CEA621Ge 96T
羟脯氨酸(Hyp)检测试剂盒
(酶联免疫吸附试验法)
适用生物：泛物种
使用说明书

仅供研究使用，不用于临床诊断!

第 13.0 版

[预期应用]

本试剂盒运用竞争抑制 ELISA 法定量测定血清、血浆、组织匀浆、细胞裂解液、细胞培养上清 或其它相关生物液体中羟脯氨酸含量。

[试剂盒内容]

试剂名称	数量	试剂名称	数量
96孔板（预包被）	1	96孔板覆膜	4
标准品	2	标准品稀释液	1×20mL
检测溶液A	1×120μL	检测稀释液A	1×12mL
检测溶液B	1×120μL	检测稀释液B	1×12mL
TMB底物	1×9mL	终止液	1×6mL
浓洗涤液（30×）	1×20mL	使用说明书	1

[需自备的设备及试剂]

1、450±10nm 滤光片的酶标仪（建议仪器使用前提前预热）
2、单道或多道微量移液器及吸头
3、稀释样品的 EP 管
4、蒸馏水或去离子水
5、吸水纸
6、盛放洗液的容器
7、0.01mol/L（或 1×）磷酸缓冲盐 (PBS)，pH=7.0-7.2

[试剂盒的储存及有效期]

1、 未开封的试剂盒：未拆封的试剂盒可整盒保存于-20℃，如放置于 4℃仅能保存一个月。为方便实验，也可以也可以将试剂盒拆开保存，标准品、检测溶液 A、检测溶液 B 以及 96 孔板保存于-20℃，其余试剂置于 4℃。
2、 使用后的试剂盒：剩余试剂仍需按照试剂瓶标签所示的温度保存，此外，请将未使用酶标条用包含干燥剂的铝箔袋装好，并拉紧密封铝箔袋，置于-20℃ 保存。

注意：

试剂盒内酶标条可拆卸，按实验需求可分多次使用；使用后的剩余试剂盒建议在首次实验后 1 个月内使用完毕。产品过期时间以盒子上的标签为准，保质期内所有组分都确保是稳定的。

[标本的采集与保存]

1、 血清：将收集于血清分离管中的全血标本在室温放置 2 小时或 4℃过夜，然后 1,000×g 离心 20 分钟，取上清即可，将上清置于-20℃或-80℃保存，避免反复冻融。

2、 血浆：用 EDTA 或肝素作为抗凝剂采集标本，并将标本在采集后的 30 分钟内于 2-8℃ 1,000×g 离心 15 分钟，取上清即可检测，或将上清置于-20℃或-80℃保存，避免反复冻融。

3、 组织匀浆：不同类型的组织制备匀浆的方法会有所不同

1） 取适量组织块，在预冷 PBS（0.01mol/L， pH=7.0-7.2）中清洗去除血液，匀浆前先称重。

2） 将组织切成小块，均匀的放入放置在冰上的装有新鲜裂解缓冲液(货号 IS007，应依据目标蛋白的亚细胞定位选择不同类型的缓冲液)的玻璃均质器中（微小的组织也要如此）。（质量体积比=1:20-1:50，例如：1mL 裂解缓冲液中加入 20-50mg 组织样本。）

