

人岩藻糖基转移酶 5 ELISA 试剂盒
Human Fucosyltransferase 5 (FUT5) ELISA Kit

Catalog No.: MA22682

96 Tests

该试剂盒仅供科研使用。

For Research Use Only, Not for In Vitro Diagnostic Use.

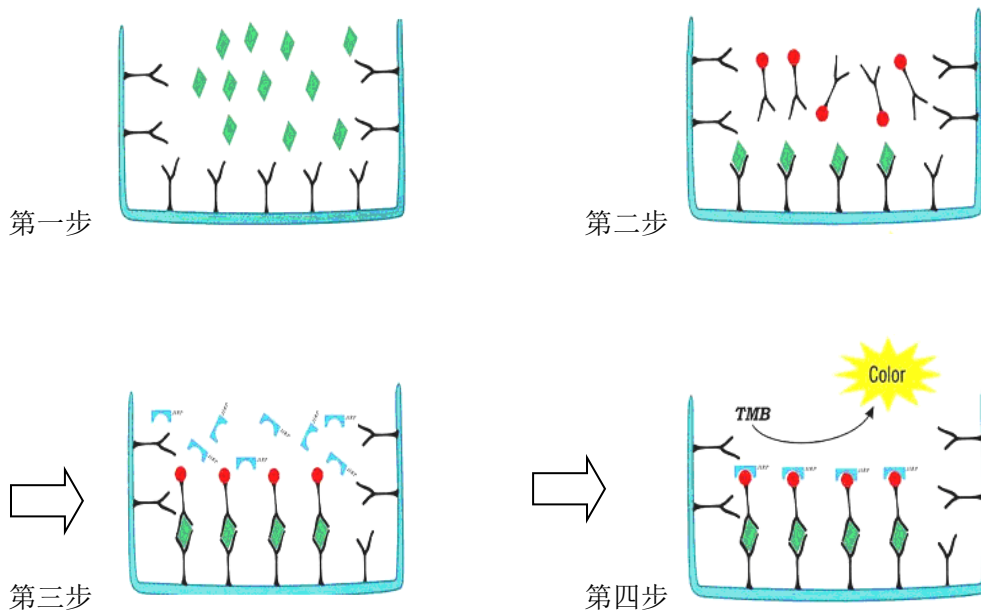
该试剂盒适用于体外定量检测人血清、血浆、细胞培养上清液和组织等样品中天然或重组的人岩藻糖基转移酶 5(FUT5)浓度。

使用前请仔细阅读说明书并检查试剂盒组分。

检测原理

该试剂盒是典型的夹心法酶联免疫吸附测定试剂盒 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay , ELISA) , 采用双抗体夹心 ELISA 法。预先包被的抗体为人岩藻糖基转移酶 5(FUT5)单克隆抗体, 检测相抗体为多克隆抗体, 经生物素 (biotin) 标记。样品和生物素标记抗体先后加入酶标板孔反应后, 经 PBS 或 TBS 洗涤, 随后加入过氧化物酶标记的亲合素反应; 经过 PBS 或 TBS 的彻底洗涤后用底物 TMB 显色。TMB 在过氧化物酶的催化下转化成蓝色, 并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的待测因子呈正相关。

原理示意图



试剂盒组分

名称	规格	名称	规格
酶标板	1	标准品稀释液	1 x 15 ml
标准品	2	样品稀释液	1 x 15 ml
浓缩生物素化抗体	1 x 120 μ l	浓缩洗涤液(25 \times)	1 x 20 ml
浓缩酶结合物(ABC)	1 x 120 μ l	显色剂 A	1 x 10 ml
酶结合物(ABC)稀释液	1 x 12 ml	显色剂 B	1 x 1.5 ml
抗体稀释液	1 x 12 ml	终止液	1 x 10 ml

备注 标准品：冷冻干燥；显色剂 A：避光。

需自备物品

1. 酶标仪(450nm 检测波长滤光片，570nm 或 630nm 校正波长滤光片)；
2. 洗板机（可调注液量，保证每孔 350 μ l 洗液而不溢出）；
3. 高精度单道加液器（量程为 0.5-10 μ l, 2-20 μ l,20-200 μ l,200-1000 μ l）；
4. 高精度多道加液器（8 道或 12 道，量程为 50-300 μ l）；
5. 37 $^{\circ}$ C 恒温箱；
6. 低温离心机；
7. 纯净水或蒸馏水。

