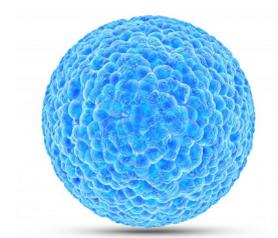




# 重组胰蛋白酶检测试剂盒

## Recombinant Trypsin Detection Kit



## 重组胰蛋白酶试剂盒

### 一、产品基本信息

产品名称	Applied Cell <sup>®</sup> 重组胰蛋白酶试剂盒
货号	AC-1001026
规格	96T
使用范围	本试剂盒用于体外定量检测待测样品中重组胰蛋白酶含量。
保质期	4个月

### 二、试剂盒基本参数

- 灵敏度:  $\leq 1$  ng/ml
- 检测范围: 0.078 - 40 ng/ml
- 特异性: 可检测重组胰蛋白酶, 与其它重组大肠菌表达系统相关蛋白无明显交叉反应。
- 重复性: 板内, 板间变异系数均  $< 10\%$ 。

### 三、产品内容及保存

试剂盒收到后按指定条件保存。

中文名称	规格	保存条件
标准品冻干粉	10ng/支×4 支	2-8°C
稀释液储液 (25 X) (标准品-样品-抗体稀释使用)	1 瓶×5 mL	2-8°C
清洗液储液 (25 X)	1 瓶×40 mL	2-8°C
底物稀释液 (TMB)	1 瓶×15 mL	2-8°C避光
终止液	1 瓶×5 mL	2-8°C

酶标板 (已包被) (96 孔)	8 孔×12 条	-20℃
HRP 抗体 (250X)	1 支×0.05mL	-20℃
显色底物	5 支×0.125 mL	-20℃避光
封板膜 (可重复使用)	5 张	室温

注意:

- ① 操作注意使用无菌耗材, 以免发生微生物污染, 导致结果偏差。
- ② 酶标板-20℃可存放 6 个月, 2-8℃存放勿超过一周。

#### 四、实验准备

##### 1. 试验所需自备物品

- 1.1. 酶标仪 (波长 450 nm 和 650nm)
- 1.2. 移液枪, EP 管及一次性吸头, 加样槽
- 1.3. 37℃恒温箱, 超纯水。
- 1.4. 洁净无纸屑的吸水纸或干布

##### 2. 待测样品注意事项

- 2.1. 样品准备好后需尽快检测, 如需延后检测, 建议样品分装, 并-20℃或-80℃保存, 不要反复冻融。
- 2.2. 试剂盒检测范围不等同于样本的浓度范围, 如果样品中检测物浓度高于标准品最高值, 请根据实际情况, 做适当倍数稀释后再测。
- 2.3. 本试剂盒不建议检测使用裂解液或其他化学试剂处理的样本, 因为化学试剂的引入会导致测量值出现偏差。

