# 货号 ENMK06444

# Human Bravo, Cotinine, Cryα, Cryβ 多因子 ELISA 试剂盒

| 检测指标 | 检测范围 | 灵敏度 | 检测时长 |
|---|---|---|---|
| Bravo | 0.156-10 ng/mL | 0.052 ng/mL | 4 小时 |
| Cotinine | 0.078-5 ng/mL | 0.026 ng/mL | 4 小时 |
| Cryα | 0.156-10 ng/mL | 0.052 ng/mL | 4 小时 |
| Cryβ | 0.156-10 ng/mL | 0.052 ng/mL | 4 小时 |
| **检测指标** | **板内精密度** | **板间精密度** | **回收率范围** |
| Bravo | CV ≤ 5% | CV ≤ 9% | 85-97% |
| Cotinine | CV ≤ 5% | CV ≤ 9% | 78-100% |
| Cryα | CV ≤ 6% | CV ≤ 9% | 85-95% |
| Cryβ | CV ≤ 7% | CV ≤ 9% | 84-107% |

| 规格 | 详情 |
|---|---|
| 样本类型及每孔所需体积 | 血清（100 μL）、血浆（100 μL）、细胞培养上清液（100 μL）、尿液（100 μL）等 |
| 储存条件 | -20℃（长期）；短期可 2-8℃保存，最长 2 周 |
| 用途 | 用于样本中 Bravo、Cotinine、Cryα、Cryβ 的体外定量检测 |
| 规格 | 96T |
| 生产日期 | 标注于外包装 |
| 保质期 | -20℃保存 12 个月 |

本试剂盒用于血清、血浆、细胞培养上清液和组织匀浆样本中四种目标分析物的体外定量检测。如需检测其他特殊样本类型，请联系我们的技术支持团队。本试剂盒仅限研究使用（RUO）。使用前请仔细阅读说明书，并确认试剂盒所有组件完整无缺。

本试剂盒采用"双抗体夹心法"技术。双抗体夹心法的原理基于目标分析物至少具有两个不同表位的特点，可同时被预包被的捕获抗体和检测抗体识别。操作步骤如下：

1. 用捕获抗体包被微孔板，洗涤去除未结合的抗体和杂质。用无关蛋白封闭板上剩余的结合位点。
2. 封闭剩余结合位点后，加入含目标分析物的样本。目标分析物被特异性捕获抗体固定，形成抗原-抗体复合物。洗涤微孔去除未结合的颗粒和杂质。
3. 向微孔中加入针对四种目标分析物的生物素标记检测抗体，形成抗体-抗原-抗体复合物。再次洗涤微孔板以去除未结合的抗体和杂质。
4. 随后向微孔中加入辣根过氧化物酶-亲和素结合物（HRP-亲和素），与生物素标记抗体结合。报告酶的量与样本中目标分析物的量呈正相关。再次洗涤微孔以去除残留杂质。


