



Cat No. 2M-KMLJM219682m

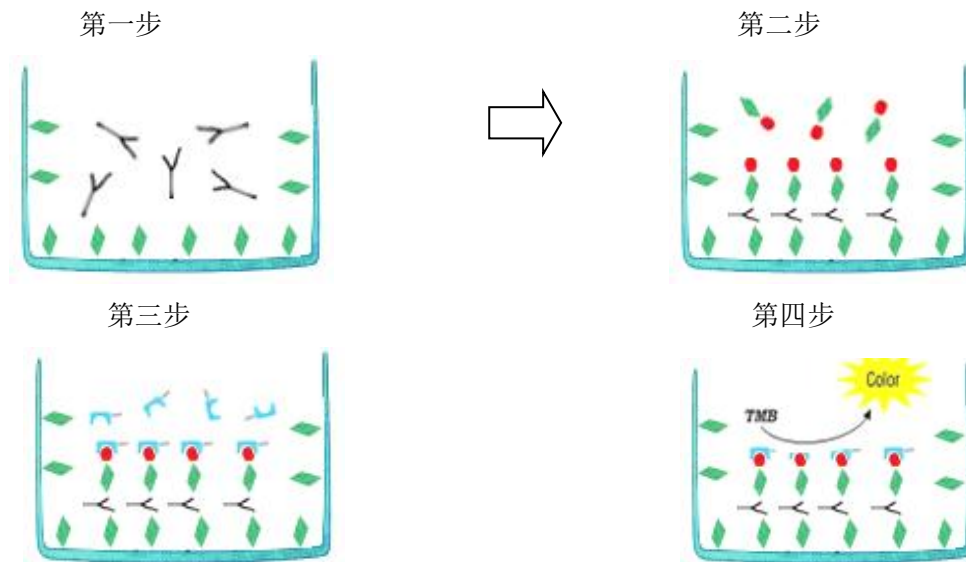
## 小鼠抗甲状腺球蛋白抗体(anti-thyroglobulin antibodies; TGAb)ELISA 试剂盒

尊敬的客户,感谢你选用本公司的产品。本产品适用于体外定量检测小鼠血清、血浆或细胞培养上清液、组织等中天然和重组的 TGAb 浓度。检测其他特殊样本请咨询本公司技术支持。试剂盒仅供科研使用。使用前请仔细阅读说明书并检查试剂盒组分。如有疑问,请联系南京卡米洛生物工程有限公司。您将得到我们的全方位服务。

### 【小鼠 TGAb 酶联免疫试剂盒检测原理】

本实验采用双抗原夹心 ELISA 法。所提供的 ELISA Kit 是典型的夹心法酶联免疫吸附测定试剂盒 (ELISA)。预先包被的相关抗原。样品和相关抗原先后加入酶标板孔反应后, PBS 或 TBS 洗涤。随后加入过氧化物酶标记的亲素反应; 经过 PBS 或 TBS 的彻底洗涤后用底物 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。颜色的深浅和样品中的待测因子呈正相关。

### 【小鼠 TGAb 酶联免疫试剂盒检测原理示意图】



### 【试剂盒组成】

名称	96 Tests	48 Tests	保存条件
1. 小鼠 TGAb 抗原包被板条	8×12	8×6	4/-20℃
2. 小鼠 TGAb 标准品	2 支 (冻干)	1 支 (冻干)	4/-20℃
3. 浓缩抗原	1 支	1 支	4/-20℃

4. 浓缩酶结合物(ABC)	1 支	1 支	4/-20℃
5. 酶结合物(ABC)稀释液	1 瓶	1 瓶	4/-20℃
6. 抗原稀释液	1 瓶	1 瓶	4/-20℃
7. 标准品稀释液	1 瓶	1 瓶	4/-20℃
8. 样品稀释液	1 瓶	1 瓶	4/-20℃
9. 浓缩洗涤液	1 瓶 (25×)	1 瓶 (25×)	4/-20℃
10. 显色剂 A	1 瓶	1 瓶 (避光)	4/-20℃
11. 显色剂 B	1 瓶	1 瓶	4/-20℃
12. 终止液	1 瓶	1 瓶	4/-20℃
13. 说明书	1 份	1 份	室温

