SEJ783Ra 96T

RAS 癌基因家族成员 RAB1A(RAB1A)检测试剂盒

(酶联免疫吸附试验法)

适用生物：大鼠

使用说明书

仅供体外研究使用，不用于临床诊断!

第 11 版（2013 年 07 月修订）

[预期应用]

本试剂盒运用双抗体夹心 ELISA 法定量测定大鼠组织匀浆、细胞裂解液或其它相关生物液体中 RAB1A 含量。

[试剂盒内容]

试剂名称	数量	试剂名称	数量
96孔板(预包被)	1	96孔板覆膜	4
标准品	2	标准品稀释液	1×20mL
检测溶液A	1×120μL	检测稀释液A	1×12mL
检测溶液B	1×120μL	检测稀释液B	1×12mL
TMB底物	1×9mL	终止液	1×6mL
浓洗涤液(30×)	1×20mL	使用说明书	1

[需自备的设备及试剂]

1、450±10nm 滤光片的酶标仪(建议仪器使用前提前预热)

2、单道或多道微量加液器及吸头

3、稀释样品的 EP 管

4、蒸馏水或去离子水

5、吸水纸

6、盛放洗液的容器

[试剂盒的储存及有效期]

1、 未开封的试剂盒：所有试剂均按试剂瓶标签上所示保存。请注意，收到试剂盒后请尽快将标准品、检测溶液 A、检测溶液 B 以及 96 孔板保存于-20℃。

2、 使用后的试剂盒：剩余试剂仍需按照试剂瓶标签所示的温度保存，开封后的酶标板要加干燥剂后密封保存于-20℃，避免潮湿。

注意：

试剂盒内酶标条可拆卸，按实验需求可分多次使用；使用后的剩余试剂盒建议在首次实验后 1 个月内使用完毕。产品过期时间以盒子上的标签为准，保质期内所有组分都确保是稳定的。

[标本的采集与保存]

1、 组织匀浆：

1） 取适量组织块，于预冷 PBS（0.01mol/L, pH 7.0-7.2）中清洗去除血液，称重后备用（组织块较大需先剪碎后再匀浆）；

2） 可同时选用多种匀浆方法达到较好的破碎效果：首先将组织块移入玻璃匀浆器，加入 5-10mL 预冷 PBS 进行充分研磨，该过程需在冰上进行（有条件实验室可选用机器匀浆）；得到的匀浆液可再利用超声破碎或反复冻融进一步处理（超声破碎过程中注意冰浴降温；反复冻融法可重复 2 次）。