For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

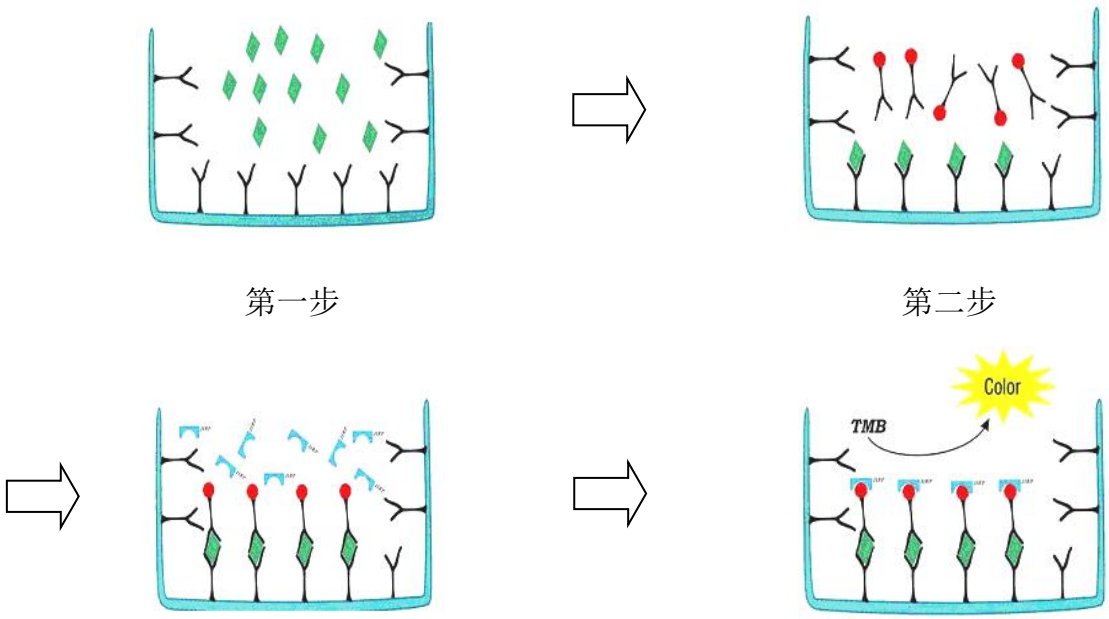
5. 最后加入辣根过氧化物酶（HRP）的底物，根据产生的颜色变化计算样本浓度。

注意：抗体可标记多个生物素基团，每个生物素均可与 HRP-亲和素结合，从而使每个抗体结合多个 HRP 复合物。与传统直接 HRP 标记抗体相比，该方法具有更高的灵敏度和更强的信号放大效果。

本试剂盒采用双抗体夹心 ELISA 技术。预包被微孔板分别包被抗 Bravo、Cotinine、Cryα 和 Cryβ 的单克隆抗体，检测试剂为针对四种分析物的混合生物素标记多克隆抗体。将样本和生物素标记抗体加入微孔板微孔中，每次孵育后用 PBS 或 TBS 洗涤缓冲液洗涤。随后向微孔中加入亲和素-过氧化物酶结合物。用 PBS 或 TBS 彻底洗去未结合的酶结合物后，加入 TMB 底物显色。

TMB 被过氧化物酶氧化产生蓝色产物，加入终止液（显色剂 C）后溶液变为黄色。颜色强度与样本中目标分析物的浓度呈正相关。

双抗体夹心法原理示意图：




第一步　第二步

第三步　第四步

**试剂盒组成**

| 名称 | 96 孔 | 48 孔 | 储存条件 |
|---|---|---|---|
| Bravo(1-3)、Cotinine(4-6)、Cryα (7-9)、Cryβ (10-12) 预包被板 | 8×12 | 8×6 | 2-8℃或-20℃ |
| Bravo、Cotinine、Cryα 、Cryβ 预混标准品 | 2 支 | 1 支 | 2-8℃或-20℃ |
| 生物素标记 Bravo、Cotinine、Cryα 、Cryβ 预混抗 | 1 支 | 1 支 | 2-8℃或-20℃ |


For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

| | | | |
|---|---|---|---|
| 体（1:100） | | | |
| 酶结合物（1:100） | 1 支 | 1 支 | 2-8℃或-20℃ |
| Bravo、Cotinine、Cryα、Cryβ标准品稀释液 | 1 支 | 1 支 | 2-8℃或-20℃ |
| Bravo、Cotinine、Cryα、Cryβ抗体稀释液 | 1 支 | 1 支 | 2-8℃或-20℃ |
| 酶稀释液 | 1 支 | 1 支 | 2-8℃或-20℃ |
| 样本稀释液 | 1 支 | 1 支 | 2-8℃或-20℃ |
| 洗涤缓冲液（1:25） | 1 支 | 1 支 | 2-8℃或-20℃ |
| 显色剂 A | 1 支 | 1 支 | 2-8℃或-20℃ |
| 显色剂 B | 1 支 | 1 支 | 2-8℃或-20℃ |
| 显色剂 C | 1 支 | 1 支 | 2-8℃或-20℃ |
| 说明书 | 1 套 | 1 套 | 室温 |

注释：

RT：室温

标准品：冻干

显色剂 A：避光保存

**需要但未随试剂盒提供的材料**

1. 酶标仪（配备 450 nm 检测波长滤光片；建议使用 630 nm 校正波长滤光片）
2. 洗板机（可调节加液量，确保每孔加入 350 μL 且不溢出）
3. 超净台、生物安全柜、通风橱
4. 高精度单通道移液器（量程：0.5-10 μL、20-200 μL、200-1000 μL）
5. 高精度多通道移液器（8 道或 12 道，量程：50-300 μL）
6. 37℃恒温培养箱
7. 冷藏离心机
8. 冰箱（能维持 4℃、-20℃和-86℃温度）
9. 分析天平
10. 剪刀、镊子、钳子等
11. 摇床、低频振荡器等

