

## Human (KRT85) ELISA KIT ( 人细胞角蛋白85 )

英文名称: Human (KRT85) ELISA KIT

规 格: 96T

货 号: NLH6957

### 尊敬的客户:

感谢您选用本公司 ELISA 系列产品。本产品选用世界著名生产厂家的原料，采用专业体外诊断试剂生产技术制造，仅供科研使用。本试剂盒用于测定测定人血清、血浆及相关液体样本中细胞角蛋白 85 (KRT85) 含量。具体适用样本请咨询。使用前请仔细阅读说明书并检查试剂组分。如有疑问，请咨询: 武汉纽莱生物科技有限公司 Email:sale@newlif.com.cn 电话: 18674031376

本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断。

## 实验原理

本试剂盒应用双抗体夹心法测定标本中人细胞角蛋白 85 (KRT85) 水平。用纯化的人细胞角蛋白 85 (KRT85) 抗体包被微孔板，制成固相抗体，往包被单抗的微孔中依次加入细胞角蛋白 85 (KRT85)，再与 HRP 标记的细胞角蛋白 85 (KRT85) 抗体结合，形成抗体-抗原-酶标抗体复合物，经过彻底洗涤后加底物 TMB 显色。TMB 在 HRP 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。颜色的深浅和样品中的细胞角蛋白 85 (KRT85) 呈正相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度 (OD 值)，通过标准曲线计算样品中人细胞角蛋白 85 (KRT85) 浓度。

**用途：**本试剂盒用于测定人血清、血浆及相关液体样本中细胞角蛋白 85 (KRT85) 含量。

## 基本性能：

| 性能   |                                                  |
|------|--------------------------------------------------|
| 灵敏度  | 0.125µg/L                                        |
| 检测范围 | 0.5µg/L - 18µg/L                                 |
| 特异性  | 可检测人血清、血浆及相关液体样本人细胞角蛋白 85 (KRT85)，且与其他类似物无明显交叉反应 |
| 重复性  | 板内，板间变异系数均 ≤ 10%                                 |

## 试剂盒组成及保存

| 中文名称      | 规格                                     | 开封后保存条件        |
|-----------|----------------------------------------|----------------|
| ELISA 酶标板 | 96T: 8 孔×12 条<br>48T: 8 孔×6 条          | 2-8℃ 90天       |
| 标准品       | 96T: 0.5mlx1 (35ug/L)<br>48T: 0.25mlx1 | 2-8℃ 90天       |
| HRP标记抗体   | 96T: 6mlx1<br>48T: 3mlx1               | 2-8℃ 90天       |
| 样品稀释液     | 96T: 6mlx1<br>48T: 3mlx1               | 2-8℃ 180天      |
| 标准品稀释液    | 96T: 1.5mlx1<br>48T: 1mlx1             | 2-8℃ 180天      |
| 显色剂A      | 96T: 6mlx1<br>48T: 3mlx1               | 2-8℃(避光) 180天  |
| 显色剂B      | 96T: 6mlx1<br>48T: 3mlx1               | 2-8℃(避光) 180天  |
| 终止液       | 96T: 6mlx1<br>48T: 3mlx1               | 2-8℃ 180天 180天 |
| 30倍浓缩洗涤液  | 96T: 20mlx1<br>48T: 10mlx1             | 2-8℃ 180天 180天 |
| 说明书       | 1份                                     |                |
| 封板膜       | 2张                                     |                |
| 密封袋       | 1个                                     |                |

说明：未拆封的试剂盒可以在2-8℃ 保存六个月

## 试剂盒所需自备物品

1. 酶标仪(450nm波长滤光片)
2. 高精度移液器，EP管及一次性吸头：0.5-10μ L, 2-20μ L, 20-200μ L, 200-1000μ L
3. 37℃恒温箱
4. 双蒸水或去离子水
5. 吸水纸
6. 加样槽

