大鼠磷酸化AKT蛋白(p-AKT) 酶联免疫分析（ELISA）试剂盒

货号：**LRE27701**

用途：本试剂盒用于体外定量检测大鼠血清、血浆、组织、细胞上清及相关液体样本中磷酸化AKT蛋白(p-AKT)的含量。

基本性能

灵敏度：0.12μmol/L

检测范围：0.5 -16μmol/mL

特异性：大鼠磷酸化AKT蛋白(p-AKT)

回收率：85-115%。

重复性：板内，板间变异系数均 < 10% 。

稳定性：2-8℃保存，有效期6个月。

实验原理

本试剂盒采用竞争ELISA法，往预先包被大鼠磷酸化AKT蛋白(p-AKT)水平。 抗体的微孔板中依次加入标准品/样本和生物素化抗原检测液,经过温育洗涤，再加入HRP酶结合物温育。 再次洗涤后加入底物溶液(TMB)，室温显色并用终止液终止反应后读取OD值。OD值高低和样品中的大鼠p-AKT呈负相关。

本试剂盒具有灵敏度高、特异性强、重复性好、操作便捷等特点。

试剂盒组成

英文名称	中文名称	96T配置	48T配置
Microelisa Stripplate	酶标包被板	8孔×12条	8孔×6条
Standard	标准品(即用型)	0.2 mL/管×6管	0.2 mL/管×6管

英文名称	中文名称	96T配置	48T配置
HRP Conjugate Reagent	HRP酶结合物	12 mL×1瓶	12 mL×1瓶
Biotinylated Detection Ag Diluent	生物素化抗原检测液	12 mL×1瓶	12 mL×1瓶
Sample Diluent	样本稀释液	6 mL×1瓶	6 mL×1瓶
Concentrated Wash Buffer(20×)	浓缩洗涤液(20×)	30 mL×1瓶	30 mL×1瓶
Chromogen Solution(TMB)	底物溶液(TMB)	12 mL×1瓶	12 mL×1瓶
Stop Solution	终止液	12 mL×1瓶	12 mL×1瓶
Plate Sealer	封板膜	2张	2张
Manual	产品说明书	1份	1份

校准品浓度依次为：大鼠 p-AKT由高到低分别对应管子的编号为⑥、⑤、④、③、②、①；其中管①浓度为0。

需要而未提供的物品

- 含450 nm检测波长的酶标仪
- 0.5~10μL,5~50μL,20~200μL,200~1000μL的移液器,EP管及一次性吸头
- 加样槽
- 吸水纸
- 20℃-25℃恒温箱
- 蒸馏水或去离子水
- PBS(0.01M,pH=7.4)

【样本处理及要求】

- *血清：*用未添加抗凝剂的采血管收集全血，室温静置30 min以上，不超过2小时。然后2500-3500×g离心20 min，仔细收集上清。
- *血浆：*根据标本的要求选择EDTA或柠檬酸钠作为抗凝剂，样品采集后30 min内在2-8℃ 3000×g离心15 min，仔细收集上清。保存过程中如有沉淀形成，应再次离心。
- *尿液：*用无菌管收集，3000×g离心10 min，仔细收集上清。保存过程中如有沉淀形成，应再次离心。胸腹水、脑脊液参照实行。

- *细胞裂解液：*贴壁细胞用预冷的PBS(0.01M，pH=7.4)轻轻清洗，然后用胰蛋白酶消化，1000×g离心 5min后收集细胞；悬浮细胞可直接离心收集。收集的细胞用冷的PBS洗涤3次。每10^6个细胞中加入 150-200 μLPBS重悬(推荐在PBS中加入蛋白酶抑制剂；若含量很低可减少PBS的体积)并通过反复冻融或超声使细胞破碎。将提取液于2-8℃,10000×g离心10 min，取上清检测。
- *组织样本：*用预冷的PBS(0.01M,pH=7.4)冲洗组织，去除残留血液，称重后将组织剪碎。将剪碎的组织与对应体积的PBS(一般按1：9的重量体积比，比如1g的组织样品对应9mL的PBS，具体体积可根据实验需要适当调整，并做好记录。推荐在PBS中加入蛋白酶抑制剂)加入匀浆器中，在冰上充分研磨。为了进一步裂解组织细胞，可以对匀浆液进行反复冻融或超声破碎。最后将匀浆液于2-8℃,10000×g离心5-10min，取上清检测。
- *细胞培养上清：*收集液体后于2-8℃，3000×g离心20 min，除去杂质及细胞碎片，取上清检测。建议将以上样本上清分装多份，-20℃或-80℃保存，避免反复冻融；不能检测含NaN_3的样本，因NaN_3抑制辣根过氧化物酶的(HRP)活性。