3） 将制备好的匀浆液于 5000×g 离心 5 分钟，留取上清即可检测。

2、细胞裂解液：

1）贴壁细胞需要先用胰酶消化，离心收集细胞（悬浮细胞可直接离心收集）；

2）将收集到的细胞用冷 PBS 洗 3 次；

3）物理方法裂解细胞（可先超声破碎细胞，再反复冻融）：

i 超声破碎：取适量 PBS 重悬细胞，用一定功率的超声波处理细胞悬液，使细胞急剧震荡破裂。

ii 反复冻融：将待破碎的细胞在-20℃ 以下冰冻，室温融解，反复 3 次，使细胞溶胀破碎。

4）将标本于 2-8℃ 1500×g 离心 10 分钟，收集上清备用。

3、 其它生物标本：请 1000×g 离心 20 分钟，取上清即可检测，或将上清置于-20℃ 或-80℃ 保存，但应避免反复冻融。

注意：

1、 以上标本均需密封保存，4℃ 保存应小于 1 周，-20℃ 不应超过 1 个月，-80℃ 不应超过 2 个月。

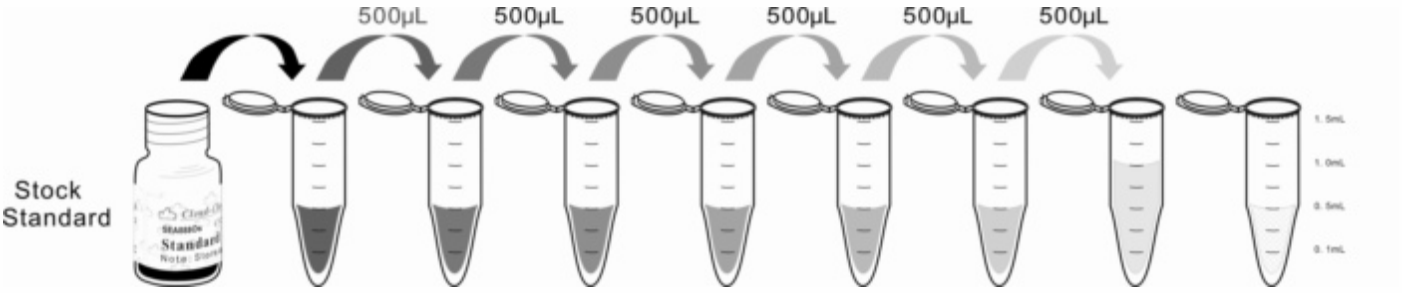
2、 标本溶血会影响最后检测结果，因此溶血标本不宜进行此项检测。

3、 标本使用前应缓慢均衡至室温，不应加热使之融解。

[试剂准备]

1、 使用前将所有的试剂和标本缓慢均衡至室温(18-25℃)，试剂不能直接在 37℃ 溶解。

2、 **标准品**(冻干品)：每瓶标准品加入**标准品稀释液** 1mL，盖好后室温静置大约 10 分钟，同时反复颠倒/搓动以助溶解，其浓度为 80ng/mL(贮液)。先将其稀释为 10ng/mL(标准曲线最高浓度)后，再准备 7 个稀释标准品的 EP 管，每个 EP 管中加入 500μL 的**标准品稀释液**，如图所示依次倍比稀释成 10ng/mL，5ng/mL，2.5ng/mL，1.25ng/mL，0.625ng/mL，0.312ng/mL，0.156ng/mL，标准品稀释液(0ng/mL)直接作为空白孔。**为保证实验结果有效性，每次实验请使用新的标准品溶液。**



Tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9
ng/mL	80	10	5	2.5	1.25	0.625	0.312	0.156	0

3、 **检测溶液 A 及检测溶液 B**：Detection A 及 Detection B 在使用前请手甩几下或少时离心处理，以使管壁或瓶盖的液体沉积到管底。临用前分别以**检测稀释液 A 或 B**1:100 稀释(如：10μL 检测溶液 A/990μL 检测稀释液 A)，充分混匀，稀释前根据预先计算好的每次实验所需的总量配制(100μL/孔)，实际配制时应多配制 0.1-0.2mL。

4、 **浓洗涤液**：用 580mL 蒸馏水或去离子水将 20mL 浓洗涤液稀释至 600mL，进行 30 倍稀释。

5、 **底物溶液**：请用灭菌的移液器吸头吸取所需体积的 TMB 至另一干净容器中使用，容器中剩余的底物应予丢弃，不要倒回 TMB 瓶中。

注意：

1、 标准品的稀释不能直接在板中进行。

2、 **标准品**请于临用前 15 分钟内配制。**该标准品只能使用一次。**

3、 **标准品、检测溶液 A 工作液、检测溶液 B 工作液**请使用相应的稀释液配制，不能混淆。混匀时要轻轻充分混匀，避免起泡。为保证实验结果的准确请使用微量吸管，并校准微量加液器。请依据所需的量精确配制，尽量不要微量配制(如吸取**检测溶液 A** 时，一次不要小于 10μL)，以避免造成浓度误差。

4、 请勿重复使用已经稀释过的**标准品、检测溶液** A **工作液**和**检测溶液 B 工作液**。

5、 **浓洗涤液**中如有结晶析出，请先温育至室温，轻轻混匀，至到结晶完全溶解再进行配制。

6、 试剂盒中部分试剂为储存液，客户需配置成工作液后使用，在配置过程中如因纯净水质量差或水质污染，以及实验中所用耗材洁净度差，可能造成实验结果不准确，甚至完全错误，请使用双蒸水。

[标本处理]

1、 **本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用该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的可能使用量，预留充足的样本。**

2、 实验前应预测标本含量，如果标本浓度过高，应对标本进行稀释，使稀释后的标本符合试剂盒的检测范围，计算时再乘以相应的稀释倍数。标本使用 0.01mol/L 的 PBS 稀释(PH=7.0-7.2)。

3、 若所检样本不包含在说明书所列样本之中，建议进行预实验验证其有效性，并注意留存样本。

4、 使用化学裂解液制备的组织匀浆或细胞提取液可能会由于某些化学物质的引入导致 ELISA 实验结果偏差。

5、 若样本为细胞培养上清，因该类样本干扰因素 较多，如：细胞状态、细胞数量、采样时间等，所以可能存在检测不出的情况。

6、 某些天然蛋白或重组蛋白，包括原核及真核重组蛋白，可能因为与本产品所使用的检测抗体及捕获抗体不匹配，而不被检测出。

7、 建议使用新鲜样本，保存时间过长可能会存在蛋白降解或变性导致实验结果偏 差。

[操作步骤]