3） 将得到的悬浊液经过超声处理至澄清。

4） 将制备好的匀浆液 10,000×g 离心 5 分钟，弃沉淀，上清即可用于检测或置于-20℃下保存。

4、细胞裂解液：在分析试验之前，细胞需利用以下方法处理：

1）贴壁细胞应该用冷 PBS 轻轻清洗，然后用胰蛋白酶消化，于 1,000×g 离心 5 分钟后收集。（悬浮细胞可通过离心直接收集）。

2）将收集到的细胞用冷 PBS 洗 3 次；

3）将细胞用新鲜裂解缓冲液重悬至密度为 10^7 个细胞/毫升，如果需要，细胞可以进行超声波处理至溶液澄清。

4）将标本于 2-8℃ 1,500×g 离心 10 分钟，弃沉淀，上清即可用于检测或置于-20℃下保存。

5、 细胞培养上清或其它生物标本：请 1,000×g 离心 20 分钟，取上清即可检测，或将上清置于-20℃或-80℃保存，避免反复冻融。

注意：

1、 以上标本均需密封保存，4℃保存小于 1 周，-20℃不超过 1 个月，-80℃不超过 2 个月。

2、 标本出现溶血会影响最后检测结果，因此溶血标本不宜进行此项检测。

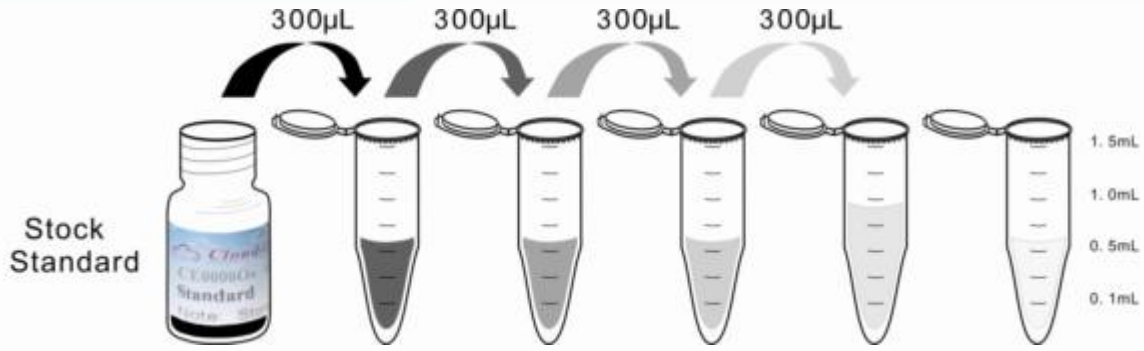
3、 标本使用前应缓慢均衡至室温，不应加热使之融解。

4、 基于大量检测数据，我们推荐使用血清而不是血浆作为样本进行检测。

[试剂准备]

1、 使用前将所有的试剂和标本缓慢均衡至室温（18-25℃），如果该试剂盒在一段时间内不能使用，请仅取出本次试验所需的酶标条和试剂，并将剩余的酶标条及试剂按指定的条件保存。

2、 **标准品**（冻干品）：每瓶标准品加入**标准品稀释液** 0.5mL，盖好后室温静置大约 10 分钟，同时轻轻摇动（避免起泡），其浓度为 5,000ng/mL。准备 5 个稀释标准品的 EP 管，每个 EP 管中加入 600μL 的**标准品稀释液**，如图所示依次三倍稀释成 5,000ng/mL，1,666.7ng/mL，555.6ng/mL，185.2ng/mL，61.7ng/mL，标准品稀释液(0ng/mL)直接作为空白孔。**为保证实验结果有效性，每次实验请使用新的标准品溶液。**



Tube	1	2	3	4	5	6
ng/mL	5,000	1,666.7	555.6	185.2	61.7	0

3、 **检测溶液 A 及检测溶液 B**：Detection A 及 Detection B 在使用前请手甩几下或少时离心处理，以使管壁或瓶盖的液体沉积到管底。临用前分别以**检测稀释液 A 或 B** 1:100 稀释(如：10μL 检测溶液 A/990μL 检测稀释液 A)，充分混匀，稀释前根据预先计算好的每次实验所需的总量配制(50μL/孔)，实际配制时应多配制 0.1-0.2mL。

4、 **浓洗涤液**：用 580mL 蒸馏水或去离子水将 20mL 浓洗涤液稀释至 600mL，进行 30 倍稀释。

5、 **底物溶液**：请用灭菌的移液器吸头吸取所需体积的 TMB 至另一干净容器中使用，容器中剩余的底物应予丢弃，不要倒回 TMB 瓶中。

注意：

1、 标准品的稀释不能直接在板中进行。

2、 **标准品**请于临用前 15 分钟内配制。**该标准品只能使用一次。**

3、 **标准品、检测溶液 A 工作液、检测溶液 B 工作液**请使用相应的稀释液配制，不能混淆。混匀时要轻轻充分混匀，避免起泡。为保证实验结果的准确请使用微量吸管，并校准微量加液器。请依据所需的量精确配制，尽量不要微量配制（如吸取**检测溶液 A** 时，一次不要小于 10μL），以避免造成浓度误差。