**其他需要自备的材料**

1. 离心管（容量：1.5 mL、5 mL 等）
2. 一次性移液器吸头（量程：0.5-10 μL、20-200 μL、200-1000 μL）
3. 纯水或蒸馏水


For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

4. 半对数坐标纸

5. 吸水纸

6. EDTA、柠檬酸钠和肝素

**样本采集注意事项**

1. 采血管应无热原且无内毒素。
2. 不建议使用溶血或高血脂样本。
3. 样本应澄清透明；所有颗粒物必须通过离心去除。
4. 如采集的样本不能立即使用，应分装为单次使用量，冷冻保存于-20℃至-80℃。避免反复冻融。
5. 通常需要优化样本稀释比例，以确保样本浓度落在标准曲线的线性范围内。建议在对大批量样本进行检测前先进行预实验，确定最佳稀释比例。
6. 建议收集足够的样本量用于重复检测，以防意外情况导致数据丢失。
7. 采集或处理样本时始终穿戴防护装备（如手套、实验服、呼吸器等），并注意标本处理相关的所有潜在风险。
8. 标本处理应在维护良好的生物安全柜中进行。

**样本制备**

**血清：**将采集的全血置于 4℃冰箱过夜。然后以 1000-3000 rpm 离心 10 分钟。收集上清液，立即检测或保存于-20℃或-80℃冷冻 1-3 个月。

**血浆：**使用 EDTA、柠檬酸钠或肝素作为抗凝剂。将所选抗凝剂加入采集的全血中，充分混匀，然后分离血浆。以 1000-3000 rpm 离心血浆混合物 10 分钟。收集上清液，立即检测或保存于-20℃或-80℃冷冻 1-3 个月。

**组织匀浆：**取组织切片，用 0.01 M PBS 冲洗。按 1 g 组织加 5-10 mL 试剂的比例加入组织蛋白提取试剂，在冰浴中充分混匀。充分匀浆后，以 5000-10000 rpm 离心 10 分钟。收集上清液立即检测，或保存于-20℃或-80℃冷冻 1-3 个月。