标本收集注意事项

1. 收集血液的试管应为一次性的无热原、无内毒素试管；
2. 血清和血浆避免使用溶血、高血脂标本；
3. 标本应清澈透明，悬浮物应离心去除；
4. 标本收集后若不及时检测，需按一次使用量分装，冻存于-20 $^{\circ}$ C，-80 $^{\circ}$ C 冰箱内，避免反复冻融；
5. 可根据标本的实际情况，做适当倍数稀释(建议做预实验，以确定稀释倍数)；
6. 收集标本，尽量做到双份的用量，避免一次实验失败，重复实验时标本缺失，从而耽误实验进程；
7. 收集标本时，应该做好防护措施（比如戴手套，口罩，护目镜等），因为所有标本都具有一定的潜在危险性；
8. 样本处理应该在生物安全柜里面，并且正确使用生物安全柜。

标本处理

1. 血清：将采集的全血静置冰箱 4℃ 过夜，然后 1000-3000rpm 离心 10 分钟，取上清立即测试，暂时不测可以放入 -20℃ (1-3 个月) 或 -80℃ (3-6 个月) 保存；
2. 血浆：用 EDTA，枸橼酸钠，肝素等作为抗凝剂，加入血液混匀后，1000-3000rpm 离心 10 分钟，取上清立即测试，暂时不测可以放入 -20℃ (1-3 个月) 或 -80℃ (3-6 个月) 保存；
3. 组织匀浆：切取组织块，0.01M PBS 中过洗一次；按照 1G 组织加入 5-10ml 组织蛋白萃取试剂的比例，在冰水中匀浆。匀浆完成后，5000-10000rpm 离心 10 分钟，取上清立即测试，暂时不测可以放入 -20℃ (1-3 个月) 或 -80℃ (3-6 个月) 保存；
4. 细胞培养上清：1000-3000rpm 离心 10 分钟，取上清立即测试，暂时不测可以放入 -20℃ (1-3 个月) 或 -80℃ (3-6 个月) 保存；
5. 尿液，腹水，脑脊液等：1000-3000rpm 离心 10 分钟，取上清立即测试，暂时不测可以放入 -20℃ (1-3 个月) 或 -80℃ (3-6 个月) 保存；

注 样品稀释的一般原则

用户须查阅相关文献了解标本内待测因子的含量，决定适当的稀释倍数，以使稀释后样品中待测因子的浓度处于 ELISA 试剂盒的最佳检测范围。样品的稀释应有详细记录。

注意事项

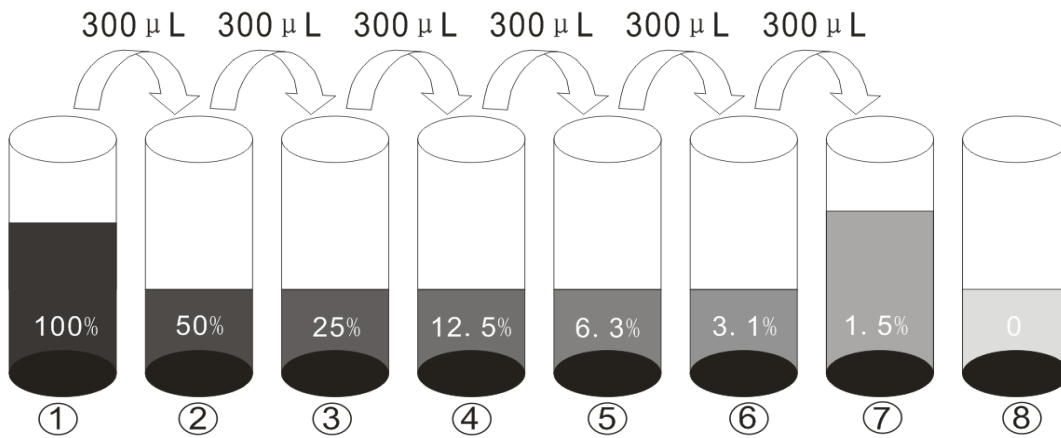
1. 试剂盒使用前请保存在 2-8℃。除复溶后的标准品，其他成分不可冻结；
2. 浓缩生物素化抗体、浓缩酶结合物体积小，运输中颠簸和可能的倒置，会使液体沾到管壁或瓶盖。因此使用前请用手甩几下或 1000rpm 离心 1 分钟，以使附着管壁或瓶盖的液体沉积到管底；
3. 浓洗涤液可能会有结晶析出，稀释时可在水浴中加温助溶，使结晶完全溶解后再配制洗涤液；
4. 实验过程中，冻干标准品为一次性使用，不得分装。因其浓度较低，溶解两小小时候后，会迅速失活；
5. 操作严格按照说明书进行，本试剂不同批号组分不能混用；
6. 配制试剂时，要用旋涡混合仪混匀。加入孔内的试剂，充分混匀对测试结果尤为重要，最好使用微量振荡器(使用最低频率)，如无微量振荡器，可在反应前手工轻轻晃动酶标板 1 分钟，例如做圆周动作，使加入孔中的反应液混匀；

