Protein A ELISA Kit

Catalog No.: RK05024

version: 2.0

*使用产品前，请务必阅读产品包装内说明书

产品简介

本 Protein A ELISA 试剂盒是用于定量检测天然 Protein A 和各种非天然 Protein A (如耐碱性重组 Protein A)的即用试剂盒。该试剂盒适用于市面上几乎所有具有不同 Protein A 突变体的 Protein A 层析树脂的残留检测。Protein A ELISA 检测试剂盒可定量检测天然 Protein A、重组 Protein A 以及 Alkali-tolerant Recombinant Protein A（耐碱性重组 Protein A）等样品，即使样品中含有抗体也可经有效的处理而准确测定。

产品检测原理

本实验采用双抗夹心 ELISA 法。将抗 Protein A 抗体预先包被在酶标板上，向微孔中分别加入标准品和样品，样本中 Protein A 与固相载体上的抗体结合。孵育后，未结合的样品在洗涤过程中会被洗去，加入抗 Protein A 的检测抗体，形成双抗体夹心。洗去未结合的检测抗体，然后向微孔中加入酶结合物。孵育和洗涤后，加入底物 TMB。样品中 Protein A 的含量与 TMB 反应的颜色深浅呈正相关，加入酸终止反应并测量吸光值。根据梯度稀释的 Protein A 标准品的吸光值绘制标准曲线并求出样品的浓度。

试剂盒组分及保存条件

未拆封的试剂盒可在 2-8°C 保存 1 年，已拆封的产品须在 1 个月内使用完。

组分	规格	货号	拆封后保存条件
Protein A 预包被酶标板 Protein A Microwell Plate Coated	8×12	RZ21243	将未使用的板条放回装有干燥剂的铝箔袋中，并重新密封，可在 2-8°C 存储 1 个月。
天然蛋白 A 标准品（1μg/mL) Nature Protein A Standard (1μg/mL)	20 μL	RZ21244	-20℃保存
耐碱重组蛋白 A 标准品 (1μg/mL) Alkali tolerant Recombinant Protein A Standard (1μg/mL)	20 μL	RZ21245	-20℃保存
Protein A 浓缩生物素化抗体（100×） Concentrated Biotin Conjugate Antibody (100×)	1 ×120μL	RZ21246	可在 2-8°C 存储 1 个月。

浓缩链霉亲和素-HRP（100x） Streptavidin-HRP Concentrated (100×)	1 ×120μL	RZ21247	可在 2-8°C 存储 1 个月。
处理剂 Processing agent	1 ×500μL	RZ21248	室温存储
标准品/样本稀释液（R1） Standard/Sample Diluent (R1)	1 ×20 mL	RM00023	可在 2-8°C 存储 1 个月。
生物素化抗体稀释液（R2） Biotin-Conjugate Antibody Diluent (R2)	1 ×12 mL	RM00024	
链霉亲和素-HRP 稀释液（R3） Streptavidin-HRP Diluent(R3)	1 ×12 mL	RM00025	
浓缩洗涤液（20x） Wash Buffer(20x)	1 ×30 mL	RM00026	
显色底物 TMB Substrate	1 ×12 mL	RM00027	
终止液 Stop Solution	1 ×6 mL	RM00028	

*特别提示：表中所列为 96T 规格试剂盒，48T 试剂盒除标准品外，其他组分量均减半，请知悉。

实验所需的材料

1. 酶标仪，并配置主波长 450nm，次波长 630nm 或 570nm。
2. 单/多通道移液器及吸头。
3. 去离子水或蒸馏水。
4. 洗瓶或是自动洗板机。
5. 恒温箱。
6. 灭菌的试管或是 EP 管，用于样本或是标准蛋白的稀释。

重要提示

*本产品仅用于科研，不能用于临床诊断。

1. 请留意产品标签上的有效期时间，并在有效期前使用本产品。
2. 请勿将不同批次或者来自不同厂家的试剂混合使用。
3. 如测试获得的样本 OD 值超过了产品的最高检测限，请使用产品中的标准品/样本稀释液（R1）对样本进行稀释。所以，在正式测试样本前，建议先进行样本的预测试。
4. 实验过程中的加样、洗板、孵育时间、孵育温度等操作均会对最终结果造成影响，请严格管理实验流程并做好记录。
5. 样本的收集、处理及保存均会对检测结果产生影响，请务必严格管理样本的处理过程。
6. 在本试验中对所有因素进行试验之前，不能排除干扰的可能性。
7. 相关试剂中可能存在有害物质，使用中请注意佩戴手套，必要时

