ShareBio圣尔

仅供科研使用
不用于临床诊断

人血管生成素样蛋白 8(ANGPTL8)酶联免疫吸附测定试剂盒

货号:SB-FY6695 规格：48T/96T

使用本产品前请务必仔细阅读此说明书
如果有任何问题请联系我们

使用目的

本试剂盒用于测定人血清、血浆及相关液体样本中人 ANGPTL8 含量。

特异性

★灵敏度：75 pg/mL。
★检测范围：125-8000pg/mL。
★在人 ANGPTL8 及其类似物之间没有检测到显著的交叉反应。
★重复性：变异系数< 9%。

检测原理

本试剂盒采用双抗体夹心 ELISA 法。用抗人 ANGPTL8 抗体包被于酶标板上，实验时加入样品（或标准品）和辣根过氧化物酶标记的抗人 ANGPTL8 抗体，样本（或标准品中）的人 ANGPTL8 会与包被抗体及辣根过氧化物酶标记的抗人 ANGPTL8 抗体结合，形成双抗体夹心的免疫复合物，游离的成分被洗去。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 波长处测 OD 值，ANGPTL8 浓度与 OD450 值之间呈正比，通过绘制标准曲线计算出样品中 ANGPTL8 的浓度。

声明

1. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
2. 由于其有效性的不确定性，该试剂盒可能不适合检测某些特殊的实验样品，例如基因敲除实验样品。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同厂家的试剂盒或通过其他方法检测相同的指标可能会产生不一致的结果
5. 由于试剂盒中使用的抗体通常是由重组蛋白作为免疫原制备而成，而重组蛋白可能会受限于不同的片段、表达和纯化体系，因此不建议使用此试剂盒来检测重组蛋白。
6. 为了获得最佳实验结果，请仅使用我们提供的试剂，并且不要混用不同批次的试剂。
7. 由于现有条件和科学技术的局限性，我们无法全面识别和分析供应商提供的原材料。因此，该试剂盒可能存在一定的质量和技术风险。
8. 在 ELISA 实验测试所有影响因素之前，不能排除干扰的可能性。
9. 为了获得可重复的结果，应严格控制实验中的每个步骤，样品收集、处理和存储的变化也可能导致样品测量的差异。
10. 尽管每个试剂盒都通过了严格的质量测试，但由于运输条件和不同实验室设备等影响因素，可能会引起不同批次试剂盒之间检测值的差异。

试剂盒组成及保存

组分名称	规格	使用后保存条件
ELISA 酶标板 (Micro ELISA Plate)	96T:8 孔×12 条 48T:8 孔×6 条	-20℃,可存放 6 个月
冻干标准品 (Reference Standard)	96T:2 支 48T:1 支	
浓缩生物素化抗体 (Concentrated Biotinylated Detection **Ab**) (100X)	96T:1 支 120μL 48T:1 支 60μL	
浓缩 **HRP** 酶结合物 (Concentrated **HRP** Conjugate) (100X)	96T:1 支 120μL 48T:1 支 60μL	-20℃,可存放 6 个月
标准品&样品稀释液 (Reference Standard & Sample Diluent)	20mL*1 瓶	2-8℃,可存放 6 个月
生物素化抗体稀释液 (Biotinylated Detection Ab Diluent)	13mL*1 瓶	
酶结合物稀释液 (HRP Conjugate Diluent)	13mL*1 瓶	
浓缩洗涤液 (Concentrated Wash Buffer) (25X)	30mL*1 瓶	
底物溶液 (Substrate Reagent)	10mL*1 瓶	2-8℃（避光）
反应终止液 (Stop Solution)	10mL*1 瓶	2-8℃,可存放 6 个月
封板覆膜	5 张	常温
产品说明书	1 份	
质检报告	1 份	

