶结合物工作液：按每次实验所需用量配制，用酶结合物稀释液（SR3）将 100 倍浓缩酶结合物稀释成 1 倍应用工作液（稀释前离心），请在 30 分钟内使用。

酶结合物工作液具体稀释方法如下：

板条	浓缩酶结合物 (1:100) : μL	抗体 HRP 稀释液: μL
2	20	1980
4	40	3960
6	60	5940
8	80	7920
10	100	9900
12	120	11880

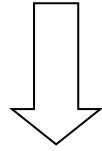
6. 洗涤方法：

- 自动洗板：甩尽酶标板孔中液体，在厚透吸水纸上拍干，注入洗涤液为 300 μL /孔，注入与吸出间隔为 60 秒，洗板 4 次。
- 手工洗板：甩尽酶标板孔中液体，在厚透吸水纸上拍干，用洗瓶加入洗涤液 300 μL /孔，静置 60 秒后甩净酶标板孔中液体，在厚透的吸水纸上拍干，洗板 4 次。

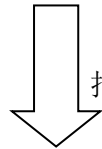


检测步骤：

实验前 30 min，拿出试剂盒，恢复至室温，加入标准品 / 样本前，请洗板 2 次并甩干

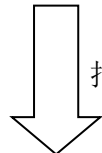


加入 100uL 标准品及检测样本至反应孔中，封板后于室温（ $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ）静置反应 120 min



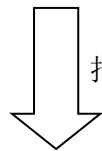
拍板 & 洗板 4 次

加入 100 uL 生物素化抗体工作液至反应孔中，封板后于室温（ $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ）静置反应 60 min



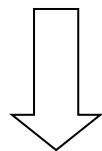
拍板 & 洗板 4 次

加入 100 uL 酶结合物工作液至反应孔中，封板后于室温（ $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ）静置反应 30 min



拍板 & 洗板 4 次

加入 100uL 显色底物至反应孔中，封板后于室温（ $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ）避光显色 10-15 min（取决于实验室具体温度）



加入 50 uL 终止液，即刻用酶标仪 450nm 波长下测量 OD 值（5 分钟内）

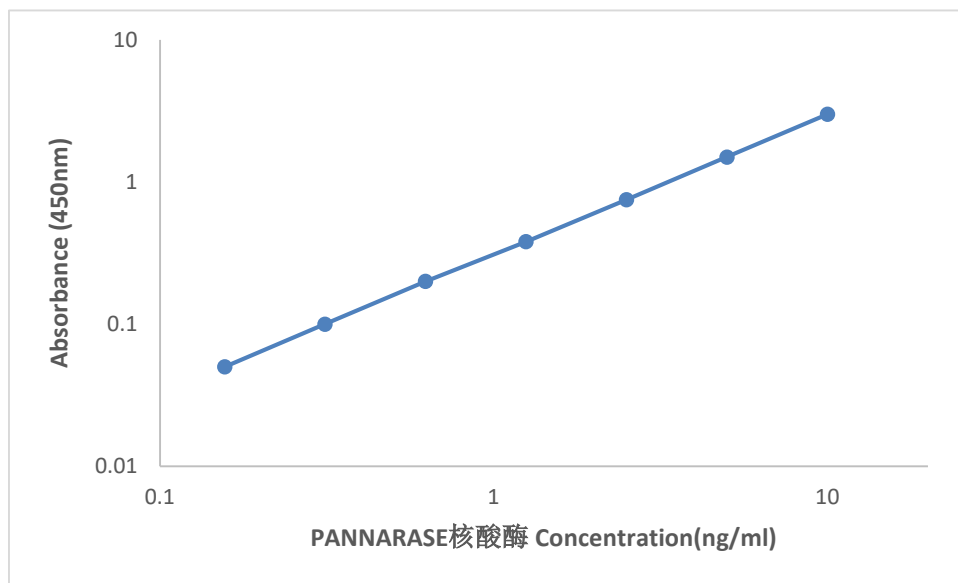
结果判断：

1. 用酶标仪 450 nm 波长测定 OD 值。选择双波长检测，参考波长为 630 nm。如不能进行双波长检测，请用 450 nm 的 OD 测定值减去 630 nm 的 OD 测定值。
2. 计算标准品、样品的平均 OD 值；每个标准品和样品的 OD 值应减去零孔的 OD 值。
3. 以标准品浓度为横坐标，吸光度 OD 值为纵坐标，用软件绘制标准曲线，样品中含量可通过对应 OD 值由标准曲线换算出相应的浓度。
4. 若标本 OD 值高于标准曲线上限，应做适当稀释后重新检测，计算浓度时再乘以稀释倍数。

参数表征:

数据及标准曲线

标准品浓度(ng/mL)	OD 值 1	OD 值 2	平均值	矫正值
0	0.019	0.02	0.0195	-
0.15625	0.32	0.342	0.331	0.3115
0.3125	0.547	0.569	0.558	0.5385
0.625	0.868	0.895	0.8815	0.862
1.25	1.355	1.298	1.3265	1.307
2.5	1.817	1.835	1.826	1.8065
5	2.173	2.145	2.159	2.1395
10	2.56	2.614	2.587	2.5675



本图仅供参考，应以当次试验标准品绘制的标准曲线计算样本含量。



常见问题及解决办法:

问题	可能原因	解决方法
高背景或阴性对照值偏高	洗板不充分	将洗涤剂注入反应孔充分洗涤，彻底拍干孔中液体
	酶结合物过量	检查酶稀释度，按说明书标识的稀释度稀释
	底物污染	加底物前检查底物是否为透明无色，请勿用变蓝的底物，重新用新的底物试验
	阴性对照孔被阳性对照污染	注意洗涤时不要把洗液溢出孔外，不使阴阳对照孔液体连接一起
	不同批次试剂混用	检查试剂批号，请勿用不同批次试剂
显色信号弱	试剂过期	检查试剂盒有效期，请勿用过期试剂
	孵育时间过短	按说明书中规定的时间孵育
	试剂污染	检查试剂是否污染，请勿用污染的试剂
	酶标仪滤光片不匹配	检查酶标仪设置及滤光片是否匹配
	试剂盒平衡不充分	确保试剂盒试验前平衡至室温
	显色时间不够	增加底物显色时间
无显色信号	检测抗体、酶、或显色剂漏加	检查试验操作流程，重复试验
	酶被叠氮钠污染	请使用重新配制的试剂
	试剂添加顺序有误	检查复核试验添加顺序、流程、重复试验
标曲佳但样品孔无信号	样品中靶标物含量低或样品中无靶标物	设置阳性对照、重复实验
	样品基质效应影响检测	重新稀释样品后复测
标曲佳但样品信号偏高	样品中待检物含量超过标准曲线范围	重新稀释样品后复测
边缘效应	孵育温度不均衡	孵育时每步均使用新的封板胶纸，避免在环境温度变化大的地方孵育，勿叠放反应板