佩戴护目镜。

8. 终止液为腐蚀性液体，请做好相关防护。
9. 为保证最佳检测效果,相关试剂组分的保存请参照标签或是说明书。
10. 试剂配制后的混匀对检测结果非常重要,但部分蛋白或是抗体可能对剧烈的涡旋非常敏感,可能造成活性损失,请谨慎使用涡旋。
11. 请使用灭菌的耗材进行试剂配制，以免造成试剂污染，影响最终检测结果。
12. 为保证最佳检测效果,溶解后的标准蛋白及相关试剂的工作液不建议冻存后重复使用。
13. 产品在储存或是使用中，请注意避光。
14. 为保证最佳检测效果，在加不同样本时，请注意更换吸头。
15. 请严格按照说明书的要求进行试剂配制。如果您将分次使用试剂盒，请使用封口袋密封好预包被板，并且在开封后的 1 个月内使用完。
16. 48T 的试剂盒也同样可参考说明书进行实验。

样本准备

样品中的抗体结合 Protein A 可导致检测值偏低，所以从样品中完全解离并除去抗体非常重要。加热处理可以有效的分离 Protein A 和抗体，抗体经加热变性，再经离心除去，Protein A 则留于上清液中。较高的抗体浓度可能会干扰检测的准确度，需要稀释至 10 mg/ml 以下；样品 pH 值要调整到 6.0-7.5 的范围，以免影响检测结果的准确度。

1. 在离心管中加入 500 μL 待测样本。
2. 每个样本中加入 5 μL 吐温-20 至终浓度为 1%，混匀。

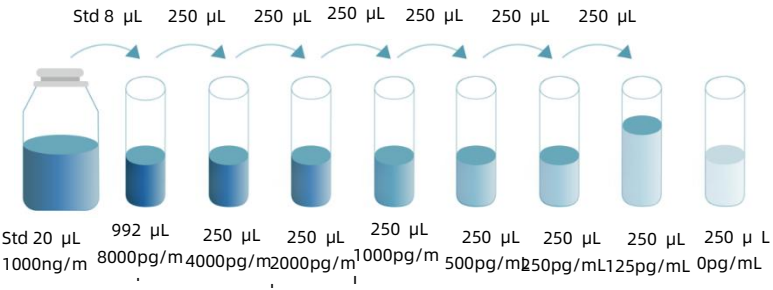
注：实际待测样本量可根据需求适当调整，同时调整吐温-20 的量保持其工作浓度为 1%。

3. 在离心管盖上扎个针孔以便后续加热时能释放压力。
4. 将离心管置于沸水中水浴 10 min 以分离 Protein A 和抗体。
5. 冷却至室温，11000 rpm 离心 5 min。
6. 转移含有 Protein A 的上清液至新的离心管中。
7. 将处理好的待测样品做好标记，若待测样品中 Protein A 浓度较高，用 1×样品稀释液稀释后至标准曲线范围内再进行检测。

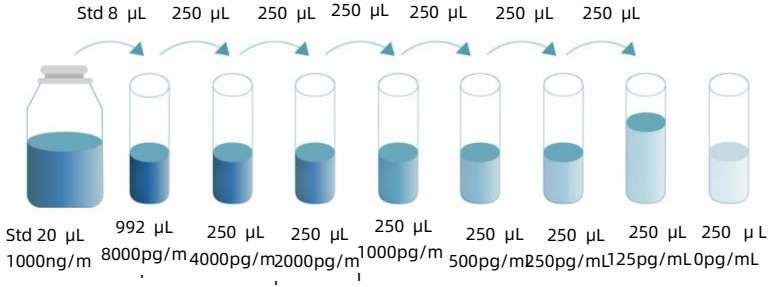
注：本处理方案适用于所有类型 Protein A 样本，包含天然 Protein A、重组 Protein A 和 Alkali-tolerant Recombinant Protein A.

