大鼠补体片段 4d(C4d)
ELISA 检测试剂盒

使用说明书

产品货号：BP02511

注意：请在试剂盒保质期内使用，具体保质期见外包装标签。

本产品仅供科学研究使用，不能用于临床诊断。

产品性能：

检测范围：0.75-48ng/mL

灵敏度：0.32ng/mL

特异性：可检测样品中的大鼠 C4d，且与其它类似物无明显交叉反应

重复性：板内，板间变异系数均<10%

检测原理：

本试剂盒采用“双抗体夹心法”:将大鼠补体片段 4d(C4d)捕获抗体包被于酶标板上，捕获样品及标准品中的靶标，加入生物素标记的抗体与靶标结合，然后再加入酶结合物与生物素标记抗体结合，形成免疫复合物，加入 TMB 显色液后，若反应孔中有靶标则显蓝色，加入终止液变黄色，检测过程中游离的成分均被洗去，用酶标仪在 450 nm 处测 OD 值，颜色的深浅和样品中的大鼠补体片段 4d(C4d)呈正比，通过绘制标准曲线计算出标本中 C4d 的浓度。

注意事项：

1. 本产品仅供科学研究使用，不能用于临床诊断，如果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. 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。
3. 为了实验结果的准确性，请仅使用我们提供的试剂，并且不要混用不同批次的试剂。
4. 不同厂家的试剂盒或通过其他方法检测相同的指标结果可能有差异。
5. 若所检样品不在说明书所列样品之中，建议做预实验验证其检测有效性。
6. 若使用化学裂解液制备组织匀浆或细胞提取液，由于引入某些化学物质会导致 ELISA 测值出现偏差。
7. 某些重组蛋白可能与试剂盒中捕获或检测抗体不匹配而出现不能检测的情况。
8. 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。

试剂盒组分：

未拆封试剂盒在 2-8℃可保存 6 个月

名 称	规格（48T）	规格（96T）
预包被酶标板	8 孔×6 条	8 孔×12 条
标准品	1 支	2 支
标准品&样品稀释液	10mL	15mL
生物素标记抗体	1 支（100×）	1 支（100×）
生物素标记抗体稀释液	10mL	15mL
酶结合物	1 支（100×）	1 支（100×）
酶结合物稀释液	10mL	15mL
TMB 显色液 A	3mL	6mL
TMB 显色液 B	3mL	6mL
终止液	3mL	6mL
20×浓缩洗涤液	10mL	10mL×2
封板胶纸	2 张	4 张
产品说明书	1 份	1 份

实验所需自备试验器材：

1. 酶标仪（可测量 450nm 检测波长的吸收值）

2. 高精度加液器及一次性吸头

3. 蒸馏水或去离子水

4. 37℃恒温箱

5. 多通道洗板器或自动洗板机

样品稀释方案：

由于样品存在个体差异，请提前预估样品的浓度范围，并通过预实验确定待检样品的稀释倍数。如果您的样品需要稀释，通用稀释方案参考如下：

稀释 100 倍：一步稀释。取 5μL 样品到 495μL 标准品&样品稀释液内，做 100 倍稀释；

稀释 1000 倍：两步稀释。取 5μL 样品到 95μL 标准品&样品稀释液内，做 20 倍稀释，再取 5μL 20 倍稀释样品到 245μL 标准品&样品稀释液内，做 50 倍稀释，总共稀释 1000 倍；

每步稀释时取液量不少于 3μL，稀释倍数不超过 100 倍。每步稀释都需混合均匀，避免起泡。

样品处理及保存：

样品收集后若在 1 周内进行检测可保存于 2-8℃，若不能及时检测，请按一次使用量分装，冻存于-20℃(1 个月内检测)，或-80℃(3 个月内检测)，避免反复冻融。在检测前，冷冻过的样品应缓慢地融化并离心除去冻融过程产生的沉淀物。室温混匀后使用。

