EliKine™ 人I型胶原蛋白ELISA定量试剂盒

Cat #: KTE3112 Size: 48 T/96 T

	人 I 型胶原蛋白 ELISA 定量试剂盒		
REF	**货号：** KTE3112	LOT	**批号：** 见产品标签
	检测范围： 15.63 pg/mL-1,000 pg/mL		**灵敏度：** 15.63 pg/mL
	精密度：板内变异系数<10%, 板间变异系数<12%		**回收率：** 范围从 72%到 112%，平均回收率 90%
	特异性： 检测具有高灵敏度和优良的特异性。未观察到和人 I 型胶原蛋白类似物之间的显着交叉反应或干扰。		
	适用样本： 血清（浆）、细胞培养上清		
	保质期： 4℃，避光保存 24 个月		

原理

I 型胶原蛋白是皮肤、骨骼和肌腱等结缔组织中含量最丰富的结构蛋白。它是一种合成的前胶原分子，其特征为 300 nm 的三重螺旋结构域，两侧是球状的 N 端和 C 端前肽。三螺旋结构域包含 Gly-Xaa-Yaa 三联体，其中 Xaa 和 Yaa 通常分别是脯氨酸和羟脯氨酸。前胶原蛋白 N 和 C 蛋白酶活性去除非螺旋前肽， 因此成熟的三螺旋可以自组装成胶原原纤维，为组织提供拉伸强度。EliKine™ 人 I 型胶原蛋白 ELISA 定量试剂盒采用双抗体夹心法来定量样品中的人 I 型胶原蛋白。用抗人 I 型胶原蛋白的特异性抗体包被于酶标板上，将样品或标准品加入酶标板的孔中，其中的人 I 型胶原蛋白会与包被在板上的固相抗体结合。未结合的成分被洗去，然后将生物素化的抗人 I 型胶原蛋白特异性抗体加入孔中。洗涤后，将专有的链霉亲和素-HRP 偶联物加入孔中。生物素化的抗人 I 型胶原蛋白抗体与结合在包被抗体上的人 I 型胶原蛋白结合、生物素与链霉亲和素特异性结合而形成免疫复合物。在洗涤去除任何未结合的链霉亲和素酶试剂后，加入显色底物(TMB)，TMB 在 HRP 催化下呈现蓝色，加终止液后变成黄色。用酶标仪在 450 nm 波长处测 OD 值，人 I 型胶原蛋白浓度与 OD450 值之间呈正比。

包装清单

试剂盒组分	规格		储存条件
	48 T	96 T	
Human Pro-Collagen I α1 Microplate	48 wells	96 wells	4℃
Human Pro-Collagen I α1 Standard (lyophilized)	1	2	4℃
Standard Diluent	5 mL	5 mL	4℃
Assay Buffer (10×)	5 mL	10 mL	4℃
Human Pro-Collagen I α1 Detect Antibody (100×)	1	1	4℃

Not for further distribution without written consent.Copyright © Abbkine, Inc.

Streptavidin-HRP (100×)	1	1	4℃
HRP Substrate (TMB)	6 mL	11 mL	4℃，避光保存
Stop Solution	11 mL	11 mL	4℃
Wash Buffer (20×)	50 mL	50 mL	4℃
Plate Covers	6	6	室温

自备耗材

- 酶标仪（能测 450 nm 处的吸光度）
- 多通道移液器或自动洗板机
- 恒温箱、低温离心机
- 可调节式移液枪及枪头
- 去离子水

试剂准备

Standard Diluent：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。Standard Diluent 用于稀释标准品。

1×Assay Buffer：使用前，平衡到室温，用去离子水按 1:10 的比例稀释 Assay Buffer (10×)得到 1×Assay buffer，轻轻混合以避免起泡。4℃保存, 此溶液可稳定保存 30 天。1×Assay buffer 用于稀释血清和血浆样品, Human Pro-Collagen I α1 Detect Antibody (100×) 和 Streptavidin-HRP (100×)。

