

## Protein A ELISA 检测试剂盒说明书



96 孔板  
货号 Bk301  
保存: 2-8℃  
有效期: 6 个月

本产品仅供科研和生产用，不得应用于疾病的诊断或治疗，  
使用前请认真地阅读此说明书！

---

电话: 027-87561633 手机: 189-8623-2100

QQ客服: 121545059 网址:<http://www.itiande-neuron.com>

公司地址: 武汉东湖新技术开发区高新大道666号光谷生物城生物创新园B1栋b274-9室

## 适用范围:

此 Protein A ELISA 检测试剂盒用于定量检测重组耐碱性蛋白 A，只能用于科研和生产，不能应用于人或动物疾病的诊断、治疗。本试剂盒提供一种样品的酸化处理方法，把蛋白 A 从 IgG 中分离出来，在人源化单抗浓度高达 3mg/mL 的情况下，蛋白 A 的检测限可至 78pg/mL 以下。

## 检测原理:

此试剂盒采用定量双抗夹心酶联免疫分析方法。酶标板预先包被蛋白 A 的特异性单克隆抗体，再将含有蛋白 A 的样品用样品稀释液进行稀释，然后同酸化液混合使蛋白 A 从抗体中分离出来，样品中蛋白 A 和预包被在酶标板上的蛋白 A 捕获抗体结合。再加入生物素标记的检测抗体结合形成夹心三明治复合物。然后洗涤去除没有参与反应的物质，加入亲和素标记的 HRP，短暂孵育后洗涤，再进行 TMB 显色，然后加入终止液终止显色反应，在 450nm 处检测吸光值，检测所得 OD 值和样品含量成正相关。

## 需要用到但本产品没有提供的器材:

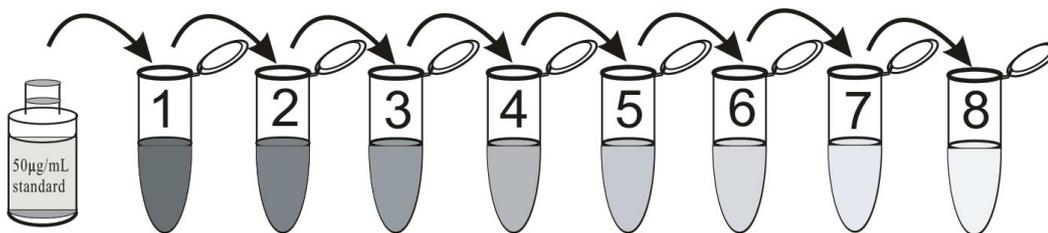
1. 多道和单道 10-1000 $\mu$ L 的移液器，
2. 100mL 和 1000mL 的烧杯
3. 去离子水或蒸馏水
4. 各种型号溶液稀释管及样品处理管
5. 酶标仪（测 450nm）
6. 数据处理分析软件

**组成成分:**

| Component  | Product # | Storage |
|--|-----------|---------|
| <b>1. Protein A Standard (ProteinA 蛋白标准品)</b><br>Recombinant Alkali-tolerant Protein A in a protein matrix with preservative, 50µg/mL, 1x0.1mL | Bk031     | 2-8°C   |
| <b>2. Biotinylated Antibody (生物素标记的抗体)</b><br>Biotinylated anti-protein A monoclonal antibody in a protein matrix with preservative, 1x12mL    | Bk016     | 2-8°C   |
| <b>3. Sample Diluent (样品稀释液)</b><br>Tris buffered saline with a protein matrix and preservative, 1x30mL  | Bk017     | 2-8°C   |
| <b>4. Denaturing Buffer (酸化缓冲液)</b><br>Citrate buffer with detergent and preservative, 1x12mL  | Bk018     | 2-8°C   |
| <b>5. 10x Assay Buffer (10x 洗涤缓冲液)</b><br>phosphate buffer with preservative, 1x30mL   | Bk004     | 2-8°C   |
| <b>6. Streptavidin labeled HRP (亲和素标记的 HRP)</b><br>Streptavidin labeled HRP in a protein matrix with preservative, 1x12mL                      | Bk019     | 2-8°C   |
| <b>7. TMB Substrate (TMB 显色液)</b><br>3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, 1x12mL  | Bk007     | 2-8°C   |
| <b>8. Stop Solution (终止液)</b><br>2M sulphuric acid, 1x12mL   | Bk008     | 2-8°C   |
| <b>9. Monoclonal anti-Protein A Coated plate of 96 wells (包被 proteinA 抗体的 96 孔酶标板、8 孔 x12)</b><br>12x8 well strips in a bag with desiccant     | Bk032     | 2-8°C   |