1. **血清：**使用血清分离管收集样品，样品在室温下放置 30 分钟，然后以 1000×g 离心 15 分钟。立即取出血清并进行检测，或将样品分装并保存在-20℃以下，避免反复冻融。
2. **血浆：**使用 EDTA 或肝素作为抗凝血剂收集血浆。在收集后的 30 分钟内，以 2-8℃ 1000×g 离心 15 分钟。立即取出血浆并进行检测，或将样品分装并保存在-20℃以下，避免反复冻融。
3. **组织匀浆：**用预冷的 PBS(0.01M, pH=7.4)冲洗以去除残留血液。称重后剪碎组织，按 1:9（w/v）比例加入 PBS（推荐提前加入蛋白酶抑制剂），放入玻璃匀浆器中冰上研磨。为提高裂解效率，可超声破碎或反复冻融。最后，将匀浆液于 5000×g 离心 5-10 分钟，立即取出上清并进行检测，或将样品分装并保存在-20℃以下，避免反复冻融。
4. **细胞培养物上清：**1000×g 离心 20 分钟以去除颗粒，立即取出上清并进行检测，或将样品分装并保存在-20℃以下，避免反复冻融。
5. **细胞裂解液：**贴壁细胞经预冷 PBS 清洗后，胰蛋白酶消化并 1000×g 离心 5 分钟收集；悬浮细胞直接离心收集。收集的细胞用预冷 PBS 清洗 3

次，每 1×10^6 个细胞加 150-200 μL PBS（推荐提前加入蛋白酶抑制剂）重悬，反复冻融或超声细胞破碎。最后，2-8℃ 1500×g 离心 10 分钟，取上清检测。

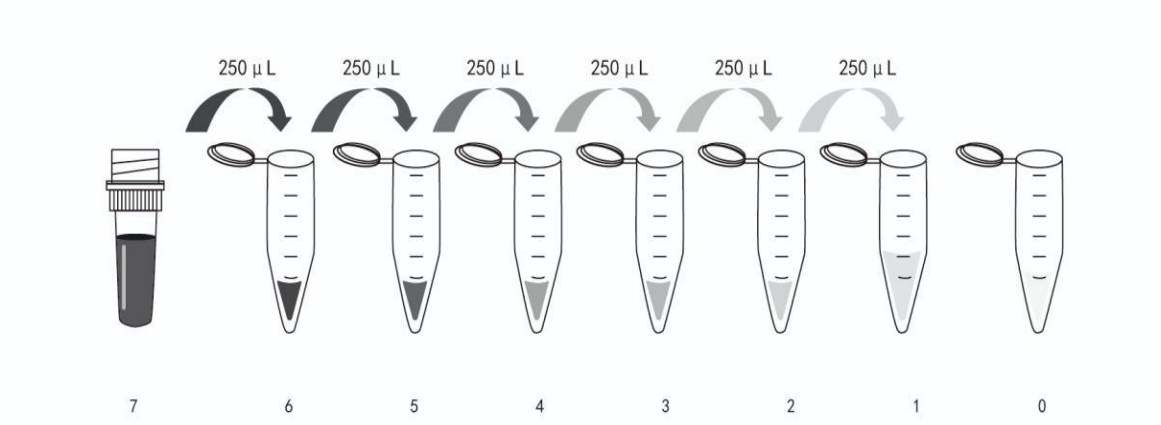
6. **其它生物样品：**1000×g 离心 20 分钟，取上清即可检测。

检测前试剂准备：

1. 提前 20 分钟从冰箱中取出试剂盒，平衡至室温。如果试剂盒需分多次使用，请仅取出本次实验所需的酶标板条和试剂，剩余板条和试剂需按照指定条件保存。读数前 15 分钟打开酶标仪预热。

2. 洗涤液配制：用蒸馏水 1:20 稀释（例：1mL 浓缩洗涤液加入 19mL 的蒸馏水）。从冰箱中取出的浓缩洗涤液可能有结晶，属于正常现象，可用 40℃水浴，稍微加热使结晶完全溶解后再配制洗涤液。当日使用。

3. 标准品配制：试剂盒中取出标准品，加入 1mL 标准品&样品稀释液溶解，盖好后室温静置大约 10 分钟。取 7 个 1.5mL 离心管，分别标注 S6, S5, S4, S3, S2, S1, S0 后每管各加入 250 μL 标准品&样品稀释液。从 S7 中吸取 250 μL 标准品到第一个离心管 S6 中，轻轻吹打混匀。从 S6 中吸取 250 μL 到第二个 EP 管中(S5)，轻轻吹打混匀。依次倍比稀释浓度为 48 ng/mL，24 ng/mL，12 ng/mL，6 ng/mL，3 ng/mL，1.5 ng/mL，0.75 ng/mL。以此类推进行标准品的倍比稀释。S0 为标准品&样品稀释液(0ng/mL)。



4. 生物素标记抗体工作液配制：使用前 20 分钟，以生物素标记抗体稀释液将 100×浓缩生物素标记抗体稀释成 1×工作浓度(例如：10μL 浓缩液+990μL 稀释液)。根据所需用量配制，当日使用，剩余弃之。