Human Pro-Collagen I α1 Standard: 加入标准品的标签上标注重悬体积的无菌水复溶 Human Pro-Collagen I α1 Standard 得到 2,000 pg/mL 标准品。在进行稀释之前，将标准品至少放置 15 min 并轻轻晃动，复溶后 Standard 可在-20℃保存 1 个月，重溶使用 1 次后丢弃。

1×Human Pro-Collagen I α1 Detect Antibody： 稀释前充分混合。根据标准品和样品所需要的量，在干净的塑料管中用 1×Assay buffer 对 Human Pro-Collagen I α1 Detect Antibody（100×）进行 1:100 稀释。1×Human Pro-Collagen I α1 Detect Antibody 应在稀释后 30 min 内使用。

1×Streptavidin-HRP：稀释前充分混合。根据标准品和样品所需要的量，在干净的塑料管中用 1×Assay buffer 对 Streptavidin-HRP（100×）进行 1:100 稀释。1×Streptavidin-HRP 应在 30 min 内使用。

HRP Substrate (TMB)：即用型；使用前，平衡到室温；4℃避光保存。

Stop Solution：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

1×Wash Buffer: 使用前平衡到室温，用去离子水进行 1:20 稀释得到 1×Wash buffer。 轻轻混合以避免起泡，室温保存，此溶液可稳定保存 30 天。

标准曲线设置：按下表所示，用 Standard Diluent 将 2,000 pg/mL 标准品稀释为 1,000、 500、250、125、62.5、31.25、15.63 和 0 pg/mL 的 Human Pro-Collagen I α1 标准品。

序号	标准品体积	Standard Diluent 体积（μL）	标准品浓度（pg/mL）
Std.1	230 μL of 2,000 pg/mL	230	1,000
Std.2	230 μL of Std.1 (1,000 pg/mL)	230	500
Std.3	230 μL of Std.2 (500 pg/mL)	230	250
Std.4	230 μL of Std.3 (250 pg/mL)	230	1125
Std.5	230 μL of Std.4 (125 pg/mL)	230	62.5
Std.6	230 μL of Std.5 (62.5 pg/mL)	230	31.25
Std.7	230 μL of Std.6 (31.25 pg/mL)	230	15.63

Not for further distribution without written consent.Copyright © Abbkine, Inc.

Std.8	0	230	0

注意：每次实验都需要新配制标准品。

样本制备

1. 细胞培养上清：离心除去颗粒，立即测定或分装-20℃保存，避免反复冻融。
2. 血清：使用血清分离管，让样品在室温下凝结 30 min，然后 1,000 g 离心 15 min。 取上层血清立即测定或分装-20℃保存，避免反复冻融。
3. 血浆：使用 EDTA、肝素或柠檬酸盐作为抗凝剂收集血浆。在收集后 30 min 内 1,000 g 离心 15 min。立即测定或分装-20℃保存，避免反复冻融。

正常血清血浆样本需要 100 倍稀释。推荐 5 μL 样本+495 μL 1×Assay Buffer。

注意：不要使用严重溶血或脂血的标本。如果样品要在 24 h 内使用，则可以将其储存在 2 至 8℃，避免反复冻融。测定前，应将冷冻样品缓慢升至室温并轻轻混合。

实验步骤

1. 从板框上取下多余的板条，将它们放回装有干燥剂包的铝箔袋中，然后重新密封。
2. 除去每孔中的液体并洗涤。使用多通道移液器或自动清洗机每孔加入 300 μL 1×Wash buffer 静置浸泡 30 s，进行洗涤。在每个步骤中完全去除液体对于获得良好性能至关重要。最后一次洗涤后，倒置酶标板并用干净的纸巾吸干以除去任何剩余的 1×Wash buffer。洗板完成之后，请立即使用微孔板，不要让微孔板干燥。
3. 加标准品：标准品孔加入 100 μL 稀释的标准品。
4. 加样品：血清/血浆：样本孔加入 90 μL 1×Assay Buffer 和 10 μL 预稀释样本；细胞培养上清：样本孔加入 100 μL 细胞培养上清（详见样本制备）。保证步骤 3、4 连续加样，不要间断。加样过程在 15 min 内完成。给酶标板覆膜，在室温下孵育 2 h。
5. 重复步骤 2 中的洗涤 6 次。
6. 加检抗：每孔加入 100 μL 1×Human Pro-Collagen I α1 Detect Antibody。给酶标板覆膜，在室温下孵育 1 h。
7. 重复步骤 2 中的洗涤 6 次。
8. 每孔加入 100 μL 1×Streptavidin-HRP。给酶标板覆膜，在室温下孵育 45 min，注意避光。
9. 按照步骤 3 重复洗涤过程 6 次。
10. 每孔加入 100 μL HRP Substrate (TMB)。给酶标板覆膜，并在室温下避光孵育 5-30 min。
11. 每孔加入 100 μL Stop Solution，Stop Solution 应按照与 TMB 相同的顺序加到板中。孔中的颜色应从蓝色变为黄色。如果孔中的颜色为绿色或颜色变化不均匀，请轻轻敲击板以确保彻底混合。
12. 在 30 min 内，测定每孔 450 nm 处的吸光值。

