

重组胰蛋白酶检测试剂盒使用说明书

使用前请仔细阅读说明书和提示部分。若有任何问题，请联系我们。

目的：本试剂盒用于测定重组蛋白药物或融合表达工艺中使用胰蛋白酶酶切，以及蛋白组学研究中使用胰蛋白酶的样本中重组胰蛋白酶或猪源胰蛋白酶的微量残留量检测。

实验原理：

本试剂盒应用双抗体夹心酶联免疫吸附检测技术测定样品中胰蛋白酶的微量残留。原理：用捕获抗体包被96孔酶标板，制成固相抗体，往酶标板中加入标准品和检测样品，与检测抗体桥联结合，再加入辣根过氧化物酶标记物，经过洗涤后加底物TMB显色。TMB在HRP的催化下转化成蓝色，并在酸的作用下转化成最终的黄色。在450nm波长下测定吸光度（OD值），通过标准曲线计算待测样品中胰蛋白酶的残留量。

试剂盒组成：

试剂盒组成	96孔板配置	保存
说明书	1份	常温
酶标板	1×96孔	常温
标准品	10μg/支×1支	-15℃以下保存
捕获抗体	25μg/支×1支	-15℃以下保存
检测抗体	15μl/支×1支	-15℃以下保存
酶联标记物	5μl/支×1支	-15℃以下保存
BSA	1.0g×1瓶	2-8℃保存
显色剂A液	6ml×1瓶	2-8℃避光保存
显色剂B液	6ml×1瓶	2-8℃避光保存
终止液	6ml×1瓶	常温保存

备注：打开试剂盒后，按试剂盒说明书将试剂保存在相应条件，使用前请仔细阅读说明书。

溶液的配制

- 10×PBS 缓冲液配制：称取 NaCl 80g、KCl 2g、KH₂PO₄ 2.4g、Na₂HPO₄ 14.4g，加纯化水约 900ml 溶解，用纯化水定容到 1.0L，作为贮备液；使用前根据实际所需量，用纯化水稀释 10 倍即为 1×PBS 溶解。
- 洗涤液（PBST）的配制：移取 10×PBS 缓冲溶液 100ml，加纯化水定容至 1L，再加入 0.5ml 吐温-20 混合均匀即得，或根据实际所需量配制。
- 封闭液（2%BSA）的配制：称取 0.2g BSA 用 10ml 1×PBS 溶解混合均匀即得，或根据实际使用量配制。
- 样品稀释液（1%BSA）的配制：称取 0.1g BSA 用 10ml 1×PBS 溶解，或根据实际使用量配制。
- 包被液：准确称取碳酸钠 0.32g、碳酸氢钠 0.586g，加水溶解并稀释至 200ml。保存于 2-8℃冰箱，保质期 2 周。

实验所用试剂的配制

- 1、取出试剂盒中的捕获抗体，加入 250μl 纯化水复溶为 100μg/ml 溶液；然后用包被液稀释至 2 μg/ml。
- 2、标准品配制：取出试剂盒中的标准品，加入 100 μl 纯化水复溶为 100μg/ml 溶液，再用样品稀释液梯度稀释至 250 ng/ml、125 ng/ml、62.5 ng/ml、31.2 ng/ml、15.6 ng/ml、7.8 ng/ml、3.9 ng/ml、0。

- 3、待测样品：待测样品用相应溶剂稀释一定倍数，再用样品稀释液稀释至适合浓度。
- 4、检测抗体：根据使用量吸取检测抗体，用样品稀释液按 1:500 倍稀释。
- 5、酶联标记物：根据使用量吸取酶联标记物，用样品稀释液按 1:8000 倍稀释。

操作步骤:

- 1.包被：用包被液将稀释至 2 $\mu\text{g/ml}$ 的捕获抗体，按 100 μl /孔加至酶标板中，2~8 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。
- 2.洗板：洗涤液 300 μl /孔洗板，60s/次，重复 3 次，拍干酶标板；
- 3.封闭：加入 2%BSA 封闭液，250 μl /孔，37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温孵育 2h；
- 4.洗板：洗涤液 300 μl /孔洗板，60s/次，重复 3 次，拍干酶标板；
- 5.加样：按加样表 100 μl /孔加入标准品与待测样品（均需做复孔），尽量不触及孔壁，轻轻晃动混匀，37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温孵育 1 h。
- 6.洗板：洗涤液 300 μl /孔洗板，60s/次，重复 5 次，拍干酶标板；
- 7.加入检测抗体:将检测抗体按 50 μl /孔加入，37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温孵育 1 h。
- 8.洗板：洗涤液 300 μl /孔洗板，60s/次，重复 5 次，拍干酶标板；
- 9.加入酶联标记物：按 100 μl /孔.加入酶联标记物，37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温孵育 1h；
- 10.洗板：洗涤液 300 μl /孔洗板，60s/次，重复 5 次，拍干酶标板；
- 11.显色：每孔先加入显色剂 A 液 50 μl ，再加入显色剂 B 液 50 μl ，轻轻震荡使显色液混匀，室温避光显色 10 分钟；
- 12.终止：每孔加终止液 50 μl ，终止反应（此时蓝色立转黄色）；
- 13.测定：用酶标仪在 450nm/630nm 双波长下读取各孔的吸光值（OD 值），然后再扣除 630nm 背景值。测定应在加终止液后 15 分钟以内进行。

注意事项:

1. 将试剂盒从冷藏环境中取出并在室温下平衡20分钟后方可使用。
2. 标准品：复溶后100 $\mu\text{g/ml}$ 标准品，建议按每次使用量分装保存，避免反复冻融。
3. 捕获抗体：复溶后100 $\mu\text{g/ml}$ 捕获抗体，建议按每次使用量分装保存，避免反复冻融。
4. 加样：加样和加同一试剂时，第一孔与最后孔之间加样时间间隔过大将导致不同的“预温育”时间，从而明显的影响到测量值的准确性及重复性，每次的加样时间最好控制在5分钟以内，推荐设置复孔。如样品数量多，推荐使用排枪加样。
5. 请每次测定同时做标准曲线（复孔）。如果样本值高于标准曲线最高浓度，请用样品稀释液稀释样本（n倍）后再测定，计算时乘以总稀释倍数（ $\times n$ ）。
6. 温育：为防止样品蒸发，实验时必须给酶标板覆膜，膜可以是透明胶带或者锡箔纸等，洗板后应尽快进行下步操作，避免酶标板处于干燥状态。严格遵守给定的温育时间和温度。
7. 洗板：洗涤过程中反应孔中残留的洗涤液应在吸水纸或无尘干布上拍干，勿将滤纸直接放入反应孔中吸水。读数前要清除酶标板底部残留的液体和手指印，以免影响酶标仪读数。显色液请避光保存。
8. 试剂配制：试剂盒在运输过程中会使液体沾到管壁或瓶盖，因此使用1000转/分离心一分钟，以使附着管壁或瓶盖的液体沉积到管底。取用前请用移液器小心吹打4~5次使溶液混匀。所有试剂请按说明书指示请精确配制。
9. 显色：样本数量较多，建议排枪加入显色A液和B液。请定时观察反应孔的颜色变化（比如每隔五分钟），如梯度已经很明显，也可提前加终止液终止反应，以避免颜色过深，影响酶标仪读数。

提示：试剂盒的试剂不能与其他批次的试剂或其他来源的试剂混合使用。

问题分析:

若实验结果有问题，请及时对显色结果拍照，并妥善保存未使用板条及试剂，然后联系技术支持。也可参考以下信息以找出原因。

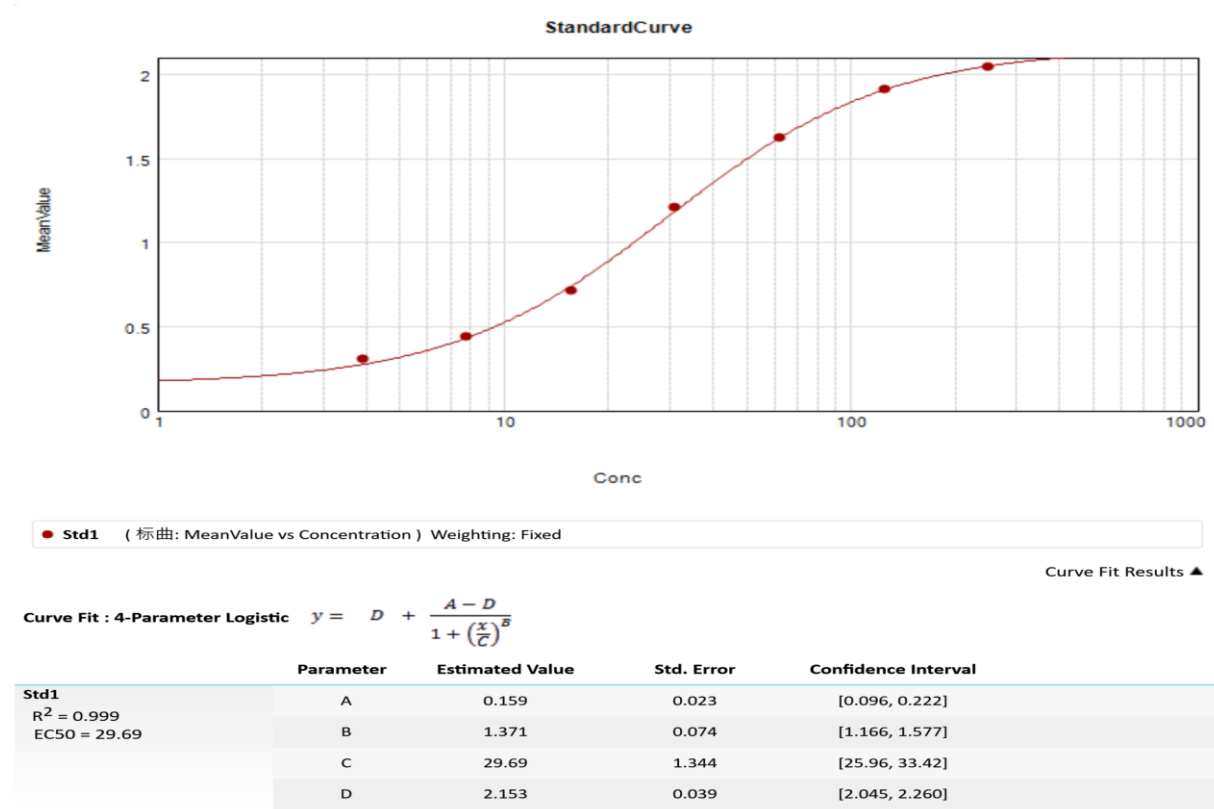
问题	可能原因	相应对策
显色很弱 或者无色	温育时间太短	保证充足的温育时间
	包被不正确	检查包被液和捕获抗体是否使用正确

	标准品稀释不正确	溶解标准品时，注意使粉末完全溶解
	捕获抗体稀释不正确	双人检查稀释过程，确保稀释浓度正确
标准曲线 梯度差	吸液或者加液不准	检查移液枪和吸头
	标准品稀释不正确	溶解标准品时，注意使粉末完全溶解
	酶标板洗涤不完全	保证洗涤时间和洗涤次数及每孔的加液量
背景值高	检测抗体或者酶联标记物的浓度过高	使用推荐的稀释倍数
	酶标板洗涤不完全	按照说明书，保证每步清洗完全；若用洗板机，请检查所有出口是否有堵塞
	洗液被污染了	重新配置新鲜的洗涤液

计算:

以 OD 值为横坐标 (X)，标准物的浓度为纵坐标(Y)，分别带入对数函数，通过使用能够生成四参数逻辑 (4-PL) 的计算机软件制作标准曲线，根据样品的 OD 值由标准曲线查出相应的浓度；再乘以稀释倍数；或用标准物的浓度与 OD 值计算出标准曲线的直线回归方程式，将样品的 OD 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。实例：(仅供参考)

浓度(ng/mL)	250	125	62.5	31.2	15.6	7.8	3.9	0
OD 均值	2.048	1.910	1.623	1.209	0.713	0.437	0.308	0.140



试剂盒性能: 1.样品线性回归与预期浓度相关系数R值为0.99以上。

2.批内变异系数与批间变异系数应分别小于20%和25%。

检测范围: 3.9ng /ml~250ng /ml

试剂盒效期: 有效期: 12个月。

试剂盒操作流程