**试剂准备:**

1. 本试剂盒使用前请恢复至室温 (20-25°C)。
2. 洗涤液配制: 30mL 洗涤液 (10x) 中加入 270mL 去离子水, 混匀配成 300mL 工作洗涤液。如果里面有结晶, 请溶解混匀后再使用。洗涤工作液最好现用现配, 剩余工作液可在 2-8°C 保存两周。
3. 标准品稀释:  
取 8 个离心管标记 1#-8#, 取 990µL 样品稀释液加入到 1#和 2#管中, 再取 500µL 样品稀释液加入到 3#-8#管中。取 10µL 样品标准品加入到 1#管中, 涡旋混匀后取 10µL 加入到 2#管中涡旋混匀。然后取 2#管 500µL 液体加入到 3#管中涡旋混匀, 再取 3#管 500µL 液体至 4#管中涡旋混匀, 如此直至 8#管。



稀释完之后，2#-8#离心管中 Protein A 标准品的浓度分别为 5、2.5、1.25、0.625、0.3125、0.156、0.078ng/mL。另外标记一管加入样品稀释液 500 $\mu$ L，浓度为 0ng/mL。标准品和样品准备好之后就进入样品处理程序。

4. 其他试剂不用稀释可直接使用。

## 样品处理：

1. 样品如需稀释，请用试剂盒内的样品稀释液在 96 孔板或 EP 管中进行稀释。
2. 向每个样品处理孔（管）加入体积 100 $\mu$ L 的代测样本。
3. 加入 100 $\mu$ L 的标准品和质控品到对应孔（管）内。
4. 每个孔再加入 50 $\mu$ L 酸化液，用以移液器吹打至少 15 次混匀（如果用 EP 管，可将 EP 管涡旋数秒）。
5. 室温放置 5-10min（使样品中 proteinA 和抗体酸化分离）。

## 操作步骤：

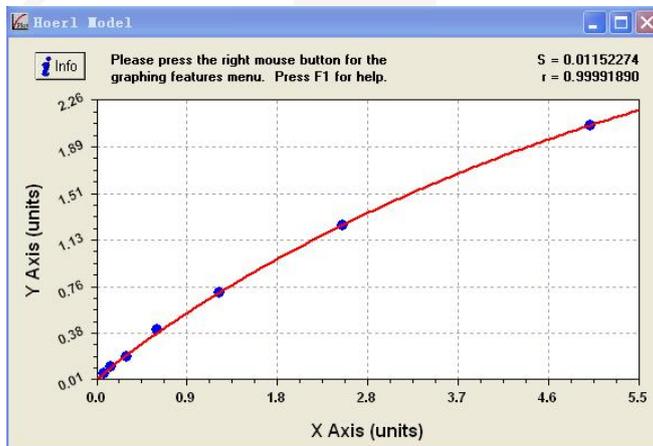
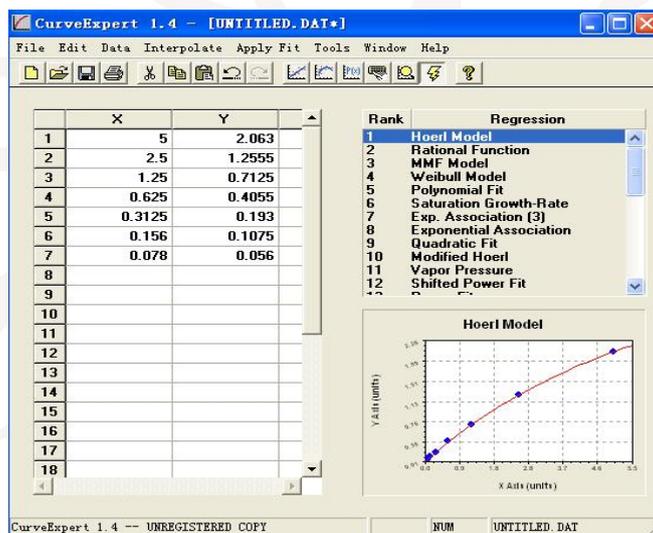
1. 向包被有 protein A 抗体的酶标板中加入 100 $\mu$ L/孔的生物素标记的结合抗体。
2. 再加入 25 $\mu$ L 酸化处理好的标准品、样品、质控品和空白到对应的孔里，室温孵育 1h。
3. 甩干，用工作洗涤液 250 $\mu$ L/孔洗涤 4 次之后，拍干。加入 100 $\mu$ L/孔的亲素标记 HRP，室温孵育 10min。
4. 甩干，用工作洗涤液 250 $\mu$ L/孔洗涤 4 次之后，拍干。
5. 加入 100 $\mu$ L/孔的 TMB 显色液，室温静置 10min。再加入 100 $\mu$ L/孔终止液，然后在 450nm 处检测吸光值。