#### 【试验所需自备试验设备和器材】

1. 酶标仪(450nm 检测波长滤光片, 570nm 或 630nm 校正波长滤光片)。
2. 洗板机(可调注液量, 保证每孔 350 $\mu$ l 洗液而不溢出)。
3. 超净工作台, 生物安全柜, 通风柜。
4. 高精度单道加液器(量程为 0.5-10 $\mu$ l, 2-20 $\mu$ l, 20-200 $\mu$ l, 200-1000 $\mu$ l)。
5. 高精度多道加液器(8 道或 12 道, 量程为 50-300 $\mu$ l)。
6. 37℃ 恒温箱。
7. 低温离心机。
8. 电冰箱(4℃, -20℃, -86℃)。
9. 分析天平。
10. 剪刀, 镊子, 钳子等。
11. 漩涡混合仪, 低频振荡器等。

#### 【试验所需自备试验耗材及试剂】

1. 离心管(容量为 1.5ml, 5ml 等)。
2. 一次性吸头(量程为 0.5-10 $\mu$ l, 2-20 $\mu$ l, 20-200 $\mu$ l, 200-1000 $\mu$ l)。
3. 纯净水或蒸馏水。
4. 坐标纸。
5. 吸水纸。
6. EDTA, 枸橼酸钠, 肝素

#### 【标本收集注意事项】

1. 收集血液的试管应为一次性的无热原, 无内毒素试管。
2. 血清和血浆避免使用溶血, 高血脂标本。
3. 标本应清澈透明, 悬浮物应离心去除。
4. 标本收集后若不及时检测, 需按一次使用量分装, 冻存于 -20℃, -80℃ 电冰箱内, 避免反复冻融。
5. 可根据标本的实际情况, 做适当倍数稀释(建议做预实验, 以确定稀释倍数)。
6. 收集标本, 尽量做到双份的用量, 避免一次实验失败, 重复实验时标本缺失, 从而耽误实验进程。
7. 收集标本时, 应该做好防护措施(比如戴手套, 口罩, 护目镜等), 认为所有标本都具有一定的潜在危险性。

8. 样本处理应该在生物安全柜里面，并且正确使用生物安全柜。

### 【标本处理办法】

1. 血清：将采集的全血静置冰箱 4℃ 过夜，然后 1000-3000rpm 离心 10 分钟，取上清立即测试，暂时不测可以放入 -20℃（1-3 个月）或 -80℃（3-6 个月）保存。
2. 血浆：用 EDTA，枸橼酸钠，肝素等作为抗凝剂，加入血液混匀后，1000-3000rpm 离心 10 分钟，取上清立即测试，暂时不测可以放入 -20℃（1-3 个月）或 -80℃（3-6 个月）保存。
3. 组织匀浆：切取组织块，0.01MPBS 中过洗一次；按照 1G 组织加入 5-10ml 组织蛋白萃取试剂的比例，在冰水中匀浆。匀浆完成后，5000-10000rpm 离心 10 分钟，取上清立即测试，暂时不测可以放入 -20℃（1-3 个月）或 -80℃（3-6 个月）保存。
4. 细胞培养上清：1000-3000rpm 离心 10 分钟，取上清立即测试，暂时不测可以放入 -20℃（1-3 个月）或 -80℃（3-6 个月）保存。
5. 尿液，腹水，脑脊液等：1000-3000rpm 离心 10 分钟，取上清立即测试，暂时不测可以放入 -20℃（1-3 个月）或 -80℃（3-6 个月）保存。