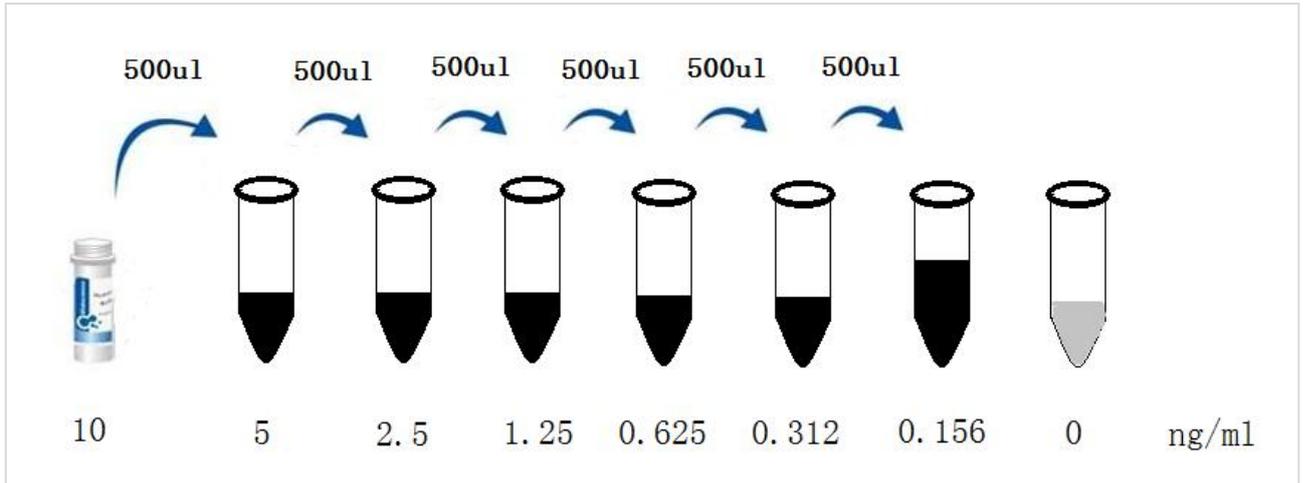
##### 3. 检测前准备工作

- 3.1. 室温平衡试剂盒 30 分钟, 观察溶液是否有结晶, 如果有结晶 37℃水浴加热使结晶完全溶解后再进行后续试剂配制。
- 3.2. 稀释液配制: 将稀释液储液用超纯水按比例稀释 (1: 25)。
- 3.3. 清洗液配制: 将清洗液储液用超纯水稀释 (1: 25), 清洗液应即配即用。

注意: 从冰箱中取出的浓缩清洗液可能有结晶, 37℃水浴加热使结晶完全溶解后再配制清洗液 (加热温度不要超过 40℃, 清洗液使用温度为室温)。

**标准品配制：**将标准品于 1500 rpm/min 离心 1 分钟，加入稀释液 1.0 mL 至标准品中，旋紧管盖，上下颠倒数次，使其充分溶解，用移液枪将其混匀（浓度为 10 ng/mL），然后进行梯度稀释，配制成以下浓度：10、5、2.5、1.25、0.625、0.3125、0.15625、0 ng/mL。

**梯度稀释过程：**取 7 只 EP 管，每管加入 500  $\mu$ L 稀释液，取 500  $\mu$ L 10 ng/mL 的标准品工作液，加入含有 500  $\mu$ L 稀释液的 EP 管中混匀，即为 5 ng/mL 标准品工作液，按此步骤往后依



次吸取混匀，如下图。最后一管为空白孔，不要加入标准品工作液。

### 3.4. HRP 抗体工作液配制

实验前请先将抗体管 1500 rpm/min 离心 1 分钟，以避免管壁及管盖上残留抗体。计算实验所需抗体用量（以 100  $\mu$ L/孔计算），为避免误差及中间损失，实际配制时应多配制 200  $\mu$ L 工作液。使用前 15 分钟，用稀释液将 HRP 抗体稀释成工作浓度（抗体：稀释液 = 1：250），即配即用。

### 3.5. 显色底物工作液配制

计算实验所需显色底物用量（以 100  $\mu$ L/孔计算），避免误差及中间损失，实际配制时应多配制 200  $\mu$ L 显色底物工作液。用稀释液将显色底物稀释为工作浓度（稀释液:底物: =20:1），避光保存，即配即用。

注意：配制显色底物工作液要避免污染。

## 4. 洗板方法

4.1. 自动洗板机：每孔加入清洗液 400  $\mu$ L（根据加满孔的标准进行调整），注入和吸出间隔 60 秒。

4.2. 手工洗板：吸掉孔内液体，倒置在吸水纸上空干，每孔加入 400 $\mu$ L 清洗液，浸泡 5 分钟，甩尽孔内液体，将板倒置，放在吸水纸上拍干。

## 5. 操作步骤

5.1. 依次将标准品工作液以及待测样本加入到酶标板中，每个浓度的工作液并列做 2 个复孔，每孔 100 $\mu$ L。若样本浓度高于检测范围，需用稀释液稀释后加样。将酶标板封膜，37 $^{\circ}$ C 孵育 60 分钟。

注意：加样时将样品加于酶标板底部，尽量不触及孔壁，轻轻晃动酶标板，以充分接触。中间过程避免产生气泡。加样时间应控制在 10 分钟内。

5.2. 清洗：吸掉孔内液体，倒置在吸水纸上空干。每孔加入 400 $\mu$ L 清洗液，浸泡 5 分钟，吸掉孔内液体，倒置在吸水纸上空干。重复此洗板步骤 3 次。

