



Cat No. 2M-KMLJM220201m

小鼠抗环瓜氨酸肽抗体

(Anti-Cyclical Citrullinated Peptide Antibody; Anti-CCP)

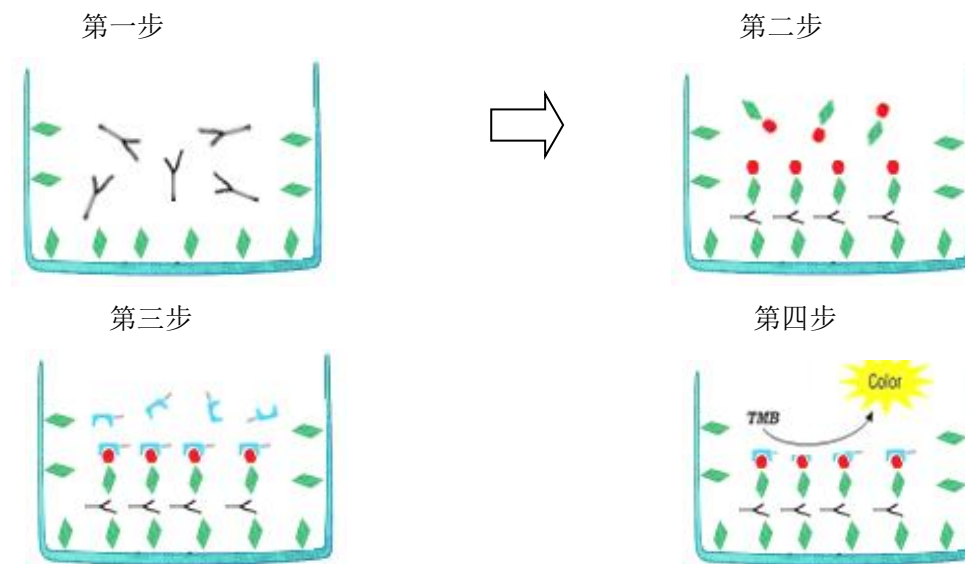
ELISA 试剂盒

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 Anti-CCP 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 Anti-CCP 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本素反应；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 Anti-CCP 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 Anti-CCP 抗原包被板条	8×12	8×6	4/-20℃

2. 小鼠 Anti-CCP 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 350μl 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 0.5-10μl, 2-20μl, 20-200μl, 200-1000μl)。
5. 高精度多道加液器 (8 道或 12 道, 量程为 50-300μl)。
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 0.5-10μl, 2-20μl, 20-200μl, 200-1000μl)。
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 Anti-CCP 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 Anti-CCP 冻干标准品为一次性使用, 不得分装。因其浓度较低, 溶解两小时候后, 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 Anti-CCP 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 NaN₃ 的样品,因 NaN₃ 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 μ 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 $^{\circ}$ 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。

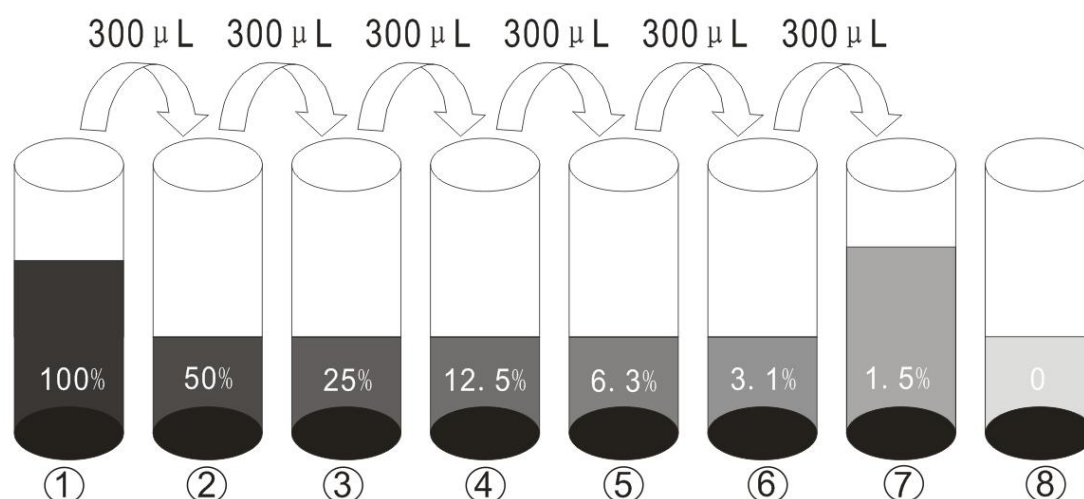
【检测前准备工作】

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 Anti-CCP 标准品:加入标准品稀释液 1.0ml 至冻干小鼠 Anti-CCP 标准品中,静置 10 分钟,待其充分溶解后,轻轻混匀(浓度为 200 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:200、100、50、25、12.5、6.25、3.12 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 μ l 标准品稀释液。从第①管内取出 300 μ l 加入到第②管,混匀后,再从第②管取出 300 μ 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(200 ng/ml)请废弃,不可重复使用。

-
- 5.小鼠 Anti-CCP 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 μ 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 μ 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。

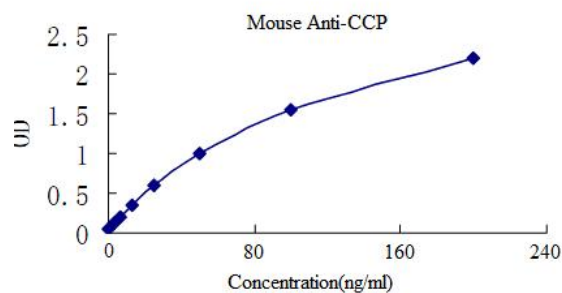
【操作步骤】

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，空白孔可以不设）。
3. 分别将标本或不同浓度小鼠 Anti-CCP 标准品（0ng/ml 孔加标准品稀释液）加入相应孔中(100 μ 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 Anti-CCP 抗原工作液。
5. 洗板 2 次。
6. 加入小鼠 Anti-CCP 抗原工作液(100 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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】200ng/ml-3.12ng/ml

【灵敏度】最小可测小鼠 Anti-CCP 达 0.6ng/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℃）。