

BSA 酶联免疫检测试剂盒说明书

1、试剂盒简介

此定量检测牛血清白蛋白 (BSA) 酶联免疫试剂盒, 采用抗 BSA 的单克隆配对抗体, 分别作为包被抗体和检测抗体, 组成双抗体夹心 ELISA 检测试剂盒, 并与美国标准局的 BSA 标准品为参照标准, 本试剂盒最低可检测到 1ng/mL 的 BSA。

2、试剂盒组份:

2.1 抗 BSA 单克隆抗体包被的 96 孔板条:	1 块
2.2 BSA 标准品: 32ng/mL、16ng/mL、8ng/mL、4ng/mL、 2ng/mL、1ng/mL、0ng/mL	各 1 瓶 (0.4mL/瓶)
2.3 BSA 内部参比 (20ng/mL) :	1 瓶 (0.4mL/瓶)
2.4 TMB底物显色液:	1套 (A和B各6.5mL)
2.5 显色底物终止液 (2N, H ₂ SO ₄) :	1 瓶 (13mL)
2.6 样品稀释液 1 瓶	(13mL)
2.7 洗涤液 (10 倍浓缩) :	1 瓶 (50mL)
2.8 使用说明书:	1 份
2.9 酶标记抗 BSA 抗体:	1 瓶 (0.13mL)
2.10 酶标记抗体稀释液:	1 瓶 (13mL)

3、保存:

本试剂盒应于 2-8°C 保存, 有效期 6 个月。

4、所需仪器:

酶标仪 (波长 450nm), 10 μ L、100 μ L、1mL 移液器, 300 μ l 多道移液器, 液器吸头、37°C 恒温水浴箱。

5、操作步骤:

- 5.1 将浓缩洗涤液用蒸馏水做 10 倍稀释。
- 5.2 取出包被有抗 BSA 的 96 孔酶标板在室温放置回温。标准品各浓度做平行两孔, 50 μ L/孔加入酶标板中。加待检样品、内部参比, 各两孔, 50 μ L/孔。然后将酶标记抗体用酶标抗体稀释液做 1:100 稀释, 加入各反应孔, 100 μ L/孔 (酶标记抗体用多少稀释多少, 现用现配)。加样过程须在 15 分钟内完成。
- 5.3 置室温 20~24°C 避光反应 1 小时, 用洗涤液洗涤四遍, 拍干。
- 5.4 用移液器加 TMB 底物显色液 100 μ L/孔, 请勿震荡, 室温 20~24°C 避光反应 10 分钟。
- 5.5 用移液器加终止液 100 μ L/孔, 稍微震荡 5s 混匀。
- 5.6 在酶标仪 450nm 波长处读数。

6、注意事项:

- 6.1 如样品中 BSA 含量高于 32ng/mL, 可将样品做适当稀释。
- 6.2 样品如为冻干制剂, 应用样品稀释液充分溶解混匀。
- 6.3 反应时应将整板放入洁净的密闭空间中, 为防止反应孔中落入异物。

6.4 洗涤拍干后，应消除各孔内残余的气泡。

6.5 开封后，将未使用的板条放回加入干燥剂的密封塑料袋中，置 4℃ 密闭保存。

6.6 在操作过程中，所使用的移液器吸头、洗涤机（瓶）、器皿等均应严格避免被有 BSA 的环境和物品污染。

7、结果判定：

7.1 实验有效参数：

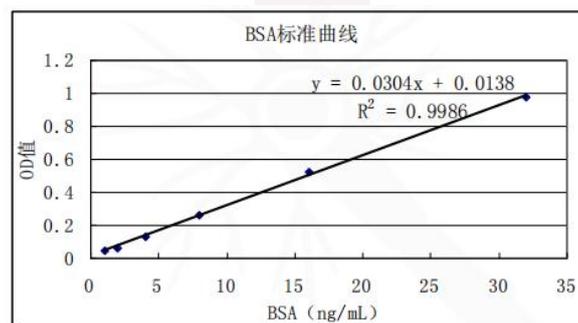
实验结果须满足以下有效参数为成立：

0ng/mlOD 值 \leq 0.1； 32ng/mlOD 值 \geq 0.80； 阳性参考 18~22ng/ml； $R^2 \geq 0.98$ ；

7.2 计算：

在 EXCEL 里面以标准浓度为横坐标，消零 OD 值为纵坐标作散点图，添加趋势线，再显示曲线方程和 R^2 值，将检测样品 OD 值消零处理后带入直线方程计算对应的浓度。

标准浓度	OD1	OD2	OD3	平均值	消零 OD
0	0.069	0.062	0.064	0.065	0
1	0.111	0.109	0.113	0.111	0.046
2	0.13	0.127	0.131	0.129	0.064
4	0.191	0.192	0.193	0.192	0.127
8	0.332	0.319	0.327	0.326	0.261
16	0.583	0.588	0.596	0.589	0.524
32	1.039	1.025	1.054	1.039	0.974



7.3 判定：

在标准曲线中，设 OD0~16ng/mL 为区间 A； OD16~32ng/mL 为区间 B； 大于 OD32 ng/mL 为区间 C。

7.3.1 如测得的 OD 值小于标准曲线中 2ng/mL 对应 OD 值，则 BSA 含量测定结果计为小于 2ng/mL。

7.3.2 如不同稀释浓度的样本测得的 OD 值均位于区间 A，则最终结果计算取其最低稀释度的测定值。

7.3.3 如不同稀释度的测定值均位于区间 B 或同时位于区间 A 和 B 或同时位于区间 B 和 C，则取其最接近 OD16ng/mL 的测定值。

7.3.4 如不同稀释度测定值均位于区间 C，则需将样本做进一步稀释测定，使其测定值居 2~32ng/mL 所对应的 OD 值区间，计算方法按上述 7.3.2-4。

7.3.5 如高稀释度测得 OD 高于低稀释度或未稀释的样本 OD，则可能是操作失误或样本中 BSA 含量过高（HOOK 效应），需重试或调整稀释度。

7.3.6 最终结果要考虑稀释因素（实际 BSA 含量 = 计算值 × 稀释倍数）。

8、本试剂盒技术指标

8.1 检测限和定量限

检测限：零浓度标准品加上两倍的标准差（20 个零孔计算值），本试剂盒检测限计算为 0.2ng/mL(ppb)。定量限为标准曲线检测下限，1 ng/mL。

8.2 准确度和精密度

计算批内批间变异系数，在高中低三个浓度（20、10、5）下五个重复检测计算批内变异系数，不同时间重复三次计算批间变异系数，CV%均小于 10%。

批间				批内			
浓度(ng/ml)	SD	回收率%	CV %	浓度(ng/ml)	SD	回收率%	CV %
20	0.06	107.3	5.6	20	0.047	102.6	4.6
10	0.049	105.4	4.7	10	0.022	101.2	2.2
5	0.059	99.66	5.9	5	0.028	97.6	2.9

8.3 交叉反应

本试剂盒对人血白蛋白，小鼠血清，兔血清，鱼明胶没有交叉反应，而对山羊血清有 10% 的交叉反应（以相同 OD 值时 BSA 和山羊血清的浓度的比值的百分数为准）。

和 BSA 没有交叉反应的物质	
反应物质	反应浓度
人血白蛋白	10mg/ml
小鼠血清	10%
兔血清	10%
鱼明胶	1%

8.4 钩状效应

当样品浓度远高于标准曲线最高浓度的时候，会产生 HOOK 效应，即反应 OD 值小于 32ng/mL 的 BSA 时候的浓度，本试剂盒为 500μg/mL 以上。