4、 请勿重复使用已经稀释过的**标准品、检测溶液 A 工作液**和**检测溶液 B 工作液**。

5、 **浓洗涤液**中如有结晶析出，请先温育至室温，轻轻混匀，至到结晶完全溶解再进行配制。

6、 试剂盒中部分试剂为储存液，客户需配置成工作液后使用，在配置过程中如因纯净水质量差或水质污染，以及实验中所用耗材洁净度差，可能造成实验结果不准确，甚至完全错误，请使用双蒸水。

[标本处理]

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。**

2、 实验前应先预测样本中待测物浓度。当浓度不在标准曲线的范围内时，用户必须确定其特定实验的最佳样品稀释倍数。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。样本稀释需用 PBS。

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、 若样本为细胞培养上清，因该类样本干扰因素 较多，如：细胞状态、细胞数量、采样时间等，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、 建议使用新鲜样本，保存时间过长可能会存在蛋白降解或变性导致实验结果偏差。

[操作步骤]

1、 加样：分别设标准孔、待测样品孔、空白孔。设标准孔 5 孔，依次加入 50μL 不同浓度的标准品（见试剂准备 2）。空白孔加 50μL 标准品稀释液（见试剂准备第二步最后一管），余孔加待测样品 50μL，然后立即每孔加检测溶液 A 工作液 50μL，轻轻振动，混匀，注意不要有气泡，酶标板加上覆膜，37℃ 温育 1 小时。

2、 弃去孔内液体，每孔用 350μL 的洗涤液洗涤，浸泡 1-2 分钟，在吸水纸上轻拍酶标板来移除孔内所有液体。重复洗板 3 次。最后一次洗涤后，吸取或倒出剩余的洗涤缓冲液，将酶标板倒扣在吸水纸上，将残留在孔内的液体全部吸干。此过程也可采用喷射瓶，多道移液器 或自动洗板机来完成。

3、 每孔加**检测溶液 B 工作液**（临用前配制）100μL，加上覆膜，37℃ 温育 30 分钟。

4、 弃去孔内液体，甩干，洗板 5 次，方法同步骤 2。

5、 每孔加**底物溶液** 90μL，酶标板加上覆膜，37℃ **避光显色**（反应时间控制在 10-20 分钟，不要超过 30 分钟。当标准孔的后面 3 孔有明显的梯度蓝色，前 3 孔梯度不明显时，即可终止）。

6、 每孔加**终止溶液** 50μL，终止反应，此时蓝色立转黄色。终止液的加入顺序应尽量与底物溶液的加入顺序相同。如出现颜色不匀一，请轻轻晃动酶标板以使溶液混合均匀。

7、 在确保酶标板底无水滴及孔内无气泡后，立即用酶标仪在 450nm 波长测量各孔的光密度（O.D.值）。

注意：

1、 **试剂准备：**准备一次实验所需要的酶标条，其它的可从微孔板上拆下，密封，按照说明书要求保存，以备下次使用。

2、 **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时间间隔如果太大，将会导致不同的“预温育”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。推荐设置复孔进行实验。

3、 **温育：**为防止样品蒸发，实验时请将加上盖或覆膜的酶标板置于湿盒内，以避免液体蒸发，洗板后应尽快进行下步操作，任何时侯都应避免酶标板处于干燥状态，同时应严格遵守给定的温育时间和温度。

4、 **洗涤：**充分的洗涤非常重要，在每次洗涤过程中，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。如果有自动洗板机，应在熟练使用后再用到正式实 验过程中。

5、 **反应时间的控制：**加入底物后请定时观察反应孔的颜色变化（比如，每隔 10 分钟观察一次），如颜色较深，请提前加入终止液终止反应，避免反应过强从而影响酶标仪光密度读数。

6、 **底物：**底物请避光保存，在储存和温育时避免强光直接照射。

7、 如果实验室内湿度低于 60%，推荐使用加湿器提高湿度水平。

[实验原理]

