小鼠补体成分 5a(C5a)ELISA 试剂盒

货号： PMK1424ES
保存： 2-8℃避光保存 6 个月
规格： 48T/96T
检测范围： 62.5-4000pg/mL　**灵敏度：** 37.5pg/mL
精密度： 板内变异系数<10%，板间变异系数<10%
回收率范围： 80-120%
特异性： 检测具有高灵敏度和优良的特异性。未观察到和小鼠补体成分 5a(C5a)类似物之间的显着交叉反应或干扰。
适用样本： 血清、血浆、组织匀浆、细胞裂解液、细胞培养上清和其他生物体液

检测原理

该试剂盒采用双抗夹心酶联免疫吸附法原理。酶标板预包被亲和纯化的抗小鼠 C5a 的抗体。将含有小鼠 C5a 的样品或标准品加入到酶标板中，与包被抗体反应。再加入生物素标记的检测抗体，并与酶标板上捕获的小鼠 C5a 结合。接着，加入链霉亲和素-辣根过氧化物酶（SA-HRP）以形成固相抗体-小鼠 C5a-生物素标记抗体-SA-HRP 的夹心复合物。然后，将 TMB 溶液加入孔中并进行孵育，酶促反应产生蓝色物质，加入终止液后，变成黄色。在 450nm 波长下测定吸光值。最后通过建立标准曲线，根据 OD 值来计算样品中小鼠 C5a 的浓度。

试剂盒组成及保存

未拆封的试剂盒可在 2-8 ℃保存 6 个月；如果开封使用后，请按照下表中的条件分别保存各组分。

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
预包被微孔板	48 孔	96 孔	-20℃
标准品	冻干粉，1 支	冻干粉，2 支	-20℃
检测试剂 A(生物素化抗体 100×)	60μL	120μL	-20℃
检测试剂 B(SA-HRP 酶结合物 100×)	60μL	120μL	-20℃
标准品/样品稀释液	10mL	20mL	2-8℃
检测试剂 A 稀释液	6.5mL	13mL	2-8℃
检测试剂 B 稀释液	6.5mL	13mL	2-8℃
洗涤液（25×）	15mL	30mL	2-8℃
底物溶液（TMB）	5mL	10mL	2-8℃避光保存
终止液	5mL	10mL	2-8℃
封板膜	2 张	4 张	室温
说明书	1 份	1 份	室温

自备耗材

酶标仪（能测 450nm 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

注意：各组分（小管试剂）开盖前，请先低速离心。

1.使用前将所有试剂平衡至室温(18-25℃)。按照酶标仪说明书进行设置检测波长为 450nm，并在读板前预热 15 分钟。

2.洗涤液:取浓缩洗涤液，根据检测数量，用去离子水或蒸馏水 1：24 稀释，混匀后备用（浓缩洗涤液如有结晶可 40℃水浴溶解后再使用）。

3.检测试剂 A 工作液：实验前计算所需量(100μL/孔)。在准备工作中，应该准备比计算量稍微多一点（多 100-200μL）。使用前 15 分钟，将原液管离心，用检测试剂 A 稀释液将 100×浓缩检测试剂 A 稀释至 1×工作液（如：10μL 检测试剂 A + 990μL 检测试剂 A 稀释液）。

4.检测试剂 B 工作液：实验前计算所需量(100μL/孔)。在准备工作中，应该准备比计算量稍微多一点（多 100-200μL）。使用前 15 分钟，将原液管离心，用检测试剂 B 稀释液将 100×浓缩检测试剂 B 稀释至 1×工作液（如：10μL 检测试剂 B + 990μL 检测试剂 B 稀释液）。

5.标准工作液：首先，标准品 1000×g 离心 1min，加入 1mL 标准品/样品稀释液，使其静止 10min 再轻柔混匀，这就是 4000pg/mL 工作储备液,然后取 7 个 EP 管，每管内加入 500μL 标准品/样品稀释液。吸取 500μL 4000pg/mL 标准品稀释液到第一个管内再混匀即为 2000pg/mL 工作液。按照下表将 500μL 的溶液从前管移到后管中。在下一次转移前，将每管彻底混匀。设定 7 个梯度稀释标准品如 4000pg/mL,2000pg/mL,1000pg/mL,500pg/mL,250pg/mL,125pg/mL,62.5pg/mL, 最后 1 个装有标准品/样品稀释液的 EP 管是空白对照作为 0pg/mL。