【注意事项】

- 试剂盒从冷藏环境中取出应在至少室温平衡120 min后方可使用。
- 试验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好相关防护工作。
- 浓缩洗涤液可能会有结晶析出,稀释时可在水浴中加温助溶,不影响洗涤结果。
- 请勿重复使用已稀释过的标准品、生物素化抗体工作液、酶结合物工作液。
- 未用完的生物素化抗体、HRP酶结合物、酶标板及其他原液按照上述表格中保存条件存放。酶结合物,底物液请避光保存。
- 请每次测定的同时做标准曲线,建议做复孔。
- 如果样本值高于最高标准品浓度值，请先用样本稀释液稀释后再测定,计算时请最后乘以总稀释倍数(xn)。
- 封板膜只限一次性使用,以避免交叉污染。
- 严格按照说明书进行操作,实验结果判定必须以酶标仪读数为准。
- 所有样品,洗涤液和各种废弃物都应按污染物处理。试验中所用的EP管和吸头一次性使用,严禁混用。
- 本试剂盒不同批号组分不得混用。请勿使用其他来源的试剂或替代本试剂盒中的试剂。请勿使用过期试剂。使用前请检查试剂盒中试剂的标签和数量与表格是否一致。
- 如果试剂盒的组份需要再次使用，请确保上一次使用之后没有被污染。

- 酶标板单次未使用完，要谨记密封放到2-8℃保存。

【溶液配制】

1.使用前，所有的组分都要至少复温120min，确保充分复温到室温。

2. *洗涤液：*将浓缩洗涤液(20×)用蒸馏水(或去离子水)稀释20倍后备用(例如：10 mL浓缩液+190mL去离子水)；从冰箱中取出的浓缩洗涤液可能有结晶，属于正常现象，可用水浴加热使结晶完全溶解后再配制洗涤液。

3. *标准品：*6支不同浓度梯度制剂使用。

校准品浓度依次为：大鼠 p-AKT由高到低分别对应管子的编号为⑥、⑤、④、③、②、①；其中管①浓度为0。

【操作步骤】

1.将各种试剂移至室温平衡两小时，取浓缩洗涤液，根据当批检测数量，用蒸馏水1：20稀释，混匀 后备用。

2. 加样：取出预包被板，设一个空白对照孔，不加任何液体；每个标准品设复孔，每孔加入对应标准品15 μL;其余每个检测孔直接加待测血清或质控品15 μL。

3. 除了空白孔外所有孔加入*生物素抗原检测液*100 μL，混匀，用封板膜封板后置室温(20℃-25℃)孵育60min。(建议标准品和样本在检测中设立复孔，通过预实验或咨询技术支持确定待检样本的稀释倍数)；

4. 洗涤：小心揭掉封板膜，弃去孔内液体，甩干，每孔加洗涤液200 μL(或注满各孔)，浸泡30s甩干,重复5次后拍干。

5. 加HRP酶结合物：除空白孔外，每孔加入*HRP酶结合物*100 μL，用封板膜封板后置室温(20℃-25℃)孵育30 min；

6. 洗涤：小心揭掉封板膜，弃去液体，甩干，每孔加*洗涤液*200 μL，浸泡30s-1 min，弃去液体，甩干,如此重复5次，拍干；

7. 显色：每孔加入底物溶液100 μL，用封板膜封板后，室温(20°C-25°C)避光显色10~15 min，此时可观察到标准孔蓝色成一定梯度，然后每孔加终止液100 μL，终止反应；(根据实际显色情况酌情缩短或延长，但不可超过30 min。当标准孔前4个显色孔出现明显蓝色梯度，即可终止。)