## 样品收集方法 (具体处理方法请咨询)

- 1. 血清:** 用无菌管收集, 室温血液自然凝固10-20分钟, 2-8°C条件离心20分钟左右 (2000-3000转/分) 仔细收集上清, 保存过程中如出现沉淀, 应再次离心。
- 2. 血浆:** 应根据标本的要求选择EDTA、肝素钠或柠檬酸钠作为抗凝剂, 混合10-20分钟后, 2-8°C条件离心20分钟左右 (2000-3000转/分), 仔细收集上清, 保存过程中如有沉淀形成应该再次离心。
- 3. 尿液:** 用无菌管收集, 2-8°C条件离心20分钟左右 (2000-3000转/分)。仔细收集上清, 保存过程中如有沉淀形成, 应再次离心。
- 4. 组织匀浆:** 用预冷的PBS (0.01M, pH =7.4)冲洗组织, 去除残留血液, 称重后将剪碎的组织与对应体积的PBS(一般按1:9的重量体积比, 比如1 g的组织样品对应9 mL的PBS, 具体体积可根据实验需要适当调整, 并做好记录。推荐在PBS中加入蛋白酶抑制剂)加入玻璃匀浆器中, 在冰上充分研磨。为了进一步裂解组织细胞, 可以对匀浆液进行反复冻融或超声破碎。最后将匀浆液于2-8°C, 5000×g 离心5-10分钟取上清检测。
- 5. 细胞提取液:** 贴壁细胞用冷的PBS轻轻清洗, 然后用胰蛋白酶消化, 1000×g离心5分钟后收集细胞。悬浮细胞可直接离心收集。收集的细胞用冷的PBS洗涤3次。每10<sup>6</sup>个细胞中加入150-200 μL PBS重悬 (推荐在PBS 中加入蛋白酶抑制剂; 若含量很低可减少PBS的体积)并通过反复冻融或超声使细胞破碎。将提取液于2-8°C, 1500×g离心10分钟, 取上清检测。
- 6. 细胞培养上清或其他生物体液:** 收集液体后于2-8°C, 1000×g离心20分钟, 除去杂质及细胞碎片, 取上清检测。

## 试剂盒注意事项

1. 试剂盒从冷藏环境中取出应在室温平衡 15-30 分钟后方可使用, 酶标包被板开封后如未用完, 板条应装入密封袋中保存。
2. 浓洗涤液可能会有结晶析出, 稀释时可在水浴中加温助溶, 洗涤时不影响结果。
3. 各步加样均应使用加样器, 并经常校对其准确性, 以避免试验误差。一次加样时间最好控制在 5 分钟内, 如标本数量多, 推荐使用排枪加样。
4. 请每次测定的同时做标准曲线, 最好做复孔。如标本中待测物质含量过高 (样本 OD 值大于标准品孔第一孔的 OD 值), 请先用样品稀释液稀释一定倍数 (n 倍) 后再测定, 计算时请最后乘以总稀释倍数 (n×5)
5. 封板膜只限一次性使用, 以避免交叉污染。
6. 底物请避光保存。
7. 严格按照说明书的操作进行, 试验结果判定必须以酶标仪读数为准。
8. 所有样品, 洗涤液和各种废弃物都应按传染物处理。
9. 本试剂不同批号组分不得混用。

## 样本收集注意事项

- 1.不能检测含NaN<sub>3</sub>的样品，因NaN<sub>3</sub>抑制辣根过氧化物酶的（HRP）活性。
- 2.标本采集后尽快进行实验，若不能马上进行试验，可将标本放于-20℃保存，但应避免反复冻融。
- 3.我们罗列的是通用的样本处理方法，无法涵盖各种样本，对于一些特殊样本，建议实验人员多参考已发表的文献，自行设计合理的样本处理方法。