	标准品体积	标准品/样品稀释液体积（μL）	标准品浓度（pg/mL）
Std.1	1000μL 4000pg/mL	0	4000
Std.2	500μL of Std.1 (4000pg/mL)	500	2000
Std.3	500μL of Std.2 (2000pg/mL)	500	1000
Std.4	500μL of Std.3 (1000pg/mL)	500	500
Std.5	500μL of Std.4 (500pg/mL)	500	250
Std.6	500μL of Std.5 (250pg/mL)	500	125
Std.7	500μL of Std.6 (125pg/mL)	500	62.5
Blank	0	500	0

注意：每次实验，请使用新配制的标准品，工作储备液可 2-8℃保存一周。

样品收集

血清：让血样在室温下凝结 2 小时或在 2-8℃下过夜，然后在 2-8℃下 2000× g 离心 15 分钟。随后立即取上清液进行检测，或存储在-20℃或-80℃备用。

血浆：使用 EDTA 或肝素作为抗凝剂收集血浆。采集后 30 分钟内，在 2-8℃,2000×g 条件下离心样品 15 分钟，随后立即取上清液进行检测，或存储在-20℃或-80℃下备用。

组织匀浆：应在预冷的 PBS 中冲洗组织，彻底清除多余的血液，称重，切成小块。然后在冰上的采用玻璃匀质器在 PBS（组织重量（g）：PBS（mL）体积=1：9）中均质化组织块。使用超声波细胞破碎机对所得匀质悬浮液进行超声处理，直到溶液澄清。然后将匀浆在 10000×g 下离心 5 分钟。随后立即取上清液进行检测，或存储在-20℃或-80℃下备用。

细胞裂解物：对于粘附细胞，用适量预冷的 PBS 轻轻清洗细胞，并用胰蛋白酶分离细胞。以 1000×g 离心 5 分钟收集细胞（悬浮细胞可直接离心收集）。弃上清，用冷 PBS 清洗细胞 3 次。以浓度为 5×10^6 个细胞/1mL 预冷 PBS 重新悬浮细胞。重复冻融数次，直到细胞完全溶解。1500×g，2-8℃离心 10min。随后立即取上清液进行检测，或存储在-20℃或-80℃下备用。

细胞培养上清和其他生物体液：在 1500×g，2-8℃条件下离心样品 15 分钟。随后立即取上清液进行检测，或存储在-20℃或-80℃下备用。

注意：不要使用严重溶血或脂血的标本。如果样品要在 6 天内使用，则可以将其储存在 2-8℃，长期保存需分装存储在-20℃或-80℃，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。实验之前建议

选择 2-3 个预期差异大的样本用标准品/样品稀释液稀释几个不同倍数做预实验确定合适的稀释倍数，计算结果乘以稀释倍数。

实验步骤

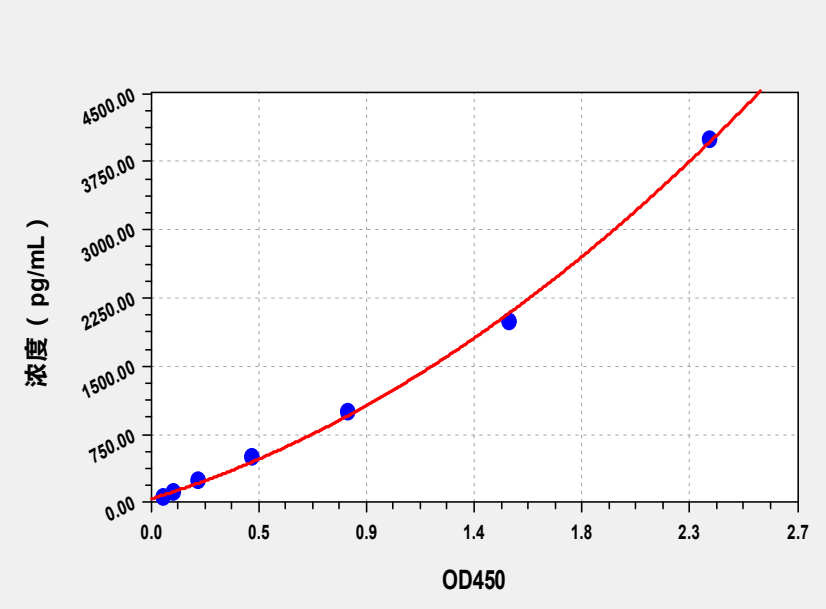
1. 从板框上取下待用的微孔板条，将剩余的板条放回装有干燥剂的铝箔袋中，然后重新密封保存。
2. 将标准工作溶液加入前两列，每个浓度设置一个复孔(每孔 100μL)。其余孔加入 100μL 待测样本(建议通过预实验确定待检样本的稀释倍数)。盖上试剂盒提供的封板膜。37℃孵育 90 分钟。
3. 手工洗板：弃去每孔中的液体，每孔加入 350μL 洗涤液。浸泡 30 秒再倒出每孔中液体并在干净的吸水纸上拍干。重复这个洗涤步骤，共 3 遍。洗板机洗板：选择洗涤 3 次程序洗板后拍干。
4. 向每孔中加入 100μL 的检测试剂 A 工作液。盖上封板膜。37℃孵育 60 分钟。
5. 弃去每孔中的液体，重复步骤 3 的洗涤过程 3 遍。
6. 向每孔中加入 100μL 的检测试剂 B 工作液。盖上封板膜。37℃孵育 30 分钟。
7. 弃去每孔中的液体，重复步骤 3 的洗涤过程 3 遍。
8. 每孔加底物溶液(TMB)100μL。盖上新的封板膜。37℃避光孵育 10-20 分钟（当标品浓度梯度后三孔有明显蓝色梯度，前三孔的梯度不明显时即可终止）。
9. 每孔加入 50μL 的终止液，顺序与加入底物溶液(TMB)的顺序一致，轻轻晃动混匀。
10. 确保酶标板孔底无气泡水雾等，立即在 450nm 测量每孔的吸光度 OD 值。