本试剂盒应用竞争抑制酶联免疫分析法测定标本中待测物质水平。将羟脯氨酸抗体包被微孔板，制成固相载体，往包被抗体的微孔中同时加入生物素标记的抗原和待测抗原（标准品或样本），待测抗原与生物素标记抗原对特异性抗体进行竞争结合。温育后经洗涤去掉未结合物，然后加入 HRP 标记的亲和素，经过温育和彻底洗涤后加入底物 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。待测标本浓度越高，标记抗原和抗体的结合就越受到抑制，显色愈浅。显色的深浅与酶量呈正相关，而与样品中待测物质含量呈负相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度（O.D.值），计算样品浓度。

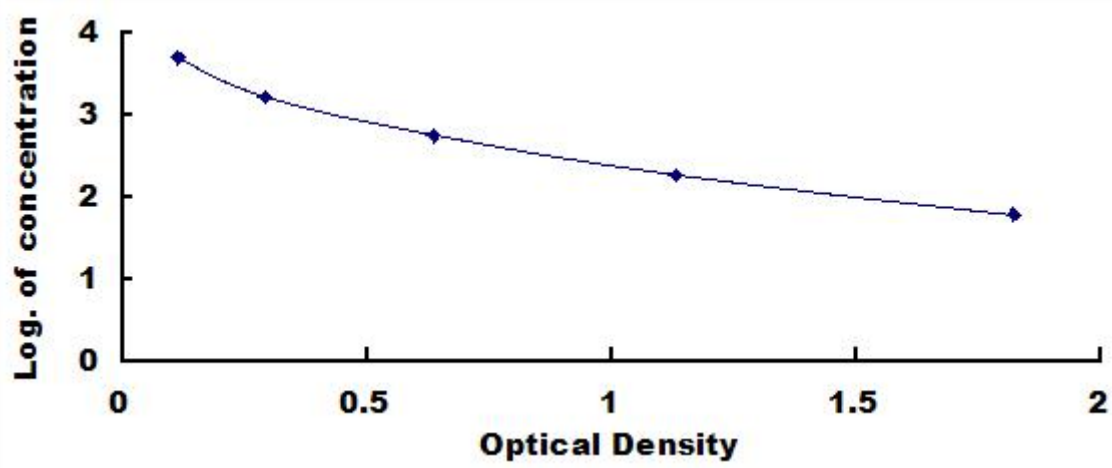
[计算]

本试剂盒应用竞争抑制酶联免疫分析法，所以样本中羟脯氨酸的含量与其显色呈负相关，羟脯氨酸的含量越高，显色越浅，含量越低，显色越深。

用标准品及样本 O.D.值作图（五点图），如设置复孔，则应取其平均值计算。以标准品的浓度为纵坐标（对数坐标），O.D.值为横坐标，绘出标准曲线，并计算出标准曲线的回归方程式（最佳方程式应依回归方程计算的 R2 值来定，以 R2 值越趋近于 1 为好），将样品的 O.D.值代入方程式，计算出样品浓度，再乘以稀释倍数，即为样品的实际浓度。

[典型数据]

为了便于计算，尽管浓度为自变量而 O.D.值为因变量，我们绘图时仍采用标准品的 O.D.值作为横坐标（X 轴），取标准品浓度的对数为纵坐标（Y 轴）。由于实验操作条件的不同（如操作者、移液技术、洗板技术和温度条件等），标准曲线的 O.D.值会有所差异。所提供的标准曲线仅供参考，实验者需要根据自己的实验建立标准曲线。



羟脯氨酸(Hyp)检测试剂盒标准曲线

[检测范围]

61.7ng/mL-5,000ng/mL

[最低检测限]

28.5ng/mL

此值为 20 个空白样品（即标准品稀释液）测定的平均值减二倍标准差所对应的浓度。

[特异性]

本试剂盒用于检测羟脯氨酸，经检测与其它相似物质无明显交叉反应。

由于受到技术及样本来源的限制，不可能完成对所有相关或相似物质交叉反应检测，因此本试剂盒有可能与未经检测的其它物质有交叉反应。

[回收率]