## 检测前准备工作

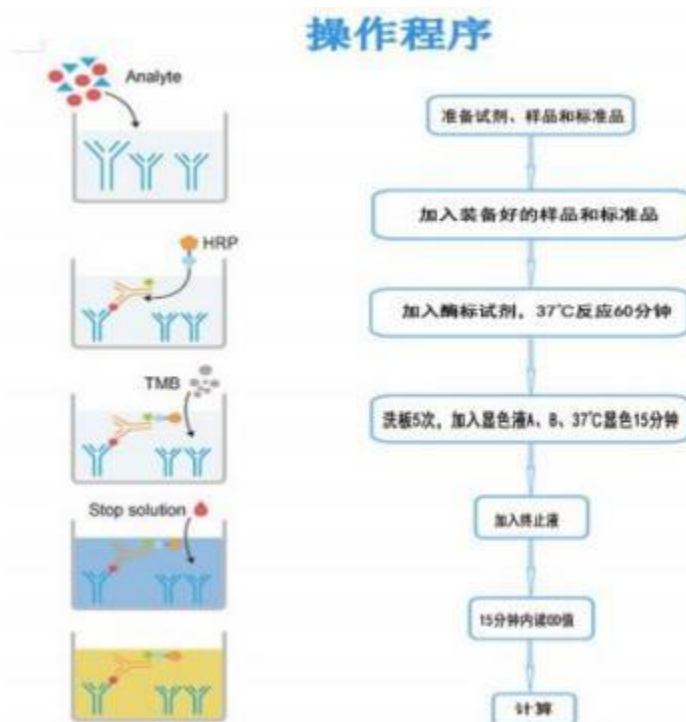
- 1.请提前20分钟从冰箱中取出试剂盒，以平衡至室温。
- 2.用双蒸水将30×浓缩洗涤液稀释成1×工作液。未用完的放回4℃。
- 3.标准品的稀释：本试剂盒提供原倍标准品一支，用户可按照下列图表在小试管中进行稀释。

|        |       |                               |
|--------|-------|-------------------------------|
| 16ug/L | 5号标准品 | 150μl 的原倍标准品加入 150μl 标准品稀释液   |
| 8ug/L  | 4号标准品 | 150μl 的 5 号标准品加入 150μl 标准品稀释液 |
| 4ug/L  | 3号标准品 | 150μl 的 4 号标准品加入 150μl 标准品稀释液 |
| 2ug/L  | 2号标准品 | 150μl 的 3 号标准品加入 150μl 标准品稀释液 |
| 1ug/L  | 1号标准品 | 150μl 的 2 号标准品加入 150μl 标准品稀释液 |

## 操作步骤

- 1.加样：分别设空白孔（空白对照孔不加样品及酶标试剂，其余各步操作相同）、标准孔、待测样品孔。在酶标包被板上标准品准确加样 50 $\mu$ l，待测样品孔中先加样品稀释液 40 $\mu$ l，然后再加待测样品 10 $\mu$ l（样品最终稀释度为 5 倍）。加样将样品加于酶标板孔底部，尽量不触及孔壁，轻轻晃动混匀。
- 2.温育：用封板膜封板后置 37 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟。
- 3.洗涤：小心揭掉封板膜，弃去液体，甩干，每孔加满洗涤液，静置 30 秒后弃去，如此重复 5 次，拍干。
- 4.加酶：每孔加入酶标试剂 50 $\mu$ l，空白孔除外。
- 5.温育：操作同 2
- 6.洗涤：操作同 3
- 7.显色：每孔先加入显色剂 A 50 $\mu$ l，再加入显色剂 B 50 $\mu$ l，轻轻震荡混匀，37 $^{\circ}$ C 避光显色 10 分钟。
- 8.终止：每孔加终止液 50 $\mu$ l，终止反应（此时蓝色立转黄色）。
- 9.测定：以空白孔调零，450nm 波长依序测量各孔的吸光度（OD 值）。测定应在加终止液后 15 分钟以内进行。

## 操作一览表



### 结果判断:

- 1.每个标准品和标本的OD 值应减去空白孔的OD 值。
- 2.以标准品的浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，利用计算机软件采用直线回归的拟合方法创建标准曲线方程，通过样本的吸光度（OD值），利用方程计算样品的浓度值。
- 3.若样本的OD值高于标准曲线上限，应适当稀释后重测，计算浓度时应乘以稀释倍数。

### 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。  
详情请看质检报告.