

人凝血因子IX(FIX)酶联免疫试剂盒

使用说明

【产品编号】CSB-E08443h

【预期应用】ELISA 法定量测定人血清、血浆中 FIX 含量。

【产品性能指标】

- 1、 检测范围：25 ng/ml-400 ng/ml
- 2、 灵敏度：12.5 ng/ml
- 3、 精密度：批内差 CV%<12%，批间差 CV%<15%
- 4、 特异性：本试剂盒特异性检测人 FIX，且与其他相关蛋白无交叉反应。

【实验原理】

用纯化的 FIX 包被微孔板，制成固相载体，往包被 FIX 的微孔中依次加入标本或标准品、HRP 标记的抗 FIX 抗体，经过彻底洗涤后用底物 TMB 显色。TMB 在过氧化物酶的催化下转化成蓝色，并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样本中的 FIX 呈负相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度（OD 值），计算样本浓度。

【试剂盒组成成分】

组份	装量
酶标板 (Assay plate)	96 孔
标准品 (Standard)	2 瓶 (冻干品)
辣根过氧化物酶标记物 (HRP-conjugate)	1 x 60 μ l/瓶 (100 $\times$)
辣根过氧化物酶标记物稀释液 (HRP-conjugate Diluent)	1 x 10 ml/瓶
样本稀释液 (Sample Diluent)	2 x 20 ml/瓶
浓洗涤液 (Wash Buffer)	1 x 20 ml/瓶 (25 $\times$)
底物溶液 (TMB Substrate)	1 x 10 ml/瓶
终止液 (Stop Solution)	1 x 10 ml/瓶
板贴	4

【存储条件及有效期】

未开封试剂盒	试剂盒避光保存于2-8℃。有效期为六个月。 请在试剂盒标注的有效日期内使用。	
开封试剂盒	预包被的酶标板	酶标板打开后应置于干燥剂的铝箔袋中置于2-8℃密封防潮保存。有效期内2-8℃条件下最多可保存一个月。
	标准品	有效期内2-8℃条件下最多可保存一个月。 若近期不使用，最好保存在-20℃。
	辣根过氧化物酶标记物	
	辣根过氧化物酶标记物稀释液	有效期内2-8℃条件下最多可保存一个月。
	样本稀释液	
	浓洗涤液	
	底物溶液	
	终止液	

【所需试剂和器材】

标准规格酶标仪；高速离心机；电热恒温培养箱；干净的试管和离心管；容量瓶；
系列可调节移液器及吸头；多通道移液器；蒸馏水 等

【样本采集及保存】

- 1、 血清：全血标本请于室温放置2小时或4℃过夜后于1000g离心15分钟，取上清即可立即检测；或进行分装，并将标本放于-20℃或-80℃保存，但应避免反复冻融。解冻后的样本应再次离心，然后检测。
- 2、 血浆：可用EDTA或肝素作为抗凝剂，标本采集后30分钟内于2-8℃1000g离心15分钟，取上清即可立即检测；或进行分装，并将标本放于-20℃或-80℃保存，但应避免反复冻融。解冻后的样本应再次离心，然后检测。

注：标本溶血会影响最后检测结果，因此溶血标本不宜进行此项检测。

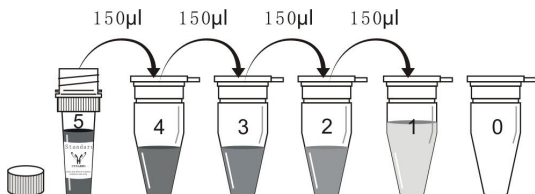
【样本稀释】

血清，血浆样本用样本稀释液进行1:200倍稀释后进行检测，具体操作如下：取5μl样本加入到45μl的样本稀释液（1:10稀释）中混匀。再从上述稀释液中取15μl加入到285μl样本稀释液（1:20稀释）中混匀。二步完成后得到的即为1:200倍稀释后的样本。此推荐稀释倍数仅供参考，用户应根据实验自行确定其最优稀释倍数。

【试剂配制】

1、 标准品

- (1) 从试剂盒中取出一支标准品，于 6000-10000rpm 离心 30 秒。用 1ml 样本稀释液溶解，并用枪头对准冻存管底部反复吸打 5 次以助溶解，充分混匀得到标准品 S5，放置备用。
- (2) 取 5 个 1.5 ml 离心管(S0-S4)依次排列，各加入 150 μ l 样本稀释液。吸取 150 μ l 标准品 S5 到第一个离心管中(S4)，轻轻吹打混匀。从 S4 中吸取 150 μ l 到第二个 EP 管中(S3)，轻轻吹打混匀。以此类推进行标准品的倍比稀释。S0 为样本稀释液。



【标准品浓度】

编号	S5	S4	S3	S2	S1	S0
ng/ml	400	200	100	50	25	0

2、 洗液工作液

浓洗涤液按1:25倍用去离子水进行稀释。例如用量筒量取480ml去离子水，倒入烧杯或其他洁净容器中，再量取20ml浓洗涤液，均匀加入，搅拌混匀，在临用前配妥。浓洗涤液低温保存会有盐析出，稀释时可在水浴中加温助溶。