实验过程需自备的材料和仪器

带 450nm 波长滤光片的酶标仪
37℃恒温箱
高精度单道或多道移液器
一次性移液器吸头
EP 管
加样槽
洗板机
去离子水或蒸馏水
用于微孔板的吸水纸

注意事项

1.实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
2.新打开的 ELISA 酶标板可能含有水雾样物质，此为正常现象，不会对实验结果产生任何影响。
3.不得重复使用标准品工作液、检测试剂 A 工作液、检测试剂 B 工作液。
4.酶标仪需要安装 450 ±10nm 波长的滤光片和能检测 450 ±10nm 波长的检测器，且光密度值在 0-3.5 之间。
5.本说明书也适用于 48T 试剂盒，但 48T 试剂盒的所有试剂均减半。
6.溶解含有蛋白质溶液时，应始终避免起泡。
7.为避免交叉污染，在每个标准品浓度加样之间、样品加样之间以及试剂加样之间更换移液器枪头。此外，应为每种试剂使用单独的储液瓶。
8.为了得到准确的实验结果，在孵育过程中，必须确保封板膜将酶标板密封。
9.在使用自动洗板机时，添加清洗缓冲液后，在清洗步骤之间添加 30 秒的浸泡时间可提高分析精度。
10.在被添加到酶标板中之前，底物溶液都应保持为无色，并且不受光照。加入到酶标板中之后底物溶液应从无色变为渐变蓝色。
11.终止液应按照与加底物溶液相同的顺序添加到酶标板中。添加终

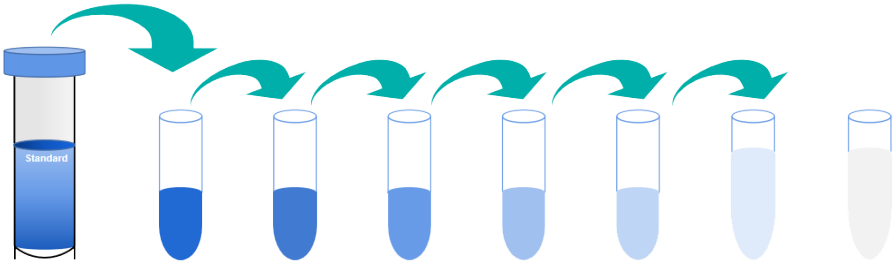
止液后，孔中溶液的颜色将从蓝色变为黄色。绿色的孔表明终止液未与底物溶液充分混合。

试剂准备

1.使用前将所有试剂平衡至室温(18-25℃)。按照酶标仪说明书进行设置检测波长为 450nm，并在读板前预热 15 分钟。

2.**洗涤缓冲液:**用 480 mL 去离子水或蒸馏水稀释 20 mL 浓缩洗涤缓冲液，制备成 500 mL 洗涤缓冲液。

3.**标准工作液：**将标准品于 10000×g 离心 1 分钟，加入标准品&样品稀释液 1mL 至冻干标准品中，旋紧管盖，静置 10 分钟，上下颠倒数次，待其充分溶解后，轻轻混匀，避免起泡，配成 8000pg/mL 的标准品工作液(或加入 1mL 标准品&样品稀释液后，静置 1-2 分钟，用低速涡旋仪充分混匀。可通过低速离心去除涡旋过程中产生的气泡)。然后根据需要进行倍比稀释。建议配制成以下浓度：8000pg/mL，4000pg/mL，2000pg/mL，1000pg/mL，500pg/mL，250pg/mL，125pg/mL。倍比稀释方法：取 7 支 EP 管，每管中加入 250μL 标准品&样品稀释液，从 8000pg/mL 的标准品工作液中吸取 250μL 到第一支 EP 管中混匀配成 4000pg/mL 的标准品工作液，按此步骤往后依次吸取混匀。如下页图。提示：最后一管直接作为空白孔，不需要再从倒数第二管中吸取液体。倍比稀释的标准品工作液需要现配现用。



8000	4000	2000	1000	500	250	125	0
pg/mL	pg/mL	pg/mL	pg/mL	pg/mL	pg/mL	pg/mL	pg/mL

4. **生物素化抗体工作液：**实验前计算所需量(50 µL/孔)。在准备工作中，应该准备比计算量多 100-200 µL。使用前将原液管稍许离心，用生物素化抗体稀释液将 100×浓缩生物素化抗体稀释至 1×生物素化抗体工作液（如：10µL 生物素化抗体 ＋990µL 生物素化抗体稀释液）。
5. **HRP 酶结合物工作液：**实验前计算所需量(100 µL/孔)。在准备工作中，应该准备比计算量多 100-200 µL。使用前将原液管稍许离心，用 HRP 酶结合物稀释液将 100×浓缩 HRP 酶结合物稀释至 1×HRP 酶结合物工作液（如：10µLHRP 酶结合物 ＋990µLHRP 酶结合物稀释液）。

