



ClinMax™ 人穿孔素 (Perforin) ELISA试剂盒

货号: CEA-B034

规格: 96 tests

本试剂盒仅用于科研使用，不可用于诊断或治疗应用。

重要提示：在进行实验前，请仔细阅读本用户指南。

产品信息

本试剂盒用于定量检测生物样本（细胞上清、血清、血浆）中人穿孔素 (Perforin) 的浓度。

本试剂盒的测定原理采用定量夹心酶联免疫分析法。首先在微孔板上包被捕获抗体，然后将待测样本加入孔中，样品中的待测抗原与捕获抗体结合。随后，加入另一个生物素标记的检测抗体，这个特异抗体与待测抗原的另一表位结合，从而形成“夹心”结构。最后，通过加入 Streptavidin-HRP 与生物素标记的检测抗体结合，使得酶标记物与夹心结构关联起来。添加适当的底物后，酶催化底物反应产生可测量的信号，从而定量检测待测抗原的含量。

注意事项：

本试剂盒仅供科研使用，不用于诊断或治疗应用。

请勿在试剂盒标签上指示的到期日期之后使用本试剂盒。

请勿将试剂与其他批次或来源的试剂混合或替换。

生产企业：百斯医学诊断科技（北京）有限公司

生产地址：北京经济技术开发区永昌北路3号永昌工业园3号楼8106-8107

电话：010-67855298-8147

邮箱：IVD.AcroDiagnostics@acrobiosystems.com

销售企业：北京百普赛斯生物科技股份有限公司

地址：北京经济技术开发区宏达北路8号5号楼4层

电话：400-682-2521（全国） 010-53681107（北京）

邮箱：order.cn@acrobiosystems.com

试剂盒组分

该试剂盒包含足够的试剂用于96孔。

| Catalog | Contents | Amount |
|------------|--|------------------------|
| CEA034-C01 | Pre-coated Anti-Perforin Antibody Microplate | 1 plate |
| CEA034-C02 | Human Perforin Standard | 500 μ L \times 2 |
| CEA034-C03 | Biotin-Anti-Perforin Antibody Con. Solution | 150 μ L |
| CEA034-C04 | Biotin-Antibody Dilution Buffer | 15 mL |
| CEA034-C05 | Streptavidin-HRP Con. Solution | 1.5 mL |
| CEA034-C06 | Streptavidin-HRP Dilution Buffer | 15 mL |
| CEA034-C07 | 20 \times Washing Buffer | 50 mL |
| CEA034-C08 | Sample Dilution Buffer | 15 mL \times 2 |
| CEA034-C09 | Substrate Solution | 12 mL |
| CEA034-C10 | Stop Solution | 6 mL |

存储条件

将未开封的试剂盒存储在 2-8 $^{\circ}$ C 温度下。请避免在试剂盒的过期日期之后使用。对于已开封的试剂盒，除了微孔板按照下表进行存储，其余组分可在 2-8 温度下，保存 30 天。

| Contents | Storage conditions |
|---|---|
| Pre-coated Anti-Perforin Antibody Microplate | Return unused wells to the foil pouch, reseal along entire edge of zip-seal. May be stored for up to 1 month at 2-8 $^{\circ}$ C. |

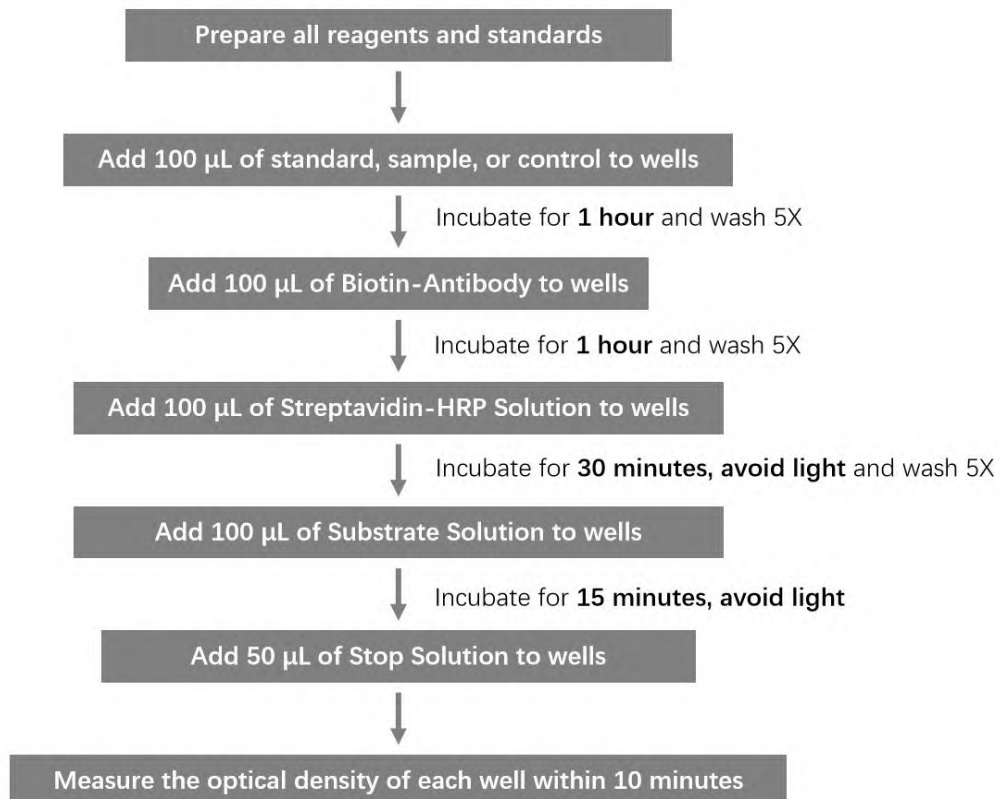
注意：Streptavidin-HRP Con. Solution 和 Substrate Solution 需避光保存。