**细胞培养上清液：**将采集的细胞培养上清液以 1000-3000 rpm 离心 10 分钟。收集上清液立即检测，或保存于-20℃或-80℃冷冻 1-3 个月。

**特殊样本（尿液、腹水、脑脊液等）：**将样本以 1000-3000 rpm 离心 10 分钟。收集上清液立即检测，或保存于-20℃或-80℃冷冻 1-3 个月。

**注意：**建议用户了解样本的预期浓度范围。建议查阅相关文献中类似样本的浓度范围，然后相应调整样本稀释比例。

**注意**

1. 复溶后的标准品不可储存；标准品复溶后不得再次冻融。
2. 由于运输过程中的震动或倒置，可能需要离心试剂盒管或瓶子以将所有内容物收集到底部。

应手动涡旋振荡或用 1000 rpm 离心 1 分钟。

3. 浓缩洗涤缓冲液可能略有结晶。可将缓冲液在水浴中加热以促进稀释时的溶解。使用前必须确保晶体完全溶解。
4. 配制好的标准品仅限单次使用；已检测过的标准品不得重复使用。如需重复检测，请使用提供的第二支标准品。
5. 仅使用本试剂盒提供的试剂和组件。不要混合不同批次或不同型号的试剂盒组件。
6. 确保所有试剂充分混匀。对于加入微孔板的试剂，充分混匀对获得准确的检测结果至关重要。建议使用微孔板摇床（设置最低频率）。如无摇床，可手动轻轻画圈摇动微孔板 1 分钟以确保各孔混合均匀。
7. 开始检测前，将试剂盒平衡至室温。
8. 建议所有标准品做双份或三份重复。
9. 短期不用的微孔板条请保存在原铝箔袋中，2-8℃保存。
10. 显色剂对光敏感；请避光保存。
11. 请勿使用过期的试剂盒。
12. 使用双波长检测时，设置波长为 450 nm 和 630 nm。
13. 所有样本、洗涤缓冲液和废弃物均应作为生物危害废物处理。显色剂 C 为 1 M 硫酸；请极其谨慎地处理该试剂。
14. 加样必须使用移液器或类似校准过的仪器进行。检测前校准仪器以避免实验误差。快速将样本加入微孔中，控制总加样时间在 5 分钟以内。建议使用多通道移液器以减少加样时间。
15. 请勿重复使用封板膜。如仅使用部分板条，请将封板膜裁剪至合适大小，使用后丢弃。
16. 每次独立检测必须重新绘制标准曲线。如果样本的检测浓度过高（即 OD 值高于最高浓度标准孔），请将样本稀释特定倍数后重新检测，并在最终计算时乘以稀释倍数。
17. 含叠氮钠（$NaN_3$ ）的样本不能进行检测，因为 $NaN_3$ 会抑制辣根过氧化物酶（HRP）的酶活性。
18. 使用洗板机时，确保每孔缓冲液量略多于 350 μL，并检查移液探针是否堵塞。如手动洗涤，用吸水纸吸去多余缓冲液，并确保吸水纸未与其他试剂接触以防止交叉污染。
19. 加入显色剂 C 终止显色反应后，10 分钟内读取 OD 值。
20. 对于做双份检测的样本，使用双孔的平均 OD 值进行计算。
21. 溶血样本可能导致假阳性结果，不适用于本试剂盒。
22. 检测过程中保持相对湿度约 60%。
23. 定期验证培养箱的校准，确保稳定的 37℃孵育温度。
24. 对于 48 孔 ELISA 试剂盒，所有组件的用量为 96 孔试剂盒的 50%。

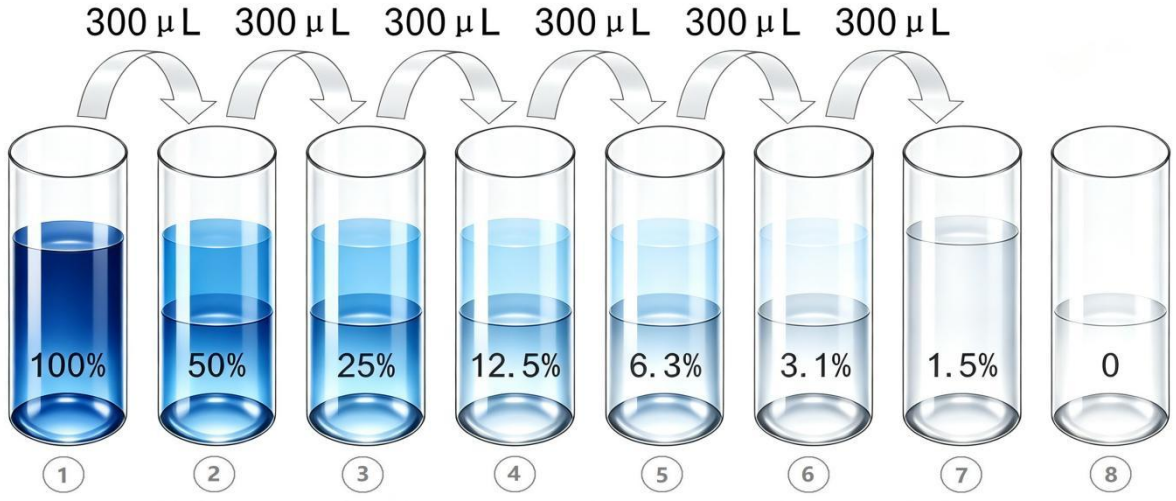

For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

## 检测准备

1. 提前 20 分钟从冰箱中取出 ELISA 试剂盒，平衡至室温后开始检测。
2. 用双蒸水将浓缩洗涤缓冲液按 1:25 比例稀释。未使用的部分放回原试剂盒盒中保存。
3. 标准品配制：向冻干标准品管中加入 1.0 mL 标准品稀释液，静置 30 分钟。标准品完全溶解后，轻轻颠倒混匀数次，并明确标记为 STD1。注意：确保冻干标准品完全溶解并充分混匀。
4. 标准品稀释操作：取 7 支干净试管，标记预期浓度（STD2、STD3、STD4、STD5、STD6、STD7、STD8）。每管加入 300 μL 标准品稀释液。从复溶的 STD1 中吸取 300 μL 加入标记为 STD2 的试管中混匀。然后从 STD2 管中吸取 300 μL 加入 STD3 管中混匀。依次类推至 STD7 管。STD8 管中的标准品稀释液作为阴性对照。