5.3. 每孔加入 HRP-抗体工作液 100 $\mu$ L，轻轻晃动酶标板混匀避免产生气泡，将酶标板封膜并置于 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。

5.4. 清洗：用清洗液洗板 3 次，方法同步骤 5.2。

注意：酶标板清洗不完全可能会造成标准曲线梯度差，或背景值高。清洗液体积要足量，同时确保所有的孔浸泡在清洗液中并浸泡 3 分钟。

5.5. 显色：每孔加显色底物工作液 100  $\mu$ L，酶标板覆膜置于 37 $^{\circ}$ C 孵育 10 分钟。

注意：为保证每孔反应一致性，推荐使用排枪和加样槽加显色底物，但应严格避免底物污染，确保所使用的加样槽洁净或一次性使用，加液时移液枪的枪头切不要接触孔内溶液以避免污染，影

X- 浓度 (ng/mL)	10	5	2.5	1.25	0.625	0.312	0.156	0
Y-OD <sub>450/650 nm</sub>	1.591	1.442	1.225	0.856	0.591	0.359	0.221	0.057
Y-OD <sub>450/650 nm</sub> (去本底)	1.574	1.397	1.174	0.815	0.567	0.325	0.187	0
回收量 (ng/mL)	10.167	4.822	2.628	1.182	0.657	0.306	0.153	—
回收率%	101.7	96.4	105.1	94.6	105.1	98.1	98.1	—

响实验结果。可通过观察加样槽中底物是否变蓝预判底物是否被污染。根据实际显色情况酌情缩短或延长，显色时间在 5-30 分钟范围内。

终止：每孔加终止液 50  $\mu$ L，终止反应，室温放置 1 分钟。推荐使用排枪和加样槽。

注意：终止液的加入顺序应尽量与底物溶液的加入顺序相同。加液时移液枪的枪头切不要接触孔内溶液以避免污染，影响实验结果。

5.6. 读数：用酶标仪在 450 nm 波长（参考波长 650nm）测量各孔的光密度值（OD450/650 nm 值）。

提示：请提前 15 分钟打开酶标仪电源，预热仪器，设置检测程序。

## 6. 结果判断

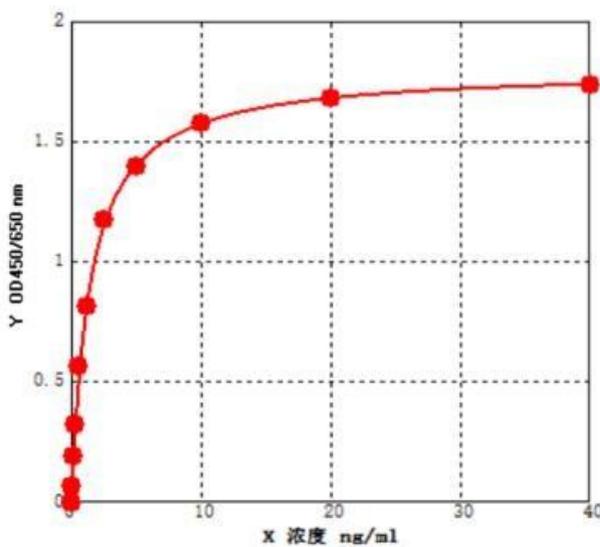
6.1. 计算每组复孔的平均 OD 值。每个标准品的平均 OD 值减去空白孔的 OD 值作为矫正值。以标准品的浓度为横坐标 (X)，OD 值为纵坐标 (Y)，绘出标准曲线（作图时亦可去掉空白组的值）。