需要但未提供的试剂/设备

| | |
|----|-------------------|
| 设备 | 酶标仪 |
| 试剂 | 超纯水/去离子水/蒸馏水 |
| 耗材 | 50 mL 和 500 mL 量筒 |
| | 移液器和枪头 |
| | 用于稀释标准品的 EP 管 |

工作流程

Analyte: Perforin



NOTE: Incubation temperature is 18 °C-25 °C

工作液和梯度标准品的制备

注意事项：使用前将所有试剂置于室温（18°C~25°C）。如果在缓冲溶液中形成晶体，请将试剂置于37°C培养箱中，直至晶体完全溶解，然后在使用前将溶液恢复至室温。

工作液的制备

1. 1×Washing Buffer：用超纯水/去离子水/蒸馏水将 50 mL 20×Washing Buffer 稀释至 1000 mL。
2. Biotin-Anti-Perforin Antibody Solution：取 120 μ L Biotin-Anti-Perforin Antibody Con. Solution 加入 12 mL Biotin-Antibody Dilution Buffer，轻轻摇匀，现用现配。
3. Perforin Streptavidin-HRP Solution：取 1.2 mL Streptavidin-HRP Con. Solution 加入 12 mL Streptavidin-HRP Dilution Buffer，轻轻摇匀，该工作液需避光保存，现用现配。

梯度标准品的制备

1. 准备 6 个 EP 管，分别标记为 Std.-1, Std.-2, Std.-3, Std.-4, Std.-5, Std.-6;
2. 标准曲线配置如下：在 Std.-1 管中加入 500 μ L Human Perforin Standard (CEA034-B02)，作为标曲的最高点 Std.-1 (2000 pg/mL)；
3. 在 Std.-2 管中加入 250 μ L Std.-1 溶液和 250 μ L 样本稀释液，作为标曲的 Std.-2 (1000 pg/mL)；
4. 后续按照此方法继续依次 1: 1 稀释至 (500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62.5 pg/mL)，共配 6 个标准曲线浓度点；
5. 以稀释液作为标准曲线的零浓度。

实验流程：

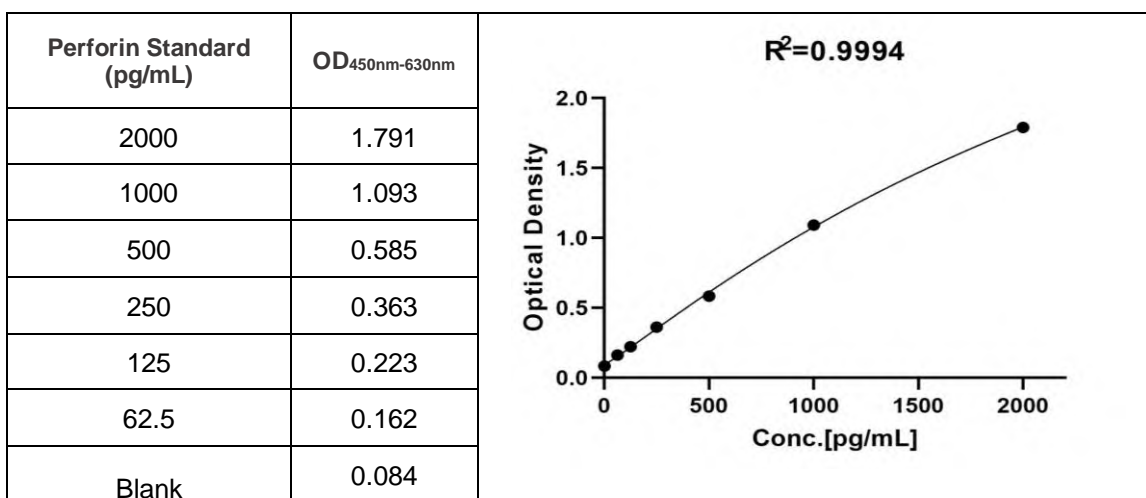
1. 向微孔板中加入 100 μ L Perforin Standards 或样品。用密封膜密封微孔板，在室温（18°C~25°C）下孵育 **1.0 小时**。
2. 吸出剩余溶液，向每孔中加入 300 μ L 1 \times Washing Buffer，轻轻敲击板 1 分钟，去除任何剩余的 1 \times Washing Buffer：通过吸出或倾倒，倒置板并用纸巾吸干。重复上述洗涤步骤，总共五次。
3. 向微孔板中加入 100 μ L Biotin-Anti-Perforin Antibody Solution。用密封膜密封微孔板，在室温（18°C~25°C）下孵育 **1.0 小时**。
4. 重复步骤 2。
5. 向微孔板中加入 100 μ L Streptavidin-HRP Solution。用密封膜密封微孔板，在室温（18°C~25°C）下孵育 **30 分钟，避光**。
6. 重复步骤 2。
7. 向微孔板中加入 100 μ L Substrate Solution，用密封膜密封微孔板并在室温（18°C~25°C）下孵育 **15 分钟，避光**。
8. 向微孔板中中加入 50 μ L Stop Solution，轻轻敲击板以充分混合。终止反应后，**十分钟内上机读数**。
注意：孔中的颜色应从蓝色变为黄色。
9. 使用酶标仪测定读取 450nm 和 630nm 处的吸光度。
注意：为了减少背景噪音，用 450nm 读取的值减去 630nm 读取的值。