操作步骤

1. 从板框上取下待用的微孔板条，将剩余的板条放回装有干燥剂的铝箔袋中，然后重新密封保存。
2. 分别设定标准孔、空白孔和样本孔。标准孔加入 100μL 倍比稀释的标准品，空白孔加入 100μL 标准品&样本稀释液，其余孔加入 100μL 待测样本(建议所有的待检样本和标准品在检测中设立复孔；建议通过预实验或咨询技术支持确定待检样本的稀释倍数)。给酶标板覆膜，37℃孵育 90 分钟。提示：加样时将样品加于酶标板底部，尽量不触及孔壁，轻轻晃动混匀，避免产生气泡。加样时间宜控制在 10 分钟内。
3. 甩尽孔内液体，洗涤 3 次。每个孔中加入生物素化抗体工作液 100 μL，酶标板加上新覆膜，37℃温育 60 分钟。
4. 甩尽孔内液体，在洁净的吸水纸上拍干。每孔加洗涤液 300μL，浸泡 30 秒，吸去或甩掉酶标板内的液体，拍干。重复此洗板步骤 3 次。提示：此处与其他洗板步骤都可使用洗板机(参考北京拓普 DEM-3 型洗板机参数设置：2 点吸，每孔加入洗涤液 300μL，振板 5 秒，吸液 0.5 秒)。洗板完成后请立即进行下步操作，不要让微孔板干燥。
5. 每孔加 HRP 酶结合物工作液 100μL，酶标板加上覆膜，37℃温育 30 分钟。
6. 甩尽孔内液体，洗板 3 次，方法同步骤 4。
7. 每孔加底物溶液(TMB)100μL，酶标板加上覆膜，37℃避光孵育 15 分钟左右。提示：根据实际显色情况酌情缩短或延长，但不可超过 30 分钟。当标准孔出现明显梯度时(前 4 个显色孔出现明显蓝色梯度)，即可终止。提前 15 分钟打开酶标仪预热。
8. 每孔加终止液 50μL，终止反应。提示：终止液的加入顺序应尽量与底物溶液的加入顺序相同。
9. 立即用酶标仪在 5 分钟内测定每个孔 450nm 的光密度(OD 值)。如果可以选择校正波长，则设置为 630 nm 或 570 nm。并从 450 nm 的读数中减去 630 nm 或 570 nm 的读数，这种方式可以校正并去除非显色物质的 OD 值，从而获得更准确的检测结果。如果无法选择校正波长，则获得的读数将偏高，导致读数的准确度下降。

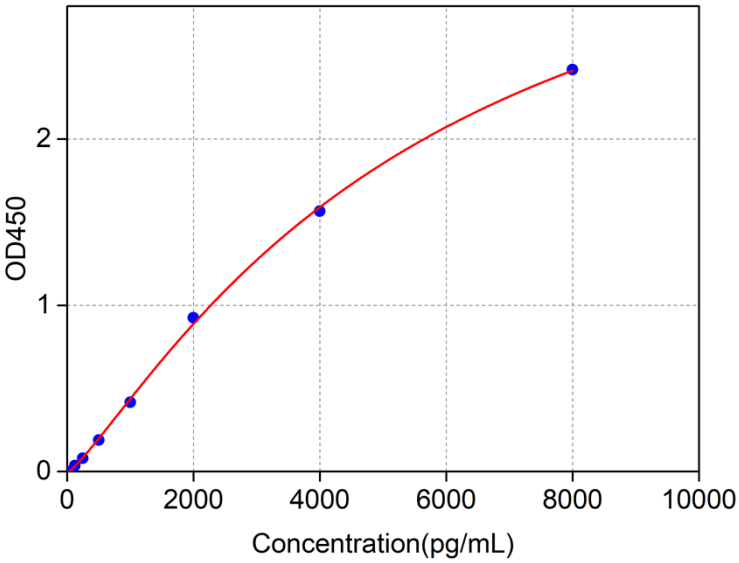
典型数据

标准曲线的 OD 值可能会由于具体实验条件不同而变化(例如，操作人员、移液技术、洗涤技术或温度影响)，因此强烈建议根据每次实验的具体数据绘制标准曲线。下面提供的典型标准曲线仅供参考。

pg/mL	OD1	OD2	平均值	校正 OD
0	0.0327	0.032	0.032	0
125	0.067	0.067	0.067	0.035
250	0.112	0.112	0.112	0.08
500	0.222	0.224	0.223	0.19
1000	0.449	0.451	0.45	0.417
2000	0.957	0.966	0.962	0.925
4000	1.599	1.607	1.603	1.567
8000	2.45	2.465	2.458	2.418