1、 加样：分别设标准孔、待测样品孔、空白孔。设标准孔 7 孔，依次加入 100μL 不同浓度的标准品(见试剂准备 2)。空白孔加 100μL(见试剂准备第二步最后一管)，余孔加待测样品 100μL，酶标板加上覆膜，37℃温育 2 小时。

2、 弃去液体，甩干，不用洗涤。

3、 每孔加**检测溶液 A 工作液** 100μL(临用前配制)，酶标板加上覆膜，37℃温育 1 小时。

4、 弃去孔内液体，每孔用 350μL 的洗涤液洗涤，浸泡 1-2 分钟，吸去(不可触及板壁)或甩掉酶标板内的液体，在实验台上铺垫几层吸水纸，酶标板朝下用力拍几次(也可轻拍将孔内液体拍干)，重复洗板 3 次。最后一次洗涤后，要把孔内的洗涤液完全甩干。自动洗板机亦可。

5、 每孔加**检测溶液 B 工作液**(临用前配制)100μL，加上覆膜，37℃温育 30 分钟。

6、 弃去孔内液体，甩干，洗板 5 次，方法同步骤 4。

7、 每孔加**底物溶液** 90μL，酶标板加上覆膜，37℃ **避光显色**(反应时间控制在 15-25 分钟，不要超过 30 分钟。当标准孔的前 3-4 孔有明显的梯度蓝色，后 3-4 孔梯度不明显时，即可终止)。

8、 每孔加**终止溶液** 50μL，终止反应，此时蓝色立转黄色。终止液的加入顺序应尽量与底物溶液的加入顺序相同。如出现颜色不匀一，请轻轻晃动酶标板以使溶液混合均匀。

9、 在确保酶标板底无水滴及孔内无气泡后，立即用酶标仪在 450nm 波长测量各孔的光密度(O.D.值)。

注意：

1、 **试剂准备：**准备一次实验所需要的酶标条，其它的可从微孔板上拆下，密封，按照说明书要求保存，以备下次使用。

2、 **加样：**实验操作中请使用一次性的吸头，避免交叉污染。加样时注意不要有气泡，将样品加于酶标板底部，尽量不触及孔壁，轻轻晃动混匀。加样或加试剂时，第一个孔与最后一个孔加样之间的时间间隔如果太大，将会导致不同的“预温育”时间，从而明显地影响到测量值的准确性及重复性。因此，一次加样时间(包括标准品及所有样品)最好控制在 10 分钟内。推荐设置复孔进行实验。

3、 **温育：**为防止样品蒸发，实验时请将加上盖或覆膜的酶标板置于湿盒内，以避免液体蒸发，洗板后应尽快进行下步操作，任何时侯都应避免酶标板处于干燥状态，同时应严格遵守给定的温育时间和温度。

4、 **洗涤：**充分的洗涤非常重要，在每次洗涤过程中，都要将洗涤液完全甩干。洗涤过程中反应孔中残留的洗涤液应在滤纸上拍干，勿将滤纸直接放入反应孔中吸水，同时要消除板底残留的液体和手指印，避免影响最后的酶标仪读数。如果有自动洗板机，应在熟练使用后再用到正式实 验过程中。

5、 **反应时间的控制：**加入底物后请定时观察反应孔的颜色变化(比如，每隔 10 分钟观察一次)，如颜色较深，请提前加入终止液终止反应，避免反应过强从而影响酶标仪光密度读数。

6、 **底物：**底物请避光保存，在储存和温育时避免强光直接照射。

7、 如果实验室内湿度低于 60%，推荐使用加湿器提高湿度水平。

[实验原理]