7. 实验用酶标仪应严格按使用说明书规范操作，并在使用前充分预热；
8. ELISA 实验中标准品和样本检测时建议作复孔；
9. 应将未用的酶标板放回原铝箔袋中，置 2-8°C 保存；
10. 显色液对光敏感，因此要避免直接暴露在光线下；
11. 超过使用有效日期的试剂盒不能应用于实验中；
12. 试验结果判定必须以酶标仪读数为准，使用双波长检测时，波长应该设置为 450nm 和 630nm；
13. 所有样品，洗涤液和各种废弃物都应按生物废弃物处理。终止液为 2M 硫酸，使用时必须注意安全；
14. 各步骤加样均应使用加样器，并经常校准其准确性，以避免试验误差。一次加样时间最好控制在 5 分钟内，如标本数量多，推荐使用排枪加样；
15. 每次试验测定的同时做标准曲线，最好做复孔。如标本中待测物质含量过高（样本 OD 值大于标准品孔最高浓度的 OD 值），请先用样品稀释液稀释一定倍数（n 倍）后再测定，计算时请最后乘以总稀释倍数（×n）；
16. 不能检测含 NaN₃ 的样品，因 NaN₃ 抑制辣根过氧化物酶的（HRP）活性；
17. 以洗板机洗板时，每孔注液量不应少于 350μl，注意检查加样头是否堵塞。手工洗板时，用带纸屑的吸水材料应慎重，防止外源性过氧化物酶类似物或氧化还原物与显色剂发生反应；
18. 用终止液终止反应后，请于 10 分钟内读取 OD 值；
19. 进行复孔实验时，结果计算一定要求平均值；
20. 标本溶血可能会有假阳性结果，因此溶血标本不宜进行此项检测；
21. 实验时，应该将加过样品的板条放于密闭盒内，并保持湿度约 60% 左右；
22. 为保证恒温箱内的温度为 37°C，恒温箱的温度要经常校准。以确保实验温度保持恒定；

准备工作

1. 请提前 20 分钟从冰箱中取出试剂盒，平衡至室温后方可进行试验；
2. 将浓缩洗涤液用双蒸水稀释(1:25)。未用完的放回；
3. 标准品: 加入标准品稀释液 1.0ml 至冻干标准品中，静置 10 分钟，待其充分溶解后，轻轻混匀(浓度为 20 ng/ml)，之后在管身标注①，然后根据需要进行稀释（建议标准曲线使用以下浓度：20、10、5、2.5、1.25、0.625、0.312 ng/ml）。注意：务必要保证冻干标准品彻底溶解和混匀。
4. 标准品稀释方法图例：取 7 支洁净的试剂管，分别标注②,③,④,⑤,⑥,⑦,⑧。每管加入 300μl 标准品稀释液。从第①管内取出 300μl 加入到第②管，混匀后，

再从第②管取出 300 μ l 加入到第③管，以此类推至第⑦管。第⑧管为标准品稀释液，作为阴性对照使用。



备注 复溶标准品原液 (20 ng/ml) 请废弃，不可重复使用；

5. 生物素化抗体工作液：按当次试验所需用量，用抗体稀释液稀释浓缩生物素化抗体(1:100)，配置成生物素化抗体工作液。使用前 30 分钟准备，仅供当日使用；
6. 酶结合物工作液：按当次试验所需要用量，用酶结合物稀释液稀释浓缩酶结合物(1:100)，配置成酶结合物工作液。使用前 30 分钟准备，仅供当日使用；
7. TMB 显色工作液：在使用之前 30 分钟，按 TMB 显色液 A x 9 份加 TMB 显色液 B x 1 份 (9 : 1) 的比例配制 TMB 显色工作液。