注：样品稀释的一般原则

用户须查阅相关文献了解标本内待测因子的含量，决定适当的稀释倍数，以使稀释后样品中待测因子的浓度处于 ELISA 试剂盒的最佳检测范围。样品的稀释应有详细记录。

### 【注意事项】

1. 试剂盒使用前请保存在 2-8℃。除复溶后的标准品，其他成分不可冻结。
2. 浓缩小鼠 TGA<sub>b</sub> 抗原，浓缩酶结合物体积小，运输中颠簸和可能的倒置，会使液体沾到管壁或瓶盖。因此使用前请用手甩几下或 1000rpm 离心 1 分钟，以使附着管壁或瓶盖的液体沉积到管底。
3. 浓洗涤液可能会有结晶析出，稀释时可在水浴中加温助溶，使结晶完全溶解后再配制洗涤液。
4. 测试过程中，小鼠 TGA<sub>b</sub> 冻干标准品为一次性使用，不得分装。因其浓度较低，溶解两小时后，会迅速失活。
5. 操作严格按照说明书进行，本试剂不同批号组分不得混用。
6. 配制试剂时，要用旋涡混合仪混匀。加入孔内的试剂，充分混匀对测试结果尤为重要，最好使用微量振荡器(使用最低频率)，如无微量振荡器，可在反应前手工轻轻晃动酶标板 1 分钟，例如做圆周动作，使加入孔中的反应液混匀。
7. 实验用酶标仪应严格按使用说明书规范操作，并在使用前充分预热。
8. 酶免试验中小鼠 TGA<sub>b</sub> 标准品和样本检测时建议作复孔。
9. 将不用的微孔板放进原铝箔袋中，置 2-8℃ 保存。
10. 显色液对光敏感，因此要避免直接暴露在光线下。
11. 超过使用有效日期的试剂盒不能应用于实验中。
12. 试验结果判定必须以酶标仪读数为准，使用双波长检测时，波长应该设置为 450nm 和 630nm。
13. 所有样品，洗涤液和各种废弃物都应按生物废弃物处理。终止液为 2M 硫酸，使用时必须注意安全。
14. 各步骤加样均应使用加样器，并经常校准其准确性，以避免试验误差。一次加样时间最好控制在 5 分钟内，如标本数量多，推荐使用排枪加样。

15. 每次试验测定的同时做标准曲线, 最好做复孔。如标本中待测物质含量过高(样本 OD 值大于标准品孔最高浓度的 OD 值), 请先用样品稀释液稀释一定倍数( $n$  倍)后再测定, 计算时请最后乘以总稀释倍数( $\times n$ )。

16. 不能检测含  $\text{NaN}_3$  的样品, 因  $\text{NaN}_3$  抑制辣根过氧化物酶的 (HRP) 活性。

17. 以洗板机洗板时, 每孔注液量不应少于  $350\mu\text{l}$ , 注意检查加样头是否堵塞。手工洗板时, 用带纸屑的吸水材料应慎重, 防止外源性过氧化物酶类似物或氧化还原物与显色剂发生反应。