结果解读

1. 标准曲线的范围: $R^2 \geq 0.9900$ 。
2. 如果待测样品的 OD 值高于最高标准, 应将样品用稀释缓冲液稀释后重复测定。
3. 校准标准曲线得到的吸光度值, 以标准浓度为 x 轴, 校准吸光度值为 y 轴绘制标准曲线。四参数拟合用于绘制标准曲线并计算样品浓度。

典型数据

注意: For each experiment, a standard curve needs to be set for each microplate, and the specific OD value may vary depending on different laboratories, testers, or equipment. The following example data is for reference only. The sample concentration was calculated based on the results of the standard curve. .



灵敏度

检测零浓度校准品 20 次, 得到 20 次测定结果的 OD 值, 计算其平均值 M 和标准差 SD, 将 M+2SD 所对应的 OD 值, 带入标准曲线中, 计算得出对应的浓度, 即最低检测限(minimum detectable concentration, MDC)。Perforin 最低可检测限浓度小于 60 pg/mL。

板内精密度

同一批试剂中测试含有 3 个不同浓度的 Perforin 样品，每个样本检测十次，批内精密性 CV < 10%。

| Sample Concentration (pg/mL) | Mean (pg/mL) | SD | Numbers | CV |
|------------------------------|--------------|-------|---------|-------|
| 62.5 | 57.19 | 3.16 | 8 | 5.52% |
| 500 | 497.51 | 27.92 | 8 | 5.61% |
| 1000 | 993.59 | 31.35 | 8 | 3.16% |

板间精密度

对 3 个不同浓度的 Perforin 样品进行 3 个批次测试，每个批次 3 个样本浓度、每个浓度检测 3 次，批间精密性 CV < 15%。

| Sample Concentration (pg/mL) | Mean (pg/mL) | SD | Numbers | CV |
|------------------------------|--------------|-------|---------|-------|
| 62.5 | 57.56 | 3.33 | 9 | 5.78% |
| 500 | 486.52 | 38.53 | 9 | 7.92% |
| 1000 | 972.06 | 32.46 | 9 | 3.34% |

特异性

当该试剂盒用于分析高达 1 µg/mL 以下的重组细胞因子时，未观察到交叉反应。

| | |
|-------|---|
| Human | IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12 p70, IL-10、IL-10、MCP-1、GM-CSF、TNF- α 、IFN- γ |
|-------|---|

常见问题指南

| 问题 | 原因 | 解决方法 |
|--------------|-------------------------|--|
| 标准曲线差 | * 移液不准确 | * 检查移液器 |
| CV 值偏高 | * 移液不准确 * 孔中有气泡 | * 检查移液器 * 去除孔中的气泡 |
| 背景高 | * 板子清洗不充分 * 洗涤缓冲液被污染 | * 按操作步骤正确清洗 * 制备新的洗涤缓冲液 |
| 整板读数偏低 | * 波长选择错误 * 孵育时间不足 | * 检查波长参数 * 增加孵育时间 |
| 标准曲线正常，样品读值高 | * 样本中的细胞因子水平高于检测范围 | * 稀释样本再次进行检测 |
| 曲线漂移 | * 加样时间过长 * 试剂不在室温下 | * 在检测开始之前准备好所有的标准品和样品，尽量控制加样时间 * 除非抗体等物质有特殊说明，否则在加样前所有试剂都处于室温状态 |