8. 测定：提前15分钟打开酶标仪预热。用酶标仪以450nm波长测量各孔的吸光度(OD值)。

操作流程图



1.反应板孔中加入15μL标准品工作液或样本后，立即每孔加入100μL生物素化抗原检测液，室温(20°C-25°C)孵育60分钟。弃掉板内液体，洗板5次。

2.每孔加入100μL HRP酶结合物工作液，室温(20°C-25°C)孵育30分钟，弃掉板内液体，洗板5次。

3.每孔加入100μL底物显色液，室温(20°C-25°C)孵育15分钟左右。

4.每孔加入100μL终止液，终止反应后，立即在450nm波长下读数，处理数据。

结果计算

1. 校正值：酶标仪读数后,以标准品和样本OD值减去空白孔OD值,获得校正值。标准曲线和样本浓度计算以校正值为模板计算。

2. 标准曲线绘制：以标准品浓度为横坐标(X),OD值为纵坐标(Y),在坐标轴上拟合四参数逻辑函数的标准曲线。

3.样本浓度计算：将样本OD值(校正后)作为纵坐标代入公式,即得样本浓度值。若样本检测前进行过稀释,最后计算时需乘以相应的稀释倍数,即为样本的实际浓度。

【问题分析】

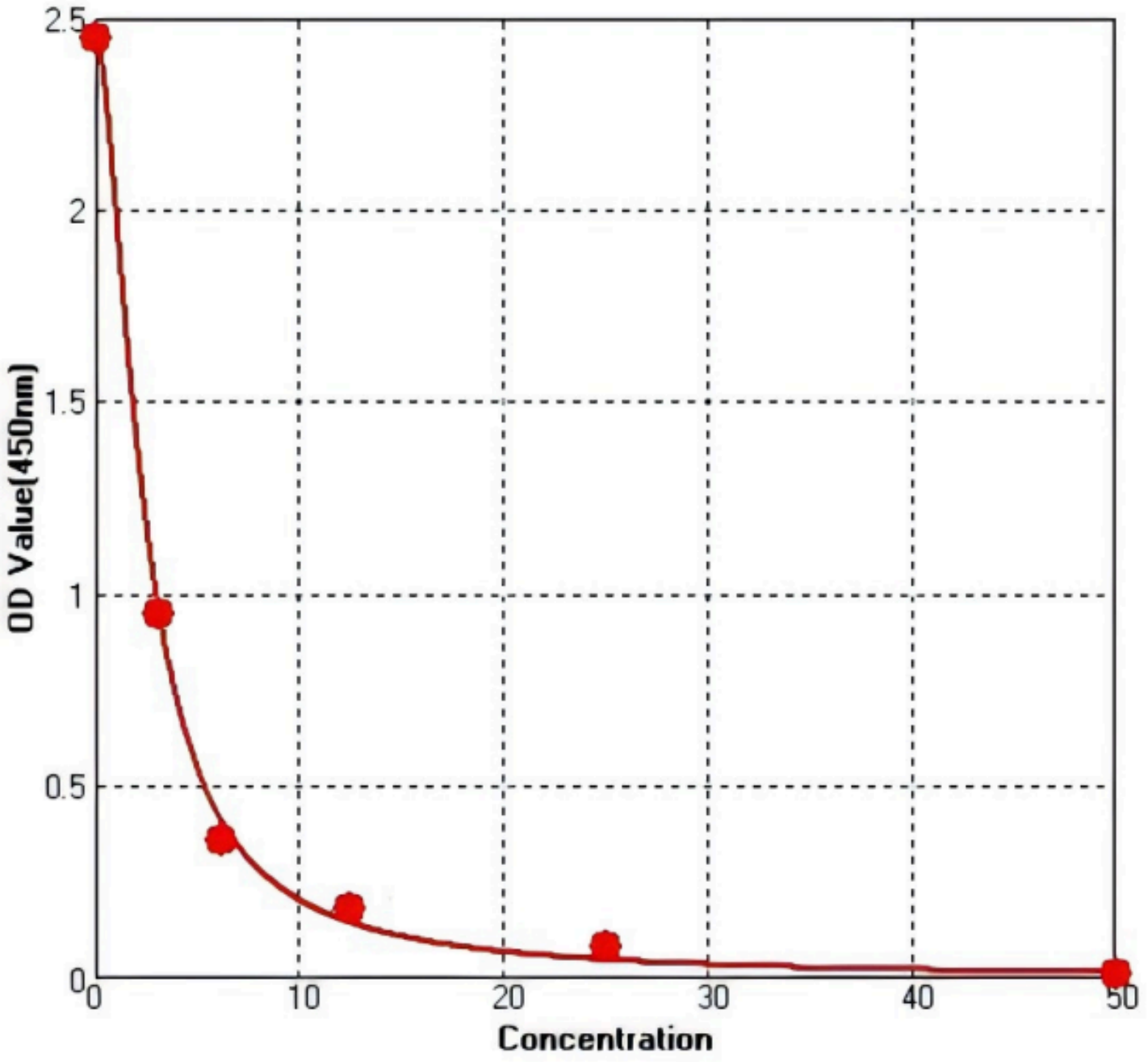
问题描述	可能原因	相应对策
阴阳性对照结果不稳定	吸液或加液不准	检查移液器及吸头
	平衡时间太短	保证充足的平衡时间
	洗涤不完全	保证洗涤时间和洗涤次数及每孔的加液量
显色很弱或无色	孵育时间太短	保证充足的孵育时间
	实验温度不正确	使用推荐的实验温度