18. 用终止液终止反应后, 请于 10 分钟内读取 OD 值。

19. 进行复孔实验时, 结果计算一定要求平均值。

20. 标本溶血可能会有假阳性结果, 因此溶血标本不宜进行此项检测。

21. 试验时, 应该将加过样品的板条放于密闭盒内, 并保持湿度约 60% 左右。

22. 为保证恒温箱内的温度为  $37^\circ\text{C}$ , 恒温箱的温度要经常校准。以确保实验温度保持恒定。

23. 48T 的试剂盒, 所有组分均为 96T 的 50% 的量。

24. 如与英文说明书有异, 以英文说明书为准。

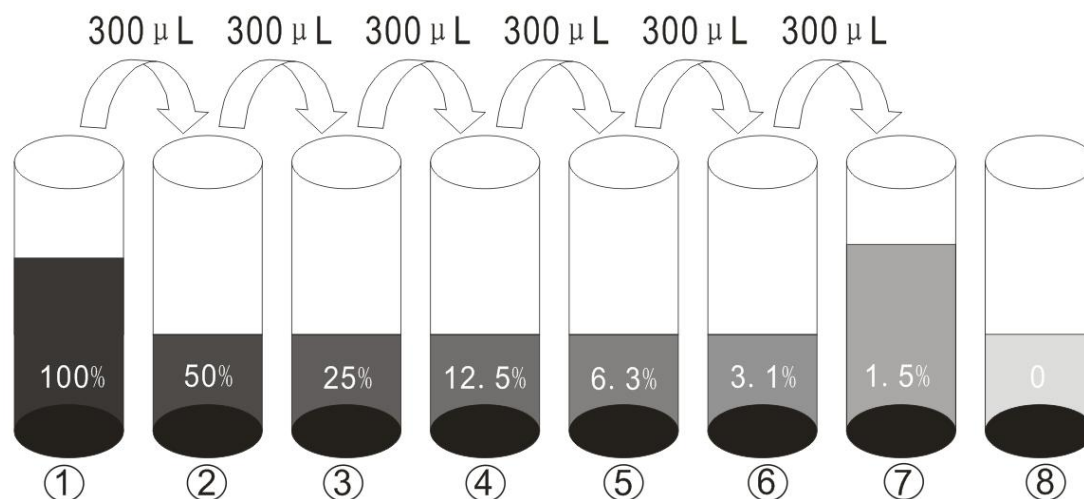
### 【检测前准备工作】

1. 请提前 20 分钟从冰箱中取出试剂盒, 平衡至室温后方可进行试验。

2. 将浓缩洗涤液用双蒸水稀释(1:25)。未用完的放回。

3. 小鼠 TGAb 标准品: 加入标准品稀释液 1.0ml 至冻干小鼠 TGAb 标准品中, 静置 10 分钟, 待其充分溶解后, 轻轻混匀(浓度为  $20\text{ ng/ml}$ ), 之后在管身标注①, 然后根据需要进行稀释。(建议标准曲线使用以下浓度:  $20$ 、 $10$ 、 $5$ 、 $2.5$ 、 $1.25$ 、 $0.625$ 、 $0.312\text{ ng/ml}$ )。注意: 务必要保证冻干标准品彻底溶解和混匀。

4. 标准品稀释方法图例: 取 7 支洁净的试剂管, 分别标注②,③,④,⑤,⑥,⑦,⑧。每管加入  $300\mu\text{l}$  标准品稀释液。从第①管内取出  $300\mu\text{l}$  加入到第②管, 混匀后, 再从第②管取出  $300\mu\text{l}$  加入到第③管, 以此类推至第⑦管。第⑧管为标准品稀释液, 作为阴性对照使用。



注: 复溶标准品原液 ( $20\text{ ng/ml}$ ) 请废弃, 不可重复使用。

5. 小鼠 TGAb 抗原工作液: 按当次试验所需用量, 用抗原稀释液稀释浓缩抗原(1:100), 配置成抗原工作液。使用前 30 分钟准备。仅供当日使用。

---

6.酶结合物工作液：按当次试验所需要用量，用酶结合物稀释液稀释浓缩酶结合物(1:100)，配置成酶结合物工作液。使用前 30 分钟准备。仅供当日使用。

7.TMB 显色工作液：在使用之前 30 分钟，按 TMB 显色液 A 9 份加 TMB 显色液 B 1 份（9:1）的比例配制 TMB 显色工作液。

### 【洗涤方法】

1. 自动洗板机：要求注入的洗涤液为 350 $\mu$ l，注入与吸出间隔 20—30 秒。确保机器运用熟练后，再投入实验中使用。

2. 手工洗板：每孔加洗涤液 350 $\mu$ l，静置 30 秒后甩尽孔内液体，在吸水纸上拍干。手工洗板时，注意加入洗液的过程中，不要造成孔间污染，从而出现跳孔的现象。