试剂准备

1. 使用前将所需使用的试剂平衡至室温。如果浓缩液中有结晶析出，需要将试剂置于室温轻轻摇动，直至晶体完全溶解。
2. 标准品：检测含有天然 Protein A 样品时，则制备天然 Protein A 标准曲线，按照下图准备好包含 R1 稀释液的 EP 管，并按照提示进行梯度稀释（建议标准曲线使用以下浓度：8000，4000,2000, 1000, 500, 250, 125，0 pg/mL)。



检测含有 Alkali-tolerant Protein A 的样品时，则制备 Alkali-tolerant Protein A 标准曲线，按照下图准备好包含 R1 稀释液的 EP 管，并按照提示进行梯度稀释（建议标准曲线使用以下浓度：8000，4000,2000, 1000, 500, 250, 125，0 pg/mL)。



3. 浓缩生物素化抗体(100x):在使用前用生物素化抗体稀释液(R2)将浓缩生物素化抗体以 1：100 的比例稀释，注意：稀释后的工作液应在 30 分钟内使用。
4. 浓缩链霉亲和素-HRP（100x）：在使用前用链霉亲和素-HRP 稀释液（R3）将浓缩链霉亲和素-HRP 以 1：100 的比例稀释。注意：稀释后的工作液应在 30 分钟内使用。

洗涤液：在使用前用双蒸水或去离子水将洗涤液以 1：20 的比例稀释。

实验步骤

为获得理想的实验结果，请注意，所需使用的试剂在使用前平衡到室温。建议所有标准品、对照品和样品均做复孔测试。

1. 按照前几节的指示准备好所有试剂、工作标准品和样品。从板框上取下待用的微孔板条，将剩余的板条放回装有干燥剂的铝箔袋中，然后重新密封保存。
2. 每孔加入 1x 洗涤缓冲液 350 μL，静置 40 秒后弃去液体，该步骤共洗涤 3 次。
3. 在空白孔中添加 100 μL 标准品/样本稀释液（R1）。
4. 在其他孔中分别加入 100 μL 不同浓度的标准品或样品，用提供的封板膜封闭板孔，37℃孵育 2 小时。
5. 在使用前 15 分钟配制好生物素化抗体（100x）工作液。
6. 弃去孔中液体，重复步骤 2 中的洗涤步骤。
7. 每孔中加入生物素化抗体工作液（100 μL/孔），并盖上新的封板膜，37℃下孵育 1 小时。
8. 使用前 15 分钟配制好链霉亲和素-HRP（100x）的工作液。
9. 弃去孔中液体，重复步骤 2 中的洗涤步骤。
10. 每孔中加入链霉亲和素-HRP 工作液（100 μL/孔），并盖上新的封板膜，37℃孵育 30 分钟。
11. 预热酶标仪。
12. 弃去孔中液体，重复步骤 2 中的洗涤步骤。
13. 向孔中加入 TMB 底物（100 μL/孔）。在 37℃下避光孵育 15-20

分钟。

14. 加入终止液（50 μL/孔），并立即放入酶标仪，在 5 min 内测定每个孔 450 nm 的 OD 值。 如果可以选择校正波长，则设置为 570 nm 或 630 nm。并从 450 nm 的读数中减去 570 nm 或 630 nm 的读数，这种方式可以校正并去除非显色物质的 OD 值，从而获得更准确的检测结果。如果无法选择校正波长，则获得的读数将偏高，导致读数的准确度下降。