计算

每个标准品和样品的重复读数分别取平均值，然后减去零孔 OD 的平均值。以 x 轴为 OD 值，y 轴为标准品浓度。拟合一条标准曲线，将样本减去零孔后的 OD 值作为 x 带入计算 y（浓度） 。如果样品被稀释，从标准曲线上读出的浓度必须乘以稀释系数。

结果展示

典型标准曲线（R^2≥0.99）



小鼠补体成分 5a(C5a)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. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。终止液有一定的腐蚀性，操作时请做好防护措施。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。收到试剂盒后，未开封的试剂盒可在 2-8℃下保存 1 个月。如果试剂盒在 1 个月内不使用，请在收到试剂盒后，将每个组件分别存放在上表中指示的温度下。

4. 新打开的 ELISA 酶标板可能含有水雾样物质，此为正常现象，不会对实验结果产生任何影响。未用完的板条应立即放回装有干燥剂的铝箔袋中，重新密封并在-20℃下存储。
5. 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。
6. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。
7. 溶解含有蛋白质溶液时，应始终避免起泡。
8. 不得重复使用稀释后的工作液。
9. 为了得到准确的实验结果，在孵育过程中，必须确保封板膜将酶标板密封。
10. 在使用自动洗板机时，添加清洗缓冲液后，在清洗步骤之间添加 30 秒的浸泡时间可提高分析精度。
11. 底物溶液保存过程中应为无色，加入到酶标板中之后底物溶液应从无色变为渐变蓝色。
12. 终止液应按照与加底物溶液(TMB)相同的顺序添加到酶标板中。添加终止液后，孔中溶液的颜色将从蓝色变为黄色。绿色的孔表明终止液未与底物溶液充分混合，应轻拍孔板使其混匀。

疑难解答

问题	可能原因	解决措施
标曲线性不好	标准品稀释不正确	确保标准品按照推荐方法溶解和稀释
	移液不准确	定期校准移液器并检查枪头密封性
	反应液蒸发	用封板膜密封酶标板
	洗板不彻底	足够的洗涤次数和加入足量洗涤液
	孔底有异物	读数前清洁板底
显色弱或无	试剂反应不充分	确保孵育时间并按推荐温度孵育
	试剂体积添加不足	检查移液器并严格按照操作步骤操作
	稀释不正确	检查试剂稀释步骤
	酶结合物失活	混合酶结合物和底物，通过显色反应检查
OD 值低	酶标仪设置不正确	检查仪器波长
	没加终止液	加入适量终止液
	读板时等待时间太长	及时读板
背景高	显色液被污染	更换显色液
	显色时间太长	控制显色时间
	反应试剂稀释错误	使用推荐稀释方法
	洗板不彻底	足够的洗涤次数和加入足量洗涤液

相关产品：

PMK1477 小鼠 C 反应蛋白(CRP)ELISA 试剂盒
PMK1478 小鼠瘦素(LEP)ELISA 试剂盒
PMK1479 小鼠表皮生长因子(EGF) ELISA 试剂盒

更多产品详情了解，请关注公众号：