6.2. 数据处理推荐使用酶标仪自带软件，或使用专业的曲线制作软件，如 ELISA Cal。数据处理如有疑问可与本公司技术沟通，可指导完成。

6.3. 若样品 OD 值高于标准曲线上限，应适当稀释后重测。

### 6.4. 典型数据

由于实验操作条件的不同（如操作者、移液技术、洗板技术和稳定条件等），标准曲线的 OD 值会有所差异。以下数据和曲线仅供参考实验者需根据自己的实验建立标准曲线。



五参数 Logistic 曲线拟合

$$\text{方程: } y = (A - D) / [1 + (x / C)^B] + D$$

A = 1.79982

B = -0.98196

C = 1.30294

D = -0.00664

N = 1.05003

R<sup>2</sup> = 0.99943

## 7. 注意事项

7.1. 储存条件：试剂盒中试剂请按说明书提示合理存放。所有试剂应避光保存，同时避免蒸发和微生物污染。

7.2. 酶标板：刚开启的酶标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。

7.3. 加样：加样时间过长将导致不同孔反应时间不同，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 10 分钟以内，推荐设置复孔。

7.4. 温育：为防止样品蒸发，实验时必须给酶标板覆膜，洗板后应尽快进行下一步操作，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。

- 7.5. 洗板：清洗过程中反应孔中残留的清洗液应在吸水纸或干布上拍干，不要将滤纸直接放入反应孔中吸水。读数前要擦净酶标板底部残留的液体和手指印，以免影响酶标仪读数。
- 7.6. 试剂配制：试剂盒使用前相关试剂需要 1500rpm/min 离心 1 分钟，以防试剂粘壁造成损失。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。
- 7.7. 显色时间的控制：加入底物后，请定时观察反应孔的颜色变化（比如每隔五分钟），如梯度已经很明显，请提前加终止液终止反应，以避免颜色过深，影响酶标仪读数。
- 7.8. 底物：保存及使用请避光。
- 7.9. 混匀：充分轻微混匀对反应结果尤为重要，最好使用微量振荡器，使用最低频率，如无微量振荡器，可以在反应前手工轻轻敲击酶标板框混匀。**关于样品回收率**（说明书回收率数据是试剂盒本身的质控数据，用以验证试剂盒的准确度，客户购买试剂盒后直接使用即可，如需进行补充回收率实验，可跟技术沟通）
- 7.10. 本试剂盒通过与蛋白酶进行抗原抗体反应进行测定样本中蛋白酶残留。
- 7.11. 不同计量方法以及产品纯度的差别可以导致不同来源、不同批次产品中胰蛋白酶的蛋白含量不完全一致，也会造成回收率的差异。
- 7.12. 为避免上述因素影响，建议将用作回收率测试的样品采用分光光度法（A280nm）估算蛋白含量，再稀释至适合的浓度用于回收率测试，尽量减少回收率的误差。

## 8. 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。

问题描述	可能原因	相应对策
标准曲线梯度差	吸液或加液不准	检查移液器和吸头
	标准品稀释不正确	溶解标准品时稍微旋转瓶身，轻轻混匀使粉末完全溶解
	酶标板清洗不完全	保证清洗时间和清洗次数及每孔的加液量
显色很弱或无色	孵育时间不足	增加孵育时间
	孵育温度不稳定	在推荐温度下反应
	试剂体积不够或漏加	检查吸液及加液过程，保证所有试剂按顺序足量添加
	稀释不正确	
读书数值低	酶标仪设置不正确	在酶标仪上检查波长和滤光片装置

		提前打开酶标仪预热
变异系数大	加热不正确	检查加液情况
背景值高	检测抗体的工作浓度过高	使用推荐的稀释倍数
	酶标板清洗不完全	要使用试剂盒标配清洗液，保证清洗液量，同时保证清洗次数以及清洗时间，请检查所有的出口是否有堵塞；
	清洗液过期或污染	清洗液要即配即用，且保证不能污染
灵敏度低	试剂盒保存不当	按说明书要求保存相关试剂
	读数前未终止	OD 读数前应在每孔中加入终止液

生产企业:

上海埃泽思生物科技有限公司

地址：上海市宝山区园丰路 69 号联东粤浦科技园 1 号楼 401 室

埃泽思（福建）生物科技有限公司

地址：福建省福州市长乐区金滨路 458 号福建省精准医学产业创新中心

邮箱：service@appliedcell.cn

电话：021-59541913

网址：www.appliedcell.cn

ISO9001 质量体系认证企业

医疗器械生产备案企业，

欧盟 CE 认证企业

文件版本号：

B202201