问题描述	可能原因	相应对策
	试剂体积不够或漏加	检查吸液及加液过程,保证所有试剂按顺序足量添加
	稀释不正确	
	酶标记物失活或底物失效	混合酶结合物和底物,通过迅速显色来检查判断
读数数值低	酶标仪设置不正确	在酶标仪上检查波长及滤光片设置
		提前打开酶标仪预热
变异系数大	加液不正确	检查加液情况
背景值高	检测抗体的工作浓度过高	使用推荐的稀释倍数
	酶标板洗涤不完全	保证每步清洗完全；如果用自动洗板机,请检查所有的出口是否有堵塞；是否使用试剂盒配备的洗涤液
	洗液有污染	配制新的洗液
灵敏度低	ELISA试剂盒保存不当	按说明书要求保存相关试剂

问题描述	可能原因	相应对策
	读数前未终止	OD读数前应在每孔中加入终止液

典型数据

以下数据和曲线仅供参考，实验者需根据自己的实验建立标准曲线。



【声明】

1. 限于现有条件及科学技术水平,尚不能对所有原料进行全面的鉴定分析,本产品可能存在一定的质量技术风险。

2. 本试剂盒在研发过程中去除/降低了生物学样本中的一些内源性干扰因素,并非所有可能影响的因素均已去除。

3. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及当时的实验环境等因素密切相关,本公司只对试剂盒本身负责,不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责,请使用者使用前充分考虑到样本可能的使用量,预留充足的样本。

4. 为了达到好的实验结果,请只使用本公司试剂盒内提供的试剂,不要混用其他制造商的产品,严格按照说明书操作。

5. 由于操作过程中试剂制备以及酶标仪参数设置不正确,可能导致结果异常,实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器。

6. 即使是相同人员操作也可能在两次独立实验中得到不同的结果,为保证结果的重现性,需要控制实验过程中每一步的操作。

7. 试剂盒发货前会经过严格的质检,然而,因为运输条件、实验设备差异等等因素影响,用户检测结果可能跟出厂数据不一致。

8. 本试剂盒未与其他厂家同类试剂盒或不同方法检测同一目的物的产品进行对比,所以不排除检测结果不一致的情况。

9. 试剂盒仅供研究使用,如将其用于临床诊断或任何其他用途,我公司将不对因此产生的问题负责,亦不承担任何法律责任。