结果计算

每个标准品和样品的重复读数分别取平均值，然后减去零孔 OD 的平均值。拟合一条标准曲线，x 轴为标准品浓度，y 轴为 OD 值。通过这些点绘制最佳拟合曲线，且其能通过回归分析确定回归方程。如果样品被稀释，从标准曲线上读出的浓度必须乘以稀释系数。



灵敏度

人 ANGPTL8 的最低检测浓度通常小于 75 pg/mL。
本方法的灵敏度，或检测限(LOD)被定义为最低的可以区别于空白孔的检测指标浓度。其计算方法是 20 个空白孔的平均 OD 值加 3 倍标准差，然后计算相应的浓度。

特异性

本方法对人 ANGPTL8 的检测灵敏度高，特异性好。
人 ANGPTL8 及其类似物之间未观察到明显的交叉反应。
受现有技术和知识的限制，我们不可能完成人 ANGPTL8 与所有类似物的交叉反应性检测，因此交叉反应可能仍然存在。

回收率

分别往不同样本中添加已知浓度的人 ANGPTL8，做回收实验，得出回收 率范围 和平均回收率。

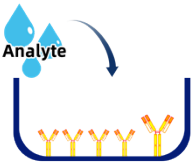
样本类型	回收率范围(%)	平均回收率(%)
血清(n=8)	87-99	93
血浆 EDTA(n=8)	80-92	85
细胞培养基(n=8)	80-96	87

线性

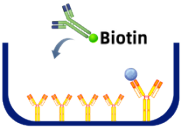
将添加有人 ANGPTL8 的样本分别稀释 2 倍，4 倍，8 倍，16 倍做回收实验，得出回收率范围及平均回收率。

		血清 (n=8)	血浆 EDTA (n=8)	细胞培养基 (n=8)
1:2	回收率范围 (%)	82-98	95-106	92-103
1:4	回收率范围 (%)	93-106	87-101	81-99
1:8	回收率范围 (%)	89-97	85-97	87-98
1:16	回收率范围 (%)	85-94	95-107	80-89

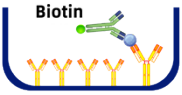
操作步骤



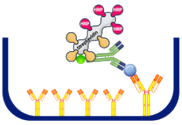
1、对应板孔中加入100μL标准品工作液或样本，37°C孵育90分钟



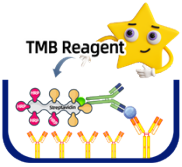
2、弃掉板内液体后，洗板3次，加入100μL生物素化抗体工作液37°C孵育60分钟



3、弃掉板内液体后，洗板3次

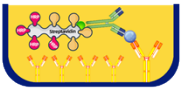


4、加入100μL HRP酶结合物工作液37°C孵育30分钟



5、弃掉板内液体后，洗板3次，每孔加入100μL TMB底物溶液，37°C避光孵育15分钟

6、每孔加入50μL终止液



7、5分钟内在450nm波长下读数，处理数据

疑难解答

问题	可能原因	解决措施
标曲无梯度	标准品稀释不正确	按照推荐方法溶解和稀释
	移液不准确	定期校准移液器并检查枪头密封性
	反应液蒸发	用封板膜密封酶标板
	洗板不彻底	足够的洗涤次数和足量洗涤液
	孔底有异物	读数前清洁板底
显色弱或无色	试剂反应不充分	确保孵育时间和合适温度孵育
	试剂体积添加不足	检查移液器并严格按照操作步骤操作
	稀释不正确	检查试剂稀释步骤
	酶结合物失活	混合酶结合物和底物，通过显色反应检查
OD 值偏低	酶标仪设置不正确	检查仪器波长
	未加终止液	加入适量终止液
	读板时等待时间太长	及时读板
背景值高	显色液被污染	更换显色液
	显色时间太长	控制显色时间
	反应试剂稀释错误	使用推荐稀释方法
	洗板不彻底	足够的洗涤次数和足量洗涤液