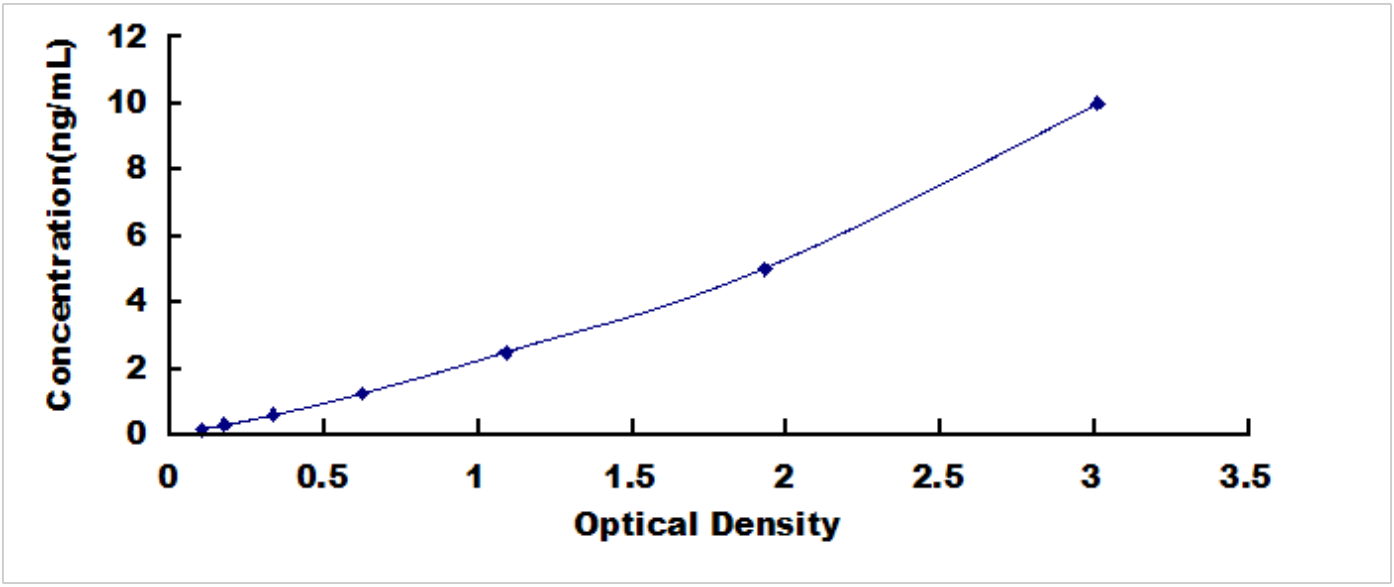
将 RAB1A 抗体包被于 96 孔微孔板中，制成固相载体，向微孔中分别加入标准品或标本，其中的 RAB1A 与连接于固相载体上的抗体结合，然后加入生物素化的 RAB1A 抗体，将未结合的生物素化抗体洗净后，加入 HRP 标记的亲和素，再次彻底洗涤后加入 TMB 底物显色。TMB 在过氧化物酶的催化下转化成蓝色，并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的 RAB1A 呈正相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度(O.D.值)，计算样品浓度。

[计算]

各标准品及样本 O.D.值扣除空白孔 O.D.值后作图(七点图)，如设置复孔，则应取其平均值计算。以标准品的浓度为纵坐标(或对数坐标)，O.D.值为横坐标(或对数坐标)，绘出标准曲线(最佳方程式应依回归方程计算的 R^2 值来定，以 R^2 值越趋近于 1 为好)。推荐使用专业制作曲线软件进行分析，如 curve expert 1.30，根据样品 O.D.值，由标准曲线查出相应的浓度，乘以稀释倍数；或用标准物的浓度与 O.D.值计算出标准曲线的回归方程式，将样品的 O.D.值代入方程式，计算出样品浓度，再乘以稀释倍数，即为样品的实际浓度。

[典型数据]

为了便于计算，尽管浓度为自变量而 O.D.值为因变量，我们绘图时仍采用标准品的 O.D.值作为横坐标(X 轴)，标准品的浓度为纵坐标(Y 轴)。同时为了试验结果的直观性，图中提供的是原始数据而非对数值。推荐使用对数值建立标准曲线图。由于实验操作条件的不同（如操作者、移液技术、洗板技术和温度条件等），标准曲线的 O.D.值会有所差异。所提供的标准曲线仅供参考，实验者需要根据自己的实验建立标准曲线。



大鼠 RAS 癌基因家族成员 RAB1A(RAB1A)检测试剂盒标准曲线

[检测范围]

0.156ng/mL-10ng/mL

[最低检测限]

0.054ng/mL

此值为 20 个空白样品(即标准品稀释液)测定的平均值加二倍标准差所对应的浓度。

[特异性]

本试剂盒用于检测 RAB1A，经检测与其它相似物质无明显交叉反应。

由于受到技术及样本来源的限制，不可能完成对所有相关或相似物质交叉反应检测，因此本试剂盒有可能与未经检测的其它物质有交叉反应。

[精密度]