### 【操作步骤】

1. 从已平衡至室温的密封袋中取出试验所需板条，未用的板条和干燥剂请放回铝箔袋内封存于 2-8 $^{\circ}$ C。

2. 预留空白孔（若使用双波长读板，空白孔可以不用）。

3. 分别将标本或不同浓度小鼠 TGA b 标准品（0ng/ml 孔加标准品稀释液）加入相应孔中（100 $\mu$ l/孔），用封板胶纸封住反应孔，37 $^{\circ}$ C 孵箱孵育 90 分钟。

4. 提前 30 分钟制备小鼠 TGA b 抗原工作液。

5. 洗板 2 次。

6. 加入小鼠 TGA b 抗原工作液(100 $\mu$ l/孔)。用封板胶纸封住反应孔，37 $^{\circ}$ C 孵箱孵育 60 分钟。

7. 提前 30 分钟制备酶结合物工作液。室温避光放置。

8. 洗板 3 次。

9. 除空白孔外，加入酶结合物工作液(100 $\mu$ l/孔)。用封板胶纸封住反应孔，37 $^{\circ}$ C 孵箱，避光孵育 30 分钟。

10. 洗板 5 次。

11. 加入 TMB 显色工作液（包括空白孔）100 $\mu$ l/孔，37 $^{\circ}$ C 孵箱，避光孵育，当标准曲线高浓度的颜色较深，有明显的颜色梯度的时候，即可终止。试验显色反应请勿超过 30 分钟。

12. 加入终止液（包括空白孔）100 $\mu$ l/孔，混匀后即刻测量 OD（450nm）值(10 分钟内)。

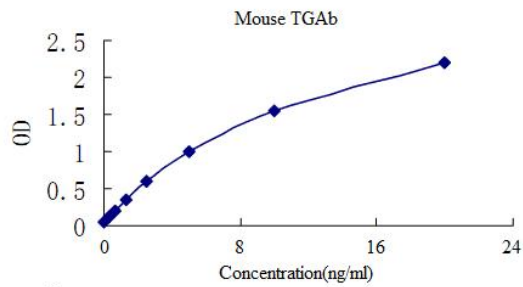
### 【结果判断】

1. 每个标准品和标本的 OD 值应减去零孔的 OD 值。（若不减零孔值，标准曲线的零孔应相交于 Y 轴）

2. 手工绘制标准曲线。以标准品浓度作横坐标，OD 值作纵坐标，以平滑线连接各标准品的坐标点。通过标本的 OD 值可在标准曲线上查出其浓度。推荐使用专业制作曲线软件进行分析，如 curve expert 1.3 进行结果计算。

3. 若标本 OD 值高于标准曲线上限，应适当稀释后重测，计算浓度时应乘以稀释倍数。

### 【参考曲线】



注意：本图仅供参考，应以同次试验标准品所绘标准曲线来计算标本含量。

### 【操作程序总结】

准备试剂，样品和标准品



加入准备好的样品和标准品，37℃反应 90 分钟



洗板 2 次，加入抗原工作液，37℃反应 60 分钟



洗板 3 次，加入 ABC 工作液，37℃反应 30 分钟



洗板 5 次，加入 TMB 显色液，37℃反应



加入 TMB 终止液



10 分钟之内酶标仪测 OD 值



计算标本待测因子含量

### 试剂盒参数

【检测范围】20ng/ml-0.312ng/ml

【灵敏度】最小可测小鼠 TGAbs 达 0.06ng/ml.

【特异性】系统和其它因子无交叉反应。

【批间差】≤12%.

【批内差】≤8%.

【回收率】70-110%.

【保存】-20℃ [短期内（如两周）可 4℃]

【用途】用于体外定量分析液体标本（通用型）。

【规格】96T.

【生产日期】见酶标板铝箔袋封口钢印。

【有效期】12 个月（-20℃）。