洗涤方法

1. 自动洗板机：要求注入的洗涤液为 350 μ l，注入与吸出间隔 20 - 30 秒。确保机器运用熟练后，再投入实验中使用；
2. 手工洗板：每孔加洗涤液 350 μ l，静置 30 秒后甩尽孔内液体，在吸水纸上拍干。手工洗板时，注意加入洗液的过程中，不要造成孔间污染，从而出现跳孔的现象。

操作步骤

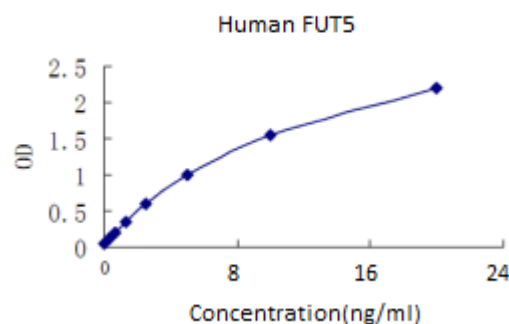
1. 从已平衡至室温的密封袋中取出试验所需板条，未用的板条和干燥剂请放回铝箔袋内封存于 2-8 $^{\circ}$ C；
2. 预留空白孔（若使用双波长读板，空白孔可以不设）；
3. 分别将标本或不同浓度的标准品（0 ng/mL 孔加标准品稀释液）加入相应孔

- 中(100 μ l/孔), 37 $^{\circ}$ C孵箱孵育 90 分钟;
4. 提前 30 分钟制备生物素化抗体工作液;
5. 洗板 2 次;
6. 加入生物素化抗体工作液(100 μ l/孔), 37 $^{\circ}$ C孵箱孵育 60 分钟;
7. 提前 30 分钟制备酶结合物工作液。室温避光放置;
8. 洗板 3 次;
9. 除空白孔外,加入酶结合物工作液(100 μ l/孔)。37 $^{\circ}$ C孵箱,避光孵育 30 分钟;
10. 洗板 5 次;
- 11.加入 TMB 显色工作液(包括空白孔) 100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C孵箱,避光孵育,当标准曲线高浓度的颜色较深,有明显的颜色梯度的时候,即可终止。试验显色反应请勿超过 30 分钟;
- 12.加入终止液(包括空白孔) 100 μ l/孔,混匀后即刻测量 OD (450nm) 值(10 分钟内)。

结果判断

1. 每个标准品和标本的 OD 值应减去零孔的 OD 值(若不减零孔值,标准曲线的零孔应相交于 Y 轴);
2. 手工绘制标准曲线:以标准品浓度作横坐标,OD 值作纵坐标,以平滑线连接各标准品的坐标点。通过标本的 OD 值可在标准曲线上查出其浓度。推荐使用专业制作曲线软件进行分析,如 curve expert 1.3 进行结果计算;
3. 若标本 OD 值高于标准曲线上限,应适当稀释后重测,计算浓度时应乘以稀释倍数。

参考曲线



注意: 本图仅供参考,应以同次试验标准品所绘标准曲线来计算标本含量。

操作程序总结

准备试剂，样品和标准品



加入准备好的样品和标准品，37°C反应 90 分钟



洗板 2 次，加入生物素化抗体工作液，37°C反应 60 分钟



洗板 3 次，加入 ABC 工作液，37°C反应 30 分钟



洗板 5 次，加入 TMB 显色液，37°C反应



加入 TMB 终止液



10 分钟之内酶标仪测 OD 值



计算标本待测因子含量

试剂盒参数

【检测范围】 20 ng/ml-0.312 ng/ml ；

【灵敏度】 最小可测值<0.06 ng/ml ；

【特异性】 系统和其它因子无交叉反应 ；

【批间差】 ≤12% ；

【批内差】 ≤8% ；

【回收率】 70-110% ；

【保存】 -20°C ；短期内（如两周）可 4°C ；

【用途】 用于体外定量分析液体标本（通用型） ；

【效期】 12 个月（-20°C）。