EliKine™ 大鼠C反应蛋白（CRP）ELISA定量试剂盒（一步法）

Cat #: KTE4034 Size: 48 T/96 T

	大鼠 C 反应蛋白（CRP）ELISA 定量试剂盒（一步法）		
REF	**货号：**KTE4034	LOT	**批号：**见产品标签
	检测范围：0.5 ng/mL-40 ng/mL		**灵敏度：**0.1 ng/mL
	精密度：板内变异系数<10%, 板间变异系数<10%		**回收率：**范围从 98%到 116%，平均回收率 106%
	特异性：检测具有高灵敏度和优良的特异性。未观察到和大鼠 C 反应蛋白类似物之间的显着交叉反应或干扰。		
	适用样本：血清、血浆、组织、细胞上清及相关液体样本		
	保质期：4℃，避光保存 6 个月		

原理

EliKine™ 大鼠 C 反应蛋白（CRP）ELISA 定量试剂盒（一步法）采用双抗体夹心法测定标本中大鼠 C 反应蛋白（CRP）水平。用抗大鼠 C 反应蛋白（CRP）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，然后依次加入生物化的检测抗体和链霉亲和素-HRP，形成抗体-抗原-抗体-酶复合物，经过彻底洗涤后加入显色底物（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，大鼠 C 反应蛋白（CRP）浓度与 OD 450 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	
Rat CRP Microplate	48 wells	96 wells	4℃
Rat CRP Standard (80 ng/mL)	0.6 mL	0.6 mL	4℃
Standard Diluent	2 mL	2 mL	4℃
Rat CRP Detect Antibody	0.7 mL	1.5 mL	4℃
Streptavidin-HRP	3 mL	6 mL	4℃
HRP Substrate A	3 mL	6 mL	4℃，避光保存
HRP Substrate B	3 mL	6 mL	4℃，避光保存
Stop Solution	3 mL	6 mL	4℃
Wash Buffer	20 mL (20×)	20 mL (30×)	4℃
Plate Covers	2	2	室温

Abbkine, Inc • • www.abbkine.com
Not for further distribution without written consent.Copyright © Abbkine, Inc.

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、PBS

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。
Rat CRP Standard: 即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。
Rat CRP Detect Antibody：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。
Streptavidin-HRP：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。
HRP Substrate A：即用型；使用前，平衡到室温；4℃避光保存。
HRP Substrate B：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: Wash Buffer 使用前平衡到室温，48 T 用去离子水将 Wash Buffer 稀释 20 倍，96 T 用去离子水将 Wash Buffer 稀释 30 倍得到 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 80 ng/mL 标准品稀释为 40、20、10、5、2.5 和 0 ng/mL 的 Rat CRP 标准品。

序号	标准品体积	Standard Diluent 体积（μL）	标准品浓度（ng/mL）
Std.1	150 μL of 80 ng/mL	150	40
Std.2	150 μL of Std.1 (40 ng/mL)	150	20
Std.3	150 μL of Std.2 (20 ng/mL)	150	10
Std.4	150 μL of Std.3 (10 ng/mL)	150	5
Std.5	150 μL of Std.4 (5 ng/mL)	150	2.5
Std.6	0	150	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。
4. 组织：称取 0.1 g 组织，加入 0.9 mL 冰预冷的 0.01M pH7.4 的 PBS（可加入蛋白酶抑制剂）冰浴匀浆，收集匀浆液 4℃，10,000 g 离心 10 min，取上清立即测定或分装-20℃保存，避免反复冻融。
5. 细胞：贴壁细胞用冷的 PBS 轻轻清洗，然后用胰蛋白酶消化，1,000 g 离心 5min 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 10^6 个细胞中加入个细胞中加入 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）并通过冰浴超声破碎 2 min（功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，重复 12 次）。将提取液于 4℃，10,000 g 离心 10min，取上清立即测定或者分装-20℃保存，避免反复冻融。
6. 尿液、唾液等其他液体生物样本：3,000 g 离心 10min，取上清立即测定或者分装-20℃保存，避免反复冻融。

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。

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

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. 加样：分别设空白孔（空白对照孔不加样品、Rat CRP Detect Antibody 及 Streptavidin-HRP，其余各步操作相同）、待测样品孔。在酶标包被板上待测样品孔中先加入 40 μL 样品，然后再加入 10 μL Rat CRP Detect Antibody。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。标准孔依次加入 50 μL 不同浓度的标准品。（注意：标准品中已经预加 Rat CRP Detect Antibody，无需再加。）
3. 加 HRP：每孔加入 50 μL Streptavidin-HRP，空白孔除外，给酶标板覆膜，在 37℃下孵育 30 min。
4. 除去每孔中的液体并洗涤。可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，重复 5 次。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。
5. 每孔先加入 50 μL HRP Substrate A，再加入 50 μL HRP Substrate B，轻轻震荡混匀，37℃避光显色 10 min。
6. 每孔加入 50 μL Stop Solution，Stop Solution 应按照与 HRP Substrate 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。
7. 在 15 min 内，测定每孔 450 nm 处的吸光值。

结果计算

1. 计算每个标准品和样品的复孔平均 OD 值，并减去空白孔平均 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ΔOD 值为 y 轴，绘制标准曲线。可以使用作图软件来创建标准曲线。将样品的ΔOD 值代入曲线方程式，计算得出样品的浓度。

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（$R^2 \geqslant 0.99$）

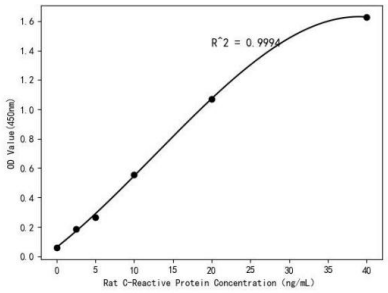


Figure1. 96 孔板分析的 Rat CRP 标准曲线。数据和曲线仅供参考，实验者需根据自己的实验建立标准曲线

注意事项

1. 如果 Standard Diluent 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

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

	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	HRP Substrate A 和 HRP Substrate B 注意避光保存, 避免冷冻。
	终止问题	测量读数前需在所有孔中加入 Stop Solution 终止
稀释液沉淀	稀释液中有沉淀或凝结	稀释液缓慢加热至 37℃，沉淀可以复溶

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.