3、 辣根过氧化物酶标记物工作液

辣根过氧化物酶标记物按1:100倍用辣根过氧化物酶标记物稀释液进行稀释。如10 μ l辣根过氧化物酶标记物加990 μ l辣根过氧化物酶标记物稀释液，轻轻混匀，在临用前10分钟内配妥。

【重要提示】

- 1、实验开始前，请提前配置好所有试剂。试剂或样本稀释时，均需混匀，混匀时尽量避免起泡。
- 2、用户在初次使用试剂盒时，应将各种试剂管离心数分钟，以便管盖和管壁上的液体集中到管底。
- 3、在配制标准品、检测溶液工作液时，请以相应的稀释液配制，不能混淆。
- 4、**因实际装量多于标示装量，配制工作试剂请用精准的计量工具（移液枪或量筒等）量取，切勿不经量取直接使用。**
- 5、标准品、辣根过氧化物酶标记物工作液稀释前根据预先计算好的每次实验所需的总量配制，实际配制时应多配制 0.1-0.4ml。请勿重复使用已稀释过的标准品或辣根过氧化物酶标记物工作液。
- 6、标准品的稀释请勿于板中进行，标准品应于临用前 15 分钟内配制。为保证实验有效性，建议每次实验使用新的标准品。若保存得当，溶解后的标准品 S5 可在 2-8℃ 保存，7 天内使用有效。

【操作步骤】

- 1、将各种试剂移至室温（18-25℃）平衡至少 30 分钟，按前述方法配制试剂，备用。
- 2、加样：分别设空白孔、标准品孔、待测样本孔。空白孔不加任何溶液。其余每孔分别加标准品或待测样本 50 μ l。立即加入辣根过氧化物酶标记物工作液 50 μ l(空白孔不加)。轻轻晃动混匀，覆上板贴，37℃温育 60 分钟。
- 3、弃去孔内液体，甩干，洗板 5 次。每次浸泡 2 分钟，250 μ l/孔，甩干。
- 4、依序每孔加底物溶液 90 μ l，37℃避光显色 20 分钟。
- 5、依序每孔加终止溶液 50 μ l，终止反应。
- 6、在反应终止后 5 分钟内用酶标仪在 450nm 波长依序测量各孔的光密度（OD 值）。

【操作要点】

- 1、 为保证检测结果的准确性，建议标准品及样本均设双孔测定。每次检测均需做标准曲线。
- 2、 如标本中待测物质含量过高，请先用样本稀释液进行稀释，以使样本符合试剂盒的检测范围，最后计算时再乘以相应的稀释倍数。
- 3、 **加样**：加样时，请使用一次性的洁净吸头，避免交叉污染。加样时应尽量轻柔，避免起泡，将样本加于酶标板孔底部，切勿沿孔壁加样。一次加样时间最好控制在 10 分钟内，如标本数量多，推荐使用排枪加样。
- 4、 **温育**：为防止样本蒸发或污染，温育过程中酶标板必须覆上板贴，实验过程中酶标板应避免处于干燥的状态。温育过程中应随时观察温箱温度是否恒定于 37℃，及时调整。温育过程中，温箱不易开启太多次，以免影响温度平衡。
- 5、 **洗涤**：洗涤过程非常重要，不充分的洗涤易造成假阳性。
 - (1) 手工洗板方法：吸去（不可触及孔壁和孔底）或甩掉酶标板内的液体；在实验台上铺垫几层吸水纸，酶标板朝下轻拍几次；将推荐的洗涤缓冲液按 250μl/孔注入孔内，浸泡 2 分钟。根据操作步骤中所述，重复此过程数次。
 - (2) 自动洗板：如果有自动洗板机，应在熟练使用后再用到正式实验过程中。
- 6、 **显色**：为保证实验结果的准确性，底物反应时间到后应尽快加入终止液。可在加入底物溶液后每隔一段时间观察一下显色情况以控制反应时间（比如每隔 10 分钟）。当肉眼可见标准品前 3-4 孔有明显梯度蓝色，后 3-4 孔显色不明显时，即可加入终止液终止反应，此时蓝色立刻变为黄色。终止液的加入顺序应尽量与底物溶液的加入顺序相同。
- 7、 底物溶液应为浅蓝色或无色，如果颜色严重变深则必须弃用。底物溶液易受污染，请避光妥善保存。

【数据处理】

可将标准品及样本值减去空白孔数值后绘制曲线，如果设置复孔，则应取其平均值计算。以标准品的浓度为纵坐标（对数坐标），OD 值为横坐标（对数坐标），在对数坐标纸上绘出标准曲线。推荐使用专业制作曲线软件进行分析，可从我们的网站下载专业软件"Curve Expert"，并根据提示制作标准曲线。根据样本 OD 值，由标准曲线查出相应的浓度；或用标准品的浓度与 OD 值计算出标准曲线的回归方程式，将样本的 OD 值代入方程式，计算出样本浓度。若样本检测前进行过稀释，最后计算时需乘以相应的稀释倍数，即为样本的实际浓度。

【说明】

- 1、 本试剂盒仅供研究使用。
- 2、 中、英文说明书可能会有不一致之处，请以英文说明书为准。
- 3、 不同批号试剂不能混用。不要用其它生产厂家的试剂替换试剂盒中的试剂。
- 4、 刚开启的酶标板孔中可能会含有少许水样物质，此为正常现象，不会对实验结果造成任何影响。