EliKine™ 人脯氨酸4-羟化酶β亚基 ELISA定量试剂盒

Cat #: KTE3103 Size: 48 T/96 T

	人脯氨酸 4-羟化酶β亚基 ELISA 定量试剂盒		
REF	**货号：**KTE3103	LOT	**批号：**见产品标签
	检测范围：0.16 ng/mL-100 ng/mL		**灵敏度：**0.16 ng/mL
	精密度：板内变异系数<10%, 板间变异系数<12%		**回收率：**范围从 77%到 104%，平均回收率 93%
	特异性：检测具有高灵敏度和优良的特异性。未观察到和人脯氨酸 4-羟化酶β亚基 ELIS 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

蛋白质二硫键异构酶，又称脯氨酸 4-羟化酶β亚基(P4HB)、细胞甲状腺激素结合蛋白(p55)和谷胱甘肽-胰岛素转氢酶，是一种外周膜蛋白， 属于蛋白二硫键异构酶家族。 它包含两个硫氧还蛋白结构域，催化二硫键的形成、断裂和重排。P4HB 定位于淋巴细胞表面 CD4 富集区附近。 在黑素小体组分中，P4HB 可降低并激活 HIV-1 gp120 表面蛋白的融合特性，从而使 HIV-1 进入细胞。P4HB 作为一种伴侣，抑制错误折叠蛋白的聚集。P4HB 可能与其它分子伴侣参与了激素生物合成中 TG 前体的结构修饰。EliKine™ 人脯氨酸 4-羟化酶β亚基 ELISA 定量试剂盒采用双抗体夹心法来定量样品中的人脯氨酸 4-羟化酶β亚基。用抗人脯氨酸 4-羟化酶β亚基的特异性抗体包被于酶标板上，将样品或标准品和 HRP 标记的特异性检测抗体加入酶标板的孔中，其中的人脯氨酸 4-羟化酶β亚基会与包被在板上的固相抗体结合和检测抗体结合。在洗涤后，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，P4HB 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 P4HB Microplate	48 wells	96 wells	4℃
Human P4HB Standard (lyophilized)	1	2	4℃
Standard Diluent	5 mL	5 mL	4℃
Assay Buffer (10×)	5 mL	5 mL	4℃
HRP-conjugated Human P4HB Detect Antibody (100×)	1	1	4℃
HRP Substrate (TMB)	6 mL	11 mL	4℃，避光保存

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

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，HRP-conjugated Human P4HB Detect Antibody (100×)。

Human P4HB Standard: 加入标准品的标签上标注重悬体积的去离子水复溶 Human P4HB Standard 得到 20 ng/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×HRP-conjugated Human P4HB 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 HRP-conjugated Human P4HB Detect Antibody（100×）进行 1:100 稀释。1×HRP-conjugated Human P4HB Detect Antibody 应在稀释后 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，Wash Buffer (20×)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 20 ng/mL 标准品稀释为 10、5、2.5、1.25、0.63、0.31、0.16 和 0 ng/mL 的 Human P4HB 标准品。

序号	标准品体积	Standard Diluent 体积（μL）	标准品浓度（ng/mL）
Std.1	230 μL of 20 ng/mL	230	10
Std.2	230 μL of Std.1 (10 ng/mL)	230	5
Std.3	230 μL of Std.2 (5 ng/mL)	230	2.5
Std.4	230 μL of Std.3 (2.5 ng/mL)	230	1.25
Std.5	230 μL of Std.4 (1.25 ng/mL)	230	0.63
Std.6	230 μL of Std.5 (0.63 ng/mL)	230	0.31
Std.7	230 μL of Std.6 (0.31 ng/mL)	230	0.16
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

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

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。

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 80 µL 1×Assay Buffer 和 20 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）。
5. 加检抗，每孔加入 50 µL 1×HRP-conjugated Human P4HB Detect Antibody，保证步骤 3、4、5 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 3 h。
6. 重复步骤 2 中的洗涤 6 次。
7. 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。
8. 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。
9. 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（$R^2 \geq 0.99$）

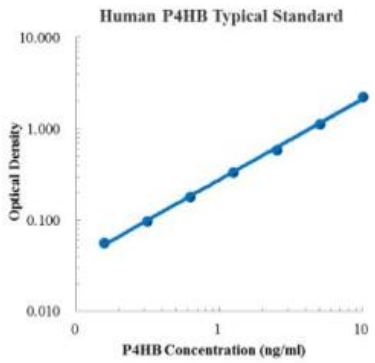


Figure1. 96 孔板分析的 Human P4HB 标准曲线。数据和曲线仅供参考，实验者需根据自己的实验建立标准曲线

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

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
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.