5. 酶结合物工作液配制：使用前 20 分钟，以酶结合物稀释液将 100×浓缩酶结合物稀释成 1×工作浓度(例如：10μL 浓缩液+990μL 稀释液)。根据所需用量配制，当日使用，剩余弃之。

6. TMB 显色液的配制：使用前 10 分钟，将 TMB 显色液 A 液和 B 液 1：1 混合，避光放置备用。

操作步骤：

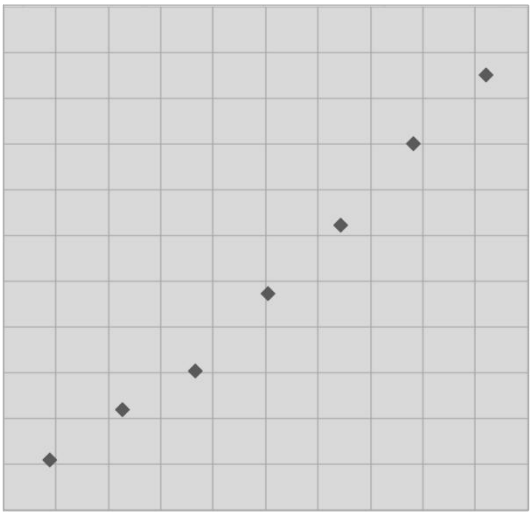
1. 加样：分别将样品或不同浓度标准品按照 100μL 每孔加入相应孔中，空白孔加入 100μL 标准品&样品稀释液。盖上封板膜后 37℃温育 60 分钟。（**建议：将待测样品用标准品&样品稀释液最低稀释 1 倍后再加入酶标板内测试。从而减少基质效应对测试结果的影响，最后计算样品浓度时需乘以对应的稀释倍数**。）
2. 弃液：弃去液体，甩干，不用洗涤。
3. 加生物素标记抗体：每孔加入 100μL 生物素标记抗体工作液，混匀盖上封板膜后置 37℃温育 60 分钟。
4. 洗板：弃去液体，用 1×洗涤液将反应板充分洗涤 4-6 次，每孔加入 300μL 1×洗涤液，每次震荡/浸泡 1-2 分钟，在滤纸上拍干。
5. 加酶结合物：每孔加入 100μL 酶结合物工作液，混匀盖上封板膜后置 37℃温育 30 分钟。
6. 洗板：弃去液体，同步骤 4 洗板方法。
7. 加显色液：每孔加入提前配制好的 100μL TMB 混合液，混匀盖上封板膜后置 37℃暗处反应 10-20 分钟（具体显色时间根据显色结果而定）。
8. 加终止液：每孔加入 50μL 终止液，混匀，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。）立即用酶标仪在 450nm 波长测量各孔的光密度(OD 值)。

检测程序总结：

1. 加样品及标准品，37℃反应 60 分钟。
2. 加生物素标记抗体，37℃反应 60 分钟。洗涤 4-6 次。
3. 加酶结合物，37℃反应 30 分钟。洗涤 4-6 次。
4. 加 TMB 显色液，37℃反应 10-20 分钟。
5. 加入终止液，读数。

结果计算：

1. 计算标准品和样品复孔的平均 OD 值，使用计算机软件以浓度为横坐标、OD 值为纵坐标，在双对数坐标轴上作四参数逻辑曲线拟合创建标准曲线。
2. 若样品 OD 值高于标准曲线上限，应适当稀释后重新测试，并在计算样品浓度时乘以相应的稀释倍数，即为样品的实际浓度。



(此图仅供参考)

问题分析：

问题描述	可能原因	解决方案
显色弱或无色	孵育时间不够	确保孵育时间
	孵育温度不正确	按推荐温度孵育
	移液体积不足	检查移液器并严格按照操作步骤操作
	试剂添加顺序有误	检查试剂添加顺序、流程，重复试验
OD 值低	酶标仪设置不正确	检查酶标仪波长及滤光片设置
	读板时等待时间太长	及时读板
	样品含量过高	通过预实验确定合适的稀释倍数
	样品含量过低	通过预实验确定合适的稀释倍数
标准曲线梯度不佳	标准品稀释不正确	确保标准品完全溶解和稀释
	移液不准确	定期校准移液器并检查吸头密封性
	洗板不充分	保证洗涤次数、时间及加液量
背景值高	显色液被污染	加液前检查显色液是否为无色透明，请勿使用变蓝的底物
	显色时间太长	控制显色时间
	工作液稀释错误	严格按照说明书稀释
	洗板不充分	保证洗涤次数、时间及加液量