精密度用样品测定值的变异系数 CV 表示。CV(%) = SD/mean×100

批内差：取同批次试剂盒对低、中、高值定值样本进行定量检测,每份样本连续测定 20 次，分别计算不同浓度样本的平均值及 SD 值。

批间差：选取 3 个不同批次的试剂盒分别对低、中、高值定值样本进行定量测定，每个样本使用同一试剂盒重复测定 8 次，分别计算不同浓度样本的平均值及 SD 值。

批内差： CV<10%

批间差： CV<12%

[稳定性]

经测定，试剂盒在有效期内按推荐温度保存，其活性降低率小于 5%。

为减小外部因素对试剂盒破坏前后检测值的影响，实验室的环境条件需尽量保持一致，尤其是实验室内温度、湿度及温育条件。其次由同一实验员来进行操作可减少人为误差。

[实验流程]

1、实验前标准品、试剂及样本的准备；
2、加样（标准品及样本）100μL，37℃孵育2小时；
3、吸弃，加检测溶液A100μL，37℃孵育1小时；
4、洗板3次；
5、加检测溶液B100μL，37℃孵育30分钟；
6、洗板5次；
7、加TMB底物90μL，37℃孵育15－25分钟；
8、加终止液50μL，立即450nm读数。

[说明]

1、 由于现有条件及科学技术水平尚不能对所有供货商提供的所有原料进行全面的鉴定与分析，本产品可能存在一定的质量技术风险。
2、 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密切相关，请务必准备充足的标本备份。
3、 不同批次的同一产品可能会有少许差别，如：检测限、灵敏度以及显色时间等，请依据试剂盒内说明书进行实验操作，网站电子版说明书仅作参考。
4、 只有全部使用本试剂盒配套试剂才能保证检测效果，不能混用其他制造商的产品。只有严格遵守本试剂盒的实验说明才会得到最佳的检测结果。
5、 在储存及温育过程中避免将试剂暴露在强光中。所有试剂瓶盖须盖紧以防止蒸发和微生物的污染，因为蛋白水解酶的干扰将导致出现错误的结果。
6、 刚开启的酶联板孔中可能会有少许水样物质，此为正常现象，不会对实验结果造成任何影响。请勿提前将酶标板从包装袋里拿出。
7、 由于操作者不熟练、操作失误或读数仪程序选用错误等有可能会导致错误结果的产生。请使用者使用该产品前仔细阅读说明书，调试好酶标仪，请使用配备有 450±10nm 滤光片的酶标仪，且该酶标仪测量范围在 0.001-3.000 O.D.或以上。
8、 同一使用者在使用同一产品时，如不同时间订购，也可能会因不同批次的少量差异产生不同结果，因此建议使用者在每次使用前均进行预实验。
9、 试剂盒在出厂前均经过严格检测，但由于运输条件及各实验室条件差异，可能会造成实验结果与出厂结果不一致或不同批次试剂盒批间差大的情况，对于这种情况会酌情处理。
10、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蛋白的产品做对比，平行检测可能会存在检测结果不一致的情况。
11、本操作说明同样适用于 48T 试剂盒，但 48T 试剂盒所有试剂减半。

[警告]

本试剂盒中使用了稀硫酸作为终止液，其具有轻微腐蚀性，使用时应避免接触衣物或眼、手等皮肤暴露部位。

[问题解答]

问题	可能原因	解决方案
标准曲线差	标准品准备不正确	进行正确的标准品梯度稀释
	吸取及洗涤不充分	充分的吸取及洗涤
	移液不精确	检查和校正移液器
精密度低	洗涤不充分	按说明书要求充分洗涤和浸泡
	混匀不充分和吸取试剂不足	充分混匀和吸取试剂
	重复利用吸头、容器和覆膜	使用加样器要更换新的吸头、使用新的容器和覆膜
	加样不精确	检查和校正移液器
O.D 值低	每孔加的试剂量不精确	校正移液器，精确加入试剂
	温育时间不正确	保证充足的温育时间
	温育温度不正确	试剂要平衡至室温并保证准确的温育温度
	酶标记物或底物失效	通过混合酶标记物和底物，颜色应迅速显现来检查
	没有加入终止液	按照说明书实验操作步骤加入终止液
	超出读数时间读数	在说明书推荐的读数时间内读数
样本值	不正确的样本储存方式	正确储存样本，使用新鲜样本进行实验
	不正确的样本收集和处理方法	采取正确的样本收集和处理方法
	待测物质在样本中含量低	使用新鲜样本，重复实验