简要实验流程

准备好需要的标准品和试剂

洗板 3 次

↓

向孔中加入 100 μL 标准品或待测样本

37℃孵育 2 小时，然后洗板 3 次

↓

每孔加 100 μL 生物素化抗体工作液

37℃孵育 1 小时，然后洗板 3 次

↓

每孔加 100 μL 链霉亲和素-HRP 工作液

37℃孵育 0.5 小时，然后洗板 3 次

↓

加入 100 μL 底物溶液，37℃避光，孵育 15-20 分钟

↓

加入 50 μL 终止液

↓

5 min 内检测 450 nm 波长的 OD 值

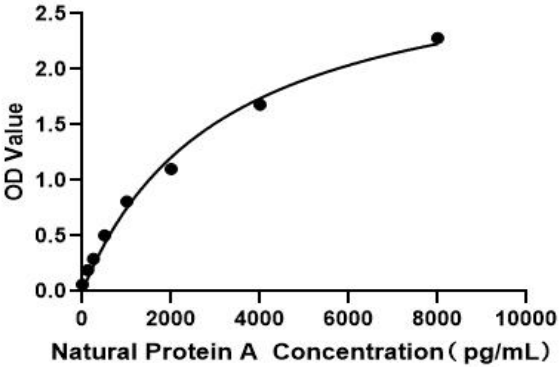
校正波长设置为 570 nm 或 630 nm

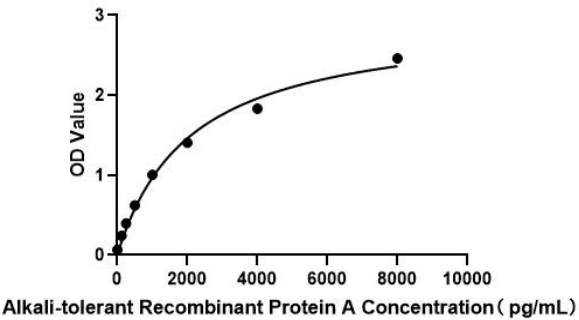
结果计算

1. 计算标准蛋白各浓度、质控、样本等复孔的平均 OD 值，每个测试的 OD 值都应减去空白孔的 OD 值以及次波长的 OD 值。
2. 使用测试获得的 OD 值绘制标准曲线，推荐使用 4-PL 拟合，具体也可根据需求选择其他拟合方式来绘制标准曲线。使用计算机软件以吸光度 OD 值为纵坐标（Y），相应的 Protein A 标准品浓度为横坐标（X），绘制标准曲线。样品的含量可根据其 OD 值由标准曲线计算出相应的浓度。
3. 如果样本在上样检测时进行了稀释，那么计算获得浓度需要乘以相应的稀释倍数。

典型数据

此标准曲线图仅供参考，计算实验结果请以实际实验数据进行。





检测范围

天然 Protein A: 125-8000 pg/mL

Alkali-tolerant Recombinant Protein A: 125-8000 pg/mL

灵敏度

最低检测天然 Protein A 可达 62.5 pg/mL；

最低检测 Alkali-tolerant Recombinant Protein A 可达 62.5 pg/mL。

重复测定空白样本 20 次，计算 20 次反应测得的均值（$\bar{X}$）和标准差（SD），以$\bar{X}$+2SD 计算出相应的浓度，即为分析灵敏度。

特异性

本试剂盒可用于检测重组 Protein A，天然 Protein A 和 Alkali-tolerant Recombinant Protein A。

精密度

批内差

在同一块板上重复测试三个已知浓度的样品 20 次，计算浓度的变异系数（CV）。

批内 CV<10%。

批间差

用两批试剂盒对三个已知浓度的样品分别进行 20 次测试，计算浓度的变异系数（CV）。

批间 CV<15%。

	批内精密度			批间精密度		
样本	1	2	3	1	2	3
数量	20	20	20	20	20	20
浓度(pg/mL)	312.5	1000	6000	312.5	1000	6000
标准偏差（SD）	7.81	36	258	24.69	78	486
变异系数 CV(%)	2.5	3.6	4.3	7.9	7.8	8.1

Alkali-tolerant Recombinant Protein A	批内精密度			批间精密度		
样本	1	2	3	1	2	3
数量	20	20	20	20	20	20
浓度(pg/mL)	312.5	1000	6000	312.5	1000	6000
标准偏差（SD）	7.5	34	270	24.06	86	498
变异系数 CV(%)	2.4	3.4	4.5	7.7	8.6	8.3

回收率

将高、中、低 3 个不同浓度的 Protein A 蛋白加入到对应的样本中检测，并计算蛋白的回收率（实际测试的样本浓度/理论样本浓度 x100%）。

样本类型	平均回收率（%）
human IgG	90

ELISA 常见问题分析及解决方法

问题描述	可能原因	解决方法
高背景值	洗板不充分	按要求充分洗涤，保证洗板时间、次数及每孔加样量无误
	孵育条件不正确	检查孵育时间、温度是否按要求进行
	试剂、样本的交叉污染	注意实验过程中可能造成样本交叉污染的操作；配制新鲜的试剂，重复测试
无信号值或过低的信号值	试剂配制和使用错误	检查试剂配制浓度是否正确，是否按照顺序使用
	酶标仪使用、设置不正确	提前预热；设置正确的主、次波长读数
	显色时间过短	最佳显色时间应控制在 15-25min
	终止后，未及时读数	加入终止液后，在 5min 内读数
	样本基质效应	使用阳性质控品对照测试
过强的信号值	TMB 底物变质	检查 TMB 底物是否变蓝，使用新的底物试剂
		避免使用金属物质接触底物造成变质失效
	每步实验未更换新的封板膜	每步实验更换新的封板膜
	样本中目标蛋白量过高	预测试，选择适当稀释倍数测试

重复性差	加样量不均一	检查移液器，定期校准
	样本有杂质或沉淀物	样本使用前，请离心样本
	试剂配制未充分混匀	加样前充分混匀试剂

*仅供科研使用，不可用于治疗或诊断目的。