## 数据处理和结果分析：

利用软件（如 Curve Expert 或 ELISA Calc）来建立检测标准曲线。把 OD 值（纵坐标）和标准品浓度（横坐标）的对应关系用 4 参数逻辑拟合或三次多项式线性拟合成标准曲线，然后把检测样品的 OD 值带入相应曲线方程计算出对应的样品浓度。

典型的标准品检测数据和曲线拟合:

| 标准品浓度<br>(ng/mL) | 平行孔 OD |       | 平均值    | 除零 OD<br>值 |
|------------------|--------|-------|--------|------------|
| 5                | 2.085  | 2.096 | 2.0905 | 2.063      |
| 2.5              | 1.294  | 1.272 | 1.283  | 1.2555     |
| 1.25             | 0.737  | 0.743 | 0.74   | 0.7125     |
| 0.625            | 0.43   | 0.436 | 0.433  | 0.4055     |
| 0.3125           | 0.227  | 0.214 | 0.2205 | 0.193      |
| 0.156            | 0.142  | 0.128 | 0.135  | 0.1075     |
| 0.078            | 0.088  | 0.079 | 0.0835 | 0.056      |
| 0                | 0.027  | 0.028 | 0.0275 | -          |



电话: 027-87561633 手机: 189-8623-2100

QQ客服: 121545059 网址: <http://www.itiande-neuron.com>

公司地址: 武汉东湖新技术开发区高新大道666号光谷生物城生物创新园B1栋b274-9室

## 分析指标:

- 1、精密度：在样品浓度大于 0.3ng/mL 的时候，检测变异系数小于 10%；样品浓度小于 0.3ng/mL 的时候，检测变异系数略大于 10%。
- 2、建议检测具体样品的时候，采用添加质控品的方法来监测样品基质效应对检测结果的影响。
- 3、本试剂盒的灵敏度为 0.02ng/mL。
- 4、勾状效应：本试剂盒是双抗夹心一步法，产生勾状效应的浓度为 10 $\mu$ g/mL。

## 注意事项:

1. 本试剂盒只可用于科研生产，不可用于体外诊断。
2. 终止液是 2M 的硫酸，避免接触到眼睛、皮肤和衣物。除此之外，本试剂盒中的试剂不会对人体有任何伤害。
3. 高或低的 pH 值，洗涤剂，尿素，高盐浓度和有机试剂都是 ELISA 方法的影响因素，pH 的影响很大，样品 PH 值应控制在 7.0-7.4。
4. 如果您在使用过程中有任何问题，请联系本公司技术部门（[www.bioyargene.com](http://www.bioyargene.com)）。