分别于定值血清及血浆样本中加入一定量的羟脯氨酸（加标样品），重复测定并计算其均值，回收率为测定值与理论值的比率。

样本	回收率范围（%）	平均回收率（%）
血清（n=5）	78-90	85
EDTA 血浆（n=5）	85-96	90
肝素血浆（n=5）	92-105	101

[线性]

在定值血清及血浆样本内加入适量的羟脯氨酸，并倍比稀释成 1:2，1:4，1:8，1:16 的待测样本，线性范围即为稀释后样本中羟脯氨酸含量的测定值与理论值的比率。

样本	1：2	1：4	1：8	1：16
血清（n=5）	80-91%	93-105%	83-95%	90-104%
EDTA 血浆（n=5）	78-94%	82-97%	91-103%	78-99%
肝素血浆（n=5）	89-102%	80-99%	79-92%	87-101%

[精密度]

精密度用样品测定值的变异系数 CV 表示。CV（%） = SD/mean×100

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，每个样本使用同一试剂盒重复测定 8 次，分别计算不同浓度样本的平均值及 SD 值。

批内差： CV<10%

批间差： CV<12%

[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、湿度及温育条件。其次由同一实验员来进行操作可减少人为误差。

[实验流程]

1、实验前标准品、试剂及样本的准备；

2、加样（标准品及样本）50μL后，立即加入检测溶液A50μL，37℃孵育1小时；

3、甩干，洗板3次；

4、加检测溶液B100μL，37℃孵育30分钟；

5、洗板5次；

6、加TMB底物90μL，37℃孵育10－20分钟；

7、加终止液50μL，立即450nm读数。

[说明]

1、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。

2、 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，请务必准备充足的标本备份。

3、 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进行实验操作，网站电子版说明书仅作参考。

4、 本试剂盒配套试剂必须配套使用，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。

5、 在储存及温育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，因为蛋白水解酶的干扰将导致测值不准确。

6、 刚开启的酶联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。

7、 由于操作者不熟练、操作失误或错误选用读数仪程序等都有可能导致错误结果的产生。检测使用的微孔板读数仪需要能检测450 ± 10nm的波长，光密度范围在0-3之间。实验前请仔细阅读说明书并调试仪器。

8、 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。

9、 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。

10、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物的产品做对比，所以不排除检测结果不一致的情况。

11、用于制备试剂盒中抗体的免疫原通常为重组蛋白，但由于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，通常我们也不建议使用试剂盒检测重组蛋白。

12、请预估样品中待测物的浓度，或者设计预实验确定样品检测浓度。这样的处理可以防止样本中待检物含量超出试剂盒检测范围。

13、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。

14、本操作说明同样适用于 48T 试剂盒。

15、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。

[警告]

本试剂盒中使用了稀硫酸作为终止液，其具有轻微腐蚀性，使用时应避免接触衣物或眼、手等皮肤暴露部位。

[问题解答]

问题	可能原因	解决方案
标准曲线差	标准品准备不正确	进行正确的标准品梯度稀释
	吸取及洗涤不充分	充分的吸取及洗涤
	移液不精确	检查和校正移液器
精密度低	洗涤不充分	按说明书要求充分洗涤和浸泡
	混匀不充分和吸取试剂不足	充分混匀和吸取试剂
	重复利用吸头、容器和覆膜	使用加样器要更换新的吸头、使用新的容器和覆膜
	加样不精确	检查和校正移液器
O.D 值低	每孔加的试剂量不精确	校正移液器，精确加入试剂
	温育时间不正确	保证充足的温育时间
	温育温度不正确	试剂要平衡至室温并保证准确的温育温度
	酶标记物或底物失效	通过混合酶标记物和底物，颜色应迅速显现来检查
	没有加入终止液	按照说明书实验操作步骤加入终止液
	超出读数时间读数	在说明书推荐的读数时间内读数
样本值	不正确的样本储存方式	正确储存样本，使用新鲜样本进行实验
	不正确的样本收集和处理方法	采取正确的样本收集和处理方法
	待测物质在样本中含量低	使用新鲜样本，重复实验