| 靶标 | STD1 | STD2 | STD3 | STD4 | STD5 | STD6 | STD7 | STD8 | 浓度 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Bravo | 10 | 5 | 2.5 | 1.25 | 0.625 | 0.313 | 0.156 | 0 | ng/mL |
| Cotinine | 5 | 2.5 | 1.25 | 0.625 | 0.313 | 0.156 | 0.078 | 0 | ng/mL |
| Cry α | 10 | 5 | 2.5 | 1.25 | 0.625 | 0.313 | 0.156 | 0 | ng/mL |
| Cry β | 10 | 5 | 2.5 | 1.25 | 0.625 | 0.313 | 0.156 | 0 | ng/mL |

注意：复溶的标准品溶液（STD1：Bravo 10 ng/mL、Cotinine 5 ng/mL、Cry α 10 ng/mL、Cry β 10 ng/mL）检测完成后应丢弃，不可重复使用。




注意：复溶的标准品原液不可重复使用。

5. 生物素标记抗体：根据检测孔数吸取适量生物素标记抗体溶液，用抗体稀释液按 1:100 比例稀释。稀释后充分混匀。提前 30 分钟配制此工作液，稀释后的溶液不可用于后续检测。
6. 酶结合物：根据检测孔数吸取适量酶结合物溶液，用酶稀释液按 1:100 比例稀释。稀释后充分混匀。提前 30 分钟配制此工作液，稀释后的溶液不可用于后续检测。
7. 显色剂：将显色剂 A 和显色剂 B 按 9:1 比例混合，提前 30 分钟配制显色剂工作液。

## 洗涤方法

1. 自动洗板：每孔使用 350 μL 洗涤缓冲液，注液和吸液间隔 20-30 秒。使用前请熟悉仪器操作手册。
2. 手动洗板：每孔加入 350 μL 洗涤缓冲液，静置 30 秒。剧烈振荡微孔板以尽可能去除液体，必要时在吸水纸上用力拍干。洗涤过程中注意加液步骤，避免交叉污染和漏洗。

## 操作步骤

1. 取出所需数量的微孔板条，平衡至室温。未使用的板条和干燥剂放回原密封铝箔袋中，2-8℃保存。
2. 预留空白孔（如使用双波长检测可省略空白孔）。
3. 向对应微孔中加入标准品或样本（每孔 100 μL）。注意 0 ng/mL 标准品孔应加入 100 μL 标准品稀释液。用封板膜封板，37℃孵育 90 分钟（避光）。
4. 提前 30 分钟配制所需量的生物素标记抗体。
5. 用提供的洗涤缓冲液洗涤 ELISA 板 2 次。
6. 向每孔加入配制好的生物素标记抗体（每孔 100 μL）。用封板膜封板，37℃孵育 60 分钟（避光）。
7. 提前 30 分钟配制所需量的酶结合物。
8. 用提供的洗涤缓冲液洗涤 ELISA 板 3 次。
9. 向除空白孔外的所有微孔中加入配制好的酶结合物（每孔 100 μL）。用封板膜封板，37℃孵育 30 分钟（避光）。
10. 用提供的洗涤缓冲液洗涤 ELISA 板 5 次。
11. 向每孔（包括空白孔）加入 100 μL 配制好的 TMB 底物溶液。37℃避光孵育 10-30 分钟。当最高浓度标准品孔出现明显显色且可见清晰颜色梯度时终止反应（显色反应时间不超过 30 分钟）。
12. 向每孔（包括空白孔）加入 100 μL 显色剂 C，充分混匀。10 分钟内以 450 nm 波长（或双波长检测 450 nm/630 nm）读取 OD 值。

