

β-Actin 酶联免疫检测试剂盒说明书

1、试剂盒简介

此定量检测人 β 肌动蛋白(β -actin) 酶联免疫试剂盒，采用抗 β -Actin 的配对抗体，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，本试剂盒最低可检测到 10ng/mL 的 β-Actin。

2、试剂盒组分：

试剂盒组分	96 孔板配置	保存
使用说明书	1 份	
酶标包被板	1×96 孔	2-8℃ 保存
β -Actin 标准品	100 uL×1 管	-80℃ 保存
检测抗体	50 uL×1 管	-80℃ 保存
HRP-羊抗鼠二抗	10 ul×1 管	-80℃ 保存
TMB 底物显色液	13 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
显色底物终止液	13 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
样品稀释液	13 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
抗体稀释液	13 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
洗涤液（10 倍浓缩）	30 mL×1 瓶	2-8℃ 保存

3、保存：

本试剂盒各组分按标签温度保存，有效期 6 个月。

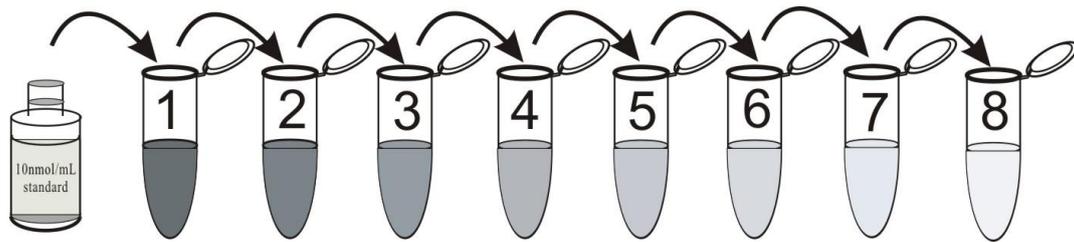
4、所需仪器：

酶标仪（波长 450 nm），10 μL、100 μL、1 mL 移液器，300 μl 多道移液器，移液器吸头、37℃恒温水浴箱。

5、操作步骤：

5.1 actin 标准品溶液配制

取 8 个新 EP 管，分别标记 1-8#。在 1#管中加入 990 μ L 样品稀释液，2-8#管中分别加 500 μ L 样品稀释液。加入 10 μ L 标准品（100 ug/mL）到 1#管中，剧烈振荡。从 1#管中取出 500 μ L 加入 2#管，剧烈振荡。同样方法完成 3-8#管的稀释（1-8#管 actin 浓度分别是 1000、500、250、125、62.5、31.25、15.625 ng/mL）。稀释好的标准品建议在 15min 内使用。另外，标记一个新 EP 管为 B0（maximum binding, 0 ng/mL），加入 500 μ L 样品稀释液。



5.2 将浓缩洗涤液用蒸馏水做 10 倍稀释。配好的洗涤液可室温保存 3 个月（但不能超出试剂盒的保质期）。

5.3 取出包被有抗 β -actin 的 96 孔酶标板在室温放置回温。标准品各浓度做平行两孔，100 μL /孔加入酶标板中。加待检样品各两孔，100 μL /孔。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 小时。用洗涤液洗涤三遍，拍干。

5.4 将检测抗体用抗体稀释液做 1:500 稀释，加入各反应孔，100 μL /孔（检测抗体用多少稀释多少，现用现配）。加样过程须在 15 min 内完成。置 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 小时，用洗涤液洗涤三遍，拍干。

5.5 将 HRP-羊抗鼠二抗用抗体稀释液做 1:5000 稀释，加入各反应孔，100 μL /孔。置 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 小时，用洗涤液洗涤四遍，拍干。

5.6 用移液器加 TMB 底物显色液 100 μL /孔，室温 20 - 24 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应 10 min，请勿震荡。

5.7 用移液器加终止液 50 μL /孔，稍微震荡 5s 混匀。

5.8 在酶标仪 450 nm 波长处读数。

6、注意事项：

6.1 如样品中 β -Actin 含量高于 1000 ng/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 $^{\circ}\text{C}$ 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：

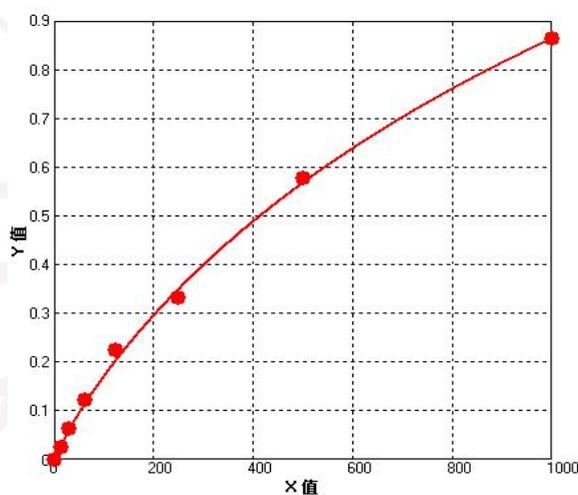
实验结果须满足以下有效参数为成立：

0 ng/ml OD 值 ≤ 0.1 ； 1000 ng/ml OD 值 ≥ 0.80 ； $R^2 \geq 0.98$ ；

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	平均值	清零 OD
1000	0.972	0.937	0.9545	0.8635
500	0.615	0.721	0.668	0.577
250	0.458	0.386	0.422	0.331
125	0.388	0.243	0.3155	0.2245
62.5	0.207	0.218	0.2125	0.1215
31.25	0.157	0.148	0.1525	0.0615
15.625	0.113	0.118	0.1155	0.0245
0	0.090	0.092	0.091	0



7.3 判定:

在标准曲线中, 设 OD 0 - 500 ng/mL 为区间 A; OD 500-1000 ng/mL 为区间 B; 大于 OD 1000 ng/mL 为区间 C。

7.3.1 如测得的 OD 值小于标准曲线中 15.625ng/mL 对应 OD 值, 则 β -Actin 含量测定结果计为小于 15.625 ng/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 OD 500 ng/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 15.625 - 1000 ng/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 β -Actin 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 (β -Actin 实际含量 = 计算值 \times 稀释倍数)。