注意：5-30 min 显色时间为经验范围，每个具体的实验，可根据以下情况，确定大致的显色时间。

1) 肉眼观察：标曲 S5 孔有淡蓝色、Blank 孔无明显蓝色时，即可终止；

2) 仪器判断：630 nm 左右波长下，标曲 S1 孔的 OD 值达到 0.5-0.7、S5 孔的 OD 值达到 0.05-0.08、Blank 孔的 OD 值小于 0.05 时，即可终止。

结果计算

1. 计算每个标准品和样品的复孔平均 OD 值，并减去零浓度（Std.8）平均 OD 值。
2. 标准曲线的绘制：以标准品浓度为 x 轴，各标准品的平均吸光度为 y 轴，绘制标准曲线。可以使用作图软件来创建标准曲线。

注意：如果样品被稀释，从标准曲线读取的浓度必须乘以稀释系数。

结果展示

典型标准曲线（$R^2 \geqslant 0.99$）

Not for further distribution without written consent.Copyright © Abbkine, Inc.

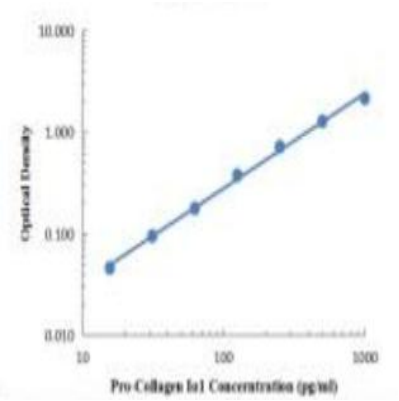


Figure1. 96 孔板分析的人 I 型胶原蛋白标准曲线。数据和曲线仅供参考，实验者需根据自己的实验建立标准曲线

注意事项

1. 如果 Standard Diluent 和 Assay Buffer (10×)出现颜色变黄，少量沉淀等现象，是因为试剂中含有血清导致，离心去掉沉淀即可，不影响正常使用。
2. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
3. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。
4. 为确保准确的结果，在孵育步骤中必须正确粘附板贴。
5. Stop Solution 有一定的腐蚀性，操作时请做好防护措施。

常见问题

问题	原因	解决建议
标准曲线无线性	加样不准	检查移液器
	稀释不当	开管前轻柔搅拌和旋转标准品保存管使粉末完全溶解
信号过低	样本孵育时间过短	确保足够的孵育时间；标准/样品孵育时间增加到 2 或 3 小时
	试剂体积不足或稀释不当	检查移液器并确保准备充分
	TMB 孵育时间过短	加 Stop Solution 之前，确保有足够的孵育时间，直到出现蓝色
高背景/CV 值过高	洗板不充分	仔细检查清洗步骤. 如果使用洗板机，检查所有接口
	Wash Buffer 被污染	准备新鲜的 Wash Buffer
低灵敏度	试剂盒保存不当	复溶的标准品-20℃保存（避免反复冻融），其他组分 4℃保存，TMB 注意避光
	终止问题	测量读数前需在所有孔中加入 Stop solution 终止

免责声明

本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

Not for further distribution without written consent.Copyright © Abbkine, Inc.