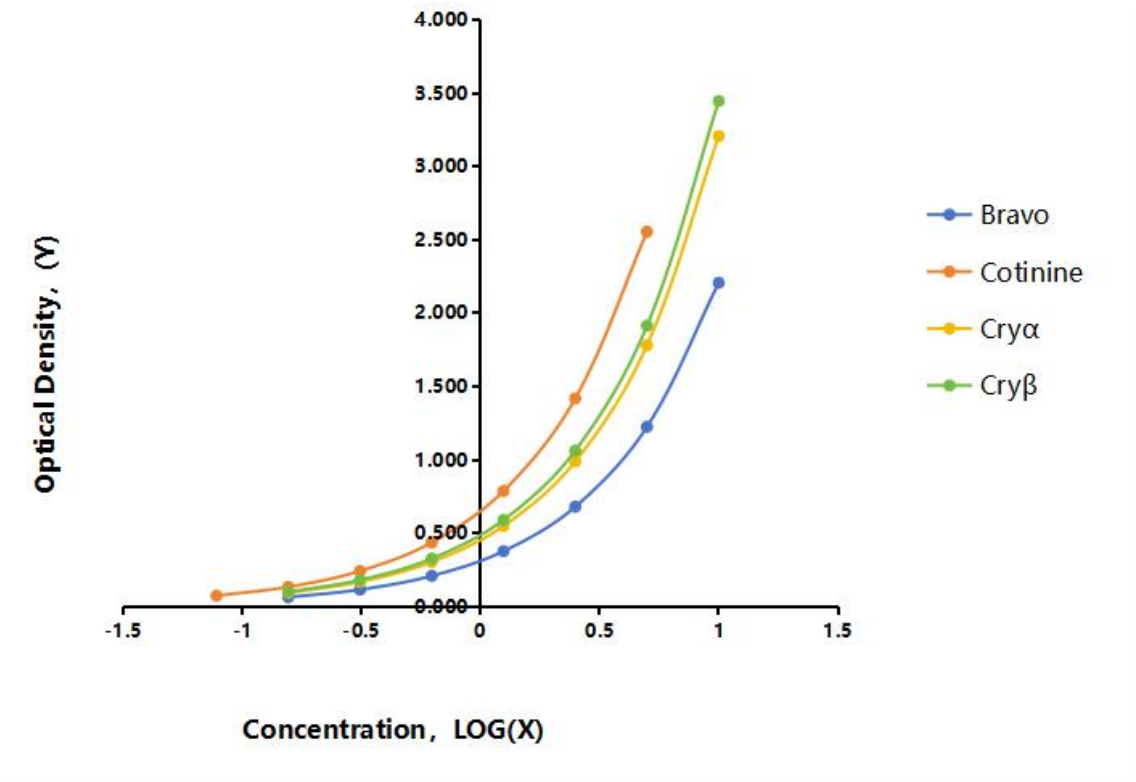
## 结果判定

1. 每个样本和标准品的 OD 值应减去空白孔的 OD 值进行校正。
2. 手动绘制标准曲线：以标准品浓度为 X 轴，对应 OD 值为 Y 轴绘制标准曲线。将绘制点用平滑曲线连接。将样本 OD 值代入标准曲线方程计算样本浓度。建议使用专业曲线拟合软件（如 Curve Expert 1.3）进行结果分析和计算。
3. 如果样本 OD 值高于标准曲线中最高浓度标准品的 OD 值，应将样本稀释（或进一步稀释）后重新检测。计算最终浓度时将测得浓度乘以稀释倍数。


For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

4. 标准曲线也可用对数转换浓度绘制，或在半对数坐标系中绘制。注意：本方案仅供参考。测试样本的浓度计算必须以同次实验产生的标准曲线为准。

**参考曲线**




注意：再次提醒，本图表仅供参考，用户样本浓度应以同次检测、同块微孔板上产生的标准曲线为准。

**操作流程汇总**

| 步骤 | 操作流程汇总 |
|---|---|
| 1 | 配制试剂、样本和标准品。 |
| 2 | 将配制好的样本和标准品加入对应微孔并封板。37℃孵育 90 分钟。 |
| 3 | 洗板 2 次。加入生物素标记抗体溶液并封板。37℃孵育 60 分钟。 |
| 4 | 洗板 3 次。加入配制好的酶结合物工作液并封板。37℃孵育 30 分钟。 |
| 5 | 洗板 5 次。加入 TMB 底物溶液，37℃避光孵育 10-30 分钟直至出现清晰的颜色梯度。 |
| 6 | 每孔加入显色剂 C 终止反应。 |
| 7 | 加入显色剂 C 后 10 分钟内用酶标仪在 450 nm 波长下读取 OD 值。 |


For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

| | |
|---|---|
| 8 | 计算测试样本的浓度。 |


For research